

5

Parte experimental

Validação analítica

A validação analítica busca, por meio de evidências objetivas, demonstrar que um método produz resultados confiáveis e adequados ao uso pretendido⁴⁰. Para isso, o laboratório deve assegurar que as características de desempenho atendem aos requisitos propugnados. A seguir, são apresentados os parâmetros avaliados neste estudo, que, em conjunto, caracterizam o método desenvolvido.

5.1

Estudos de calibração

Utilizando o programa de temperatura e condições otimizadas, realizaram-se os testes para definição do procedimento de calibração.

Curvas analíticas foram realizadas utilizando soluções de calibração de concentrações de 0,25 a 8 $\mu\text{g L}^{-1}$, tanto em meio aquoso simples (HNO_3 2,5 % v/v), e na presença de soro. Nos estudos com a matriz, a diluição foi feita na própria cubeta do equipamento, utilizando um padrão mais concentrado. Os resultados obtidos não foram satisfatórios, pois a massa característica obtida foi, em média, de 80 pg / 0,0044 s^{-1} , quando o valor esperado deveria estar entre 33,6 e 50,4 pg / 0,0044 s^{-1} , de acordo com o manual do equipamento, que traz o valor para soluções aquosas. Os coeficientes de correlação das curvas aquosa e com a matriz foram, respectivamente, de 0,9982 e 0,9967, com coeficientes angulares de, respectivamente, $7,6 \times 10^{-4}$ e $6,8 \times 10^{-4}$. A razão dos coeficientes ($m_{\text{matriz}}/m_{\text{aquosa}}$) foi de 0,89, podendo-se considerar, em princípio, a existência de um pequeno efeito de matriz (Figura 16).

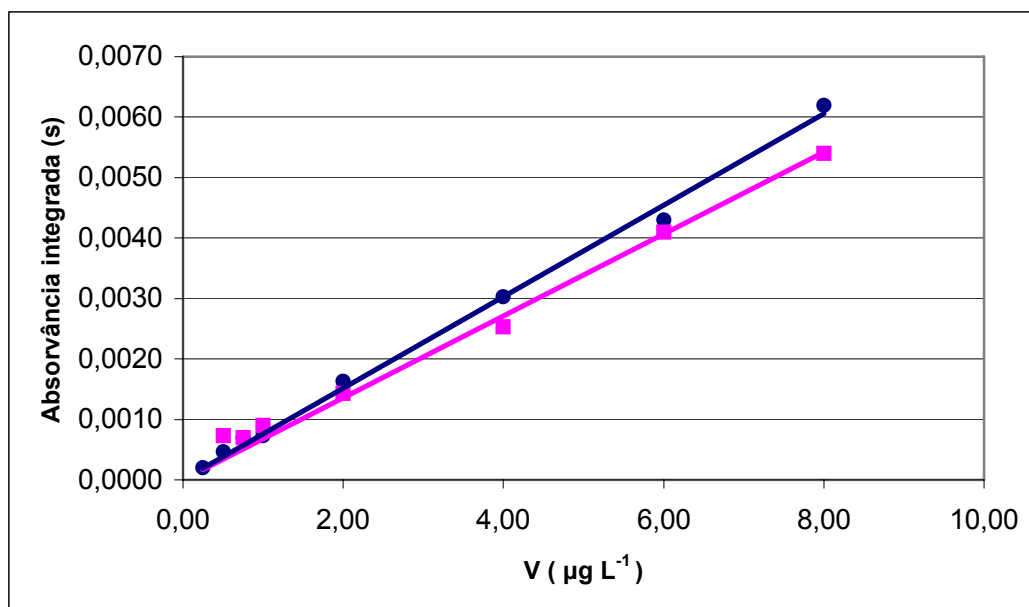


Figura 16. Curvas de calibração do vanádio em meio de HNO₃ 2,5 %v/v (●) e na presença da matriz (■), utilizando o programa de temperatura otimizado.

A temperatura de atomização não havia sido objeto de otimização, uma vez que já havia indicação da literatura de que a temperatura deveria ser a mais alta possível²⁶. Com o objetivo de melhorar a massa característica, modificou-se a temperatura de atomização para 2600°C e foi refeito o estudo de calibração.

Neste novo estudo, foi obtida uma melhora na massa característica, para valores de aproximadamente 60 pg / 0,0044 s⁻¹, mas os valores de absorvância continuaram baixos. Como a nova temperatura de atomização era a máxima permitida no equipamento, foi realizado um estudo para determinar se um aumento no tempo de integração poderia melhorar a massa característica (ou seja, a sensibilidade). Neste estudo, foi utilizado o programa padrão do equipamento e uma solução de 100 µg L⁻¹. Observa-se um incremento significativo da massa característica até 9 segundos de atomização e leitura (figura 17).

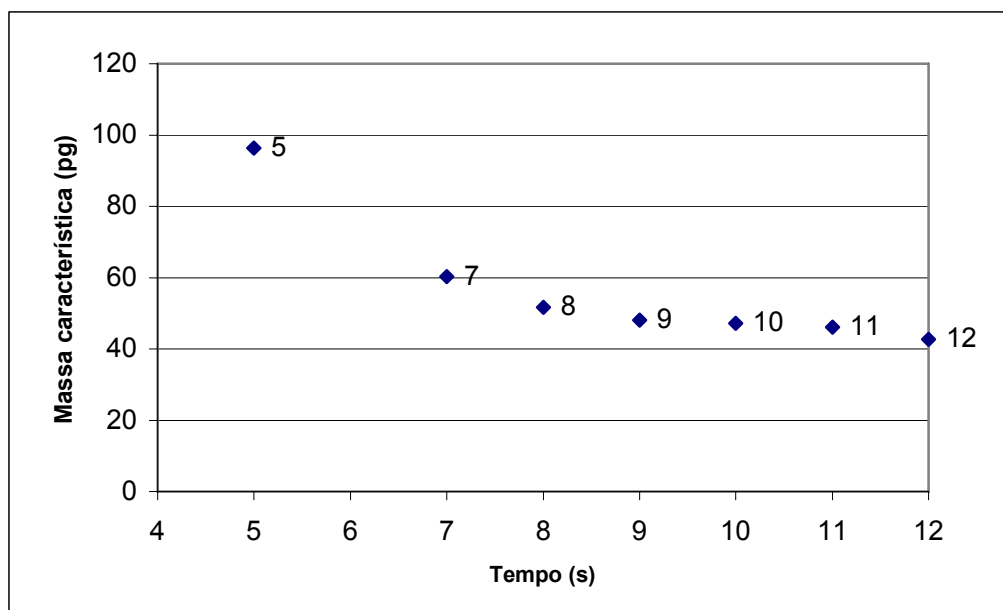


Figura 17. Evolução da massa característica com o aumento do tempo de integração ($T_{at} = 2600\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Baseado nestes resultados, foi realizado um estudo de calibração, mantendo-se todos os parâmetros obtidos na otimização, modificando apenas a temperatura de atomização (para $2600\text{ }^{\circ}\text{C}$) e o tempo de integração (12s). Desta forma, a massa característica média obtida foi de $42,7\text{ pg} / 0,0044\text{ s}^{-1}$, conforme figura 18. O equipamento, porém, apresentou problemas técnicos, de superaquecimento, devido a estas condições extremas de temperatura e tempo, o que impossibilitou a continuação do estudo usando esta configuração.

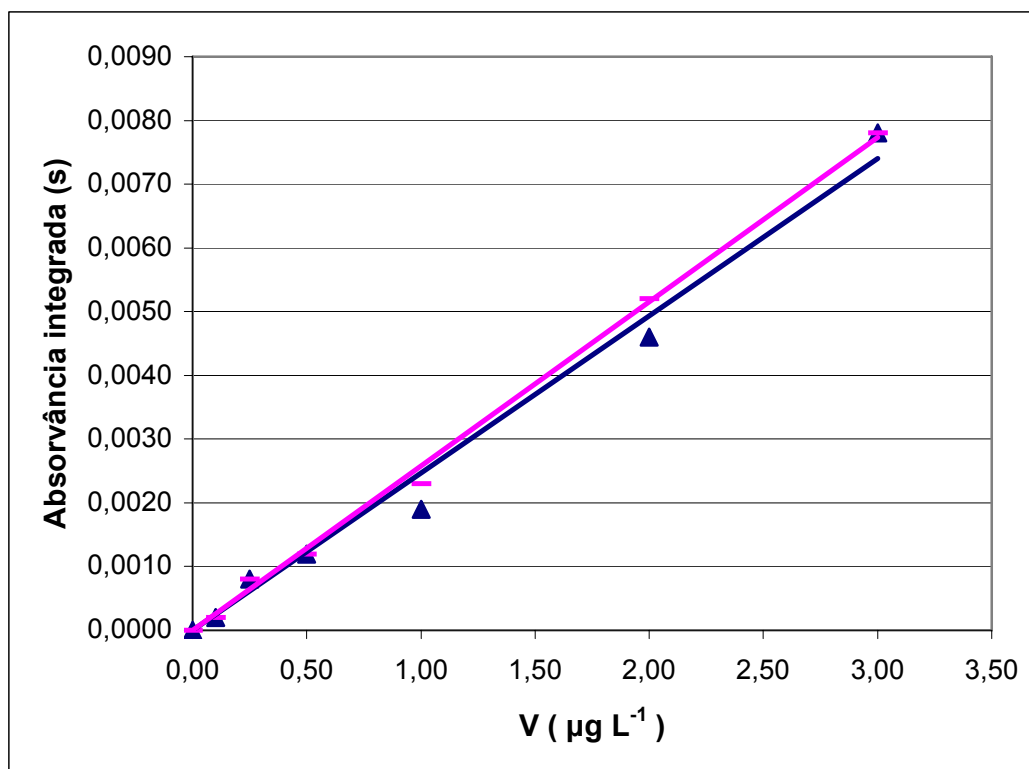


Figura 18. Curvas de calibração do vanádio em meio de HNO₃ 2,5 %v/v (▲) e na presença da matriz (—), usando o programa de temperatura otimizado, temperatura de atomização 2600°C e tempo de integração de 12 segundos.

Considerando as limitações instrumentais em relação ao superaquecimento, foi realizado um novo estudo onde, mantendo-se os outros parâmetros obtidos com a otimização multivariada, foi modificada apenas a temperatura de atomização (para 2600°C) e foi reduzida a diluição da amostra (de 1+2 para 2+1, usando HNO₃ 2,5% v/v como diluente). A modificação tem como objetivo aumentar a absorvância. Dada a mudança na concentração da matriz, foi reavaliada a temperatura de pirólise, conforme mostrado na figura 19, confirmando que a temperatura de 1240 °C pode ser mantida.

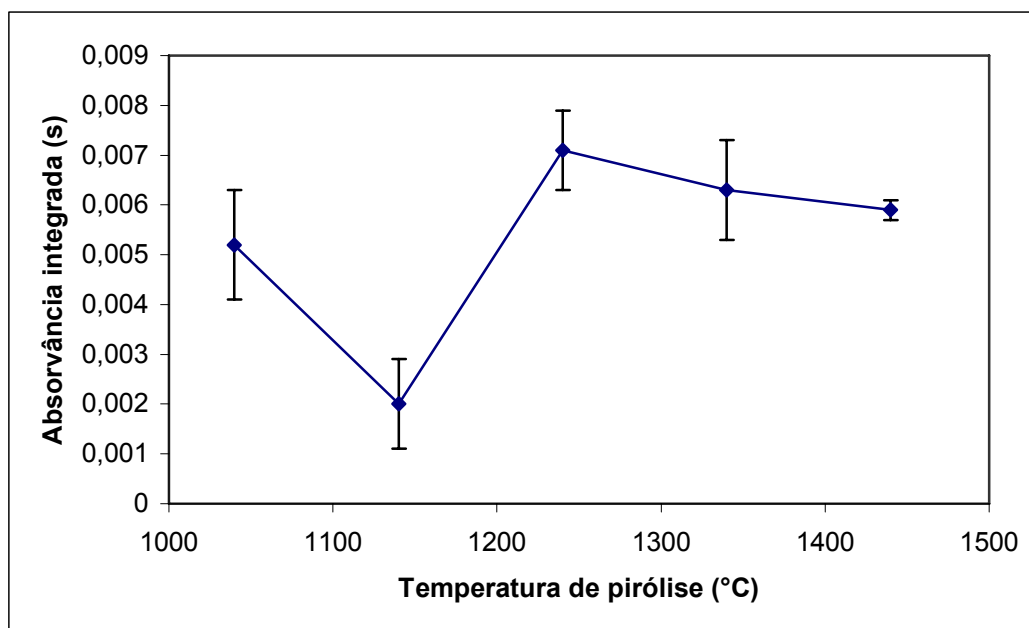


Figura 19. Estudo da temperatura de pirólise com a amostra ($3 \mu\text{g L}^{-1}$ de V) diluída 2+1 em HNO_3 2,5% (v/v), $T_a = 2600^\circ\text{C}$, $t_{\text{int}} = 7 \text{ s}$

Com estas novas condições (fator de diluição igual a 2+1 e temperatura de atomização igual a 2600°C , e os parâmetros restantes conforme tabela 9) foi obtida uma massa característica em média de $50 \text{ pg} / 0,0044 \text{ s}^{-1}$ (valor esperado de $33,6$ a $50,4 \text{ pg} / 0,0044 \text{ s}^{-1}$). Os coeficientes de correlação da curva de calibração em HNO_3 2,5% v/v e na presença da matriz foram de 0,99912 e 0,99776, respectivamente, e seus respectivos coeficientes angulares foram 0,00229 e 0,00217. A razão dos coeficientes ($m_{\text{matriz}}/m_{\text{aquosa}}$) foi de 0,95. Foi realizado o teste t conforme documento do INMETRO⁴⁰, e verificou-se que a matriz não afeta o ensaio ($t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$). As curvas obtidas estão representadas na figura 20.

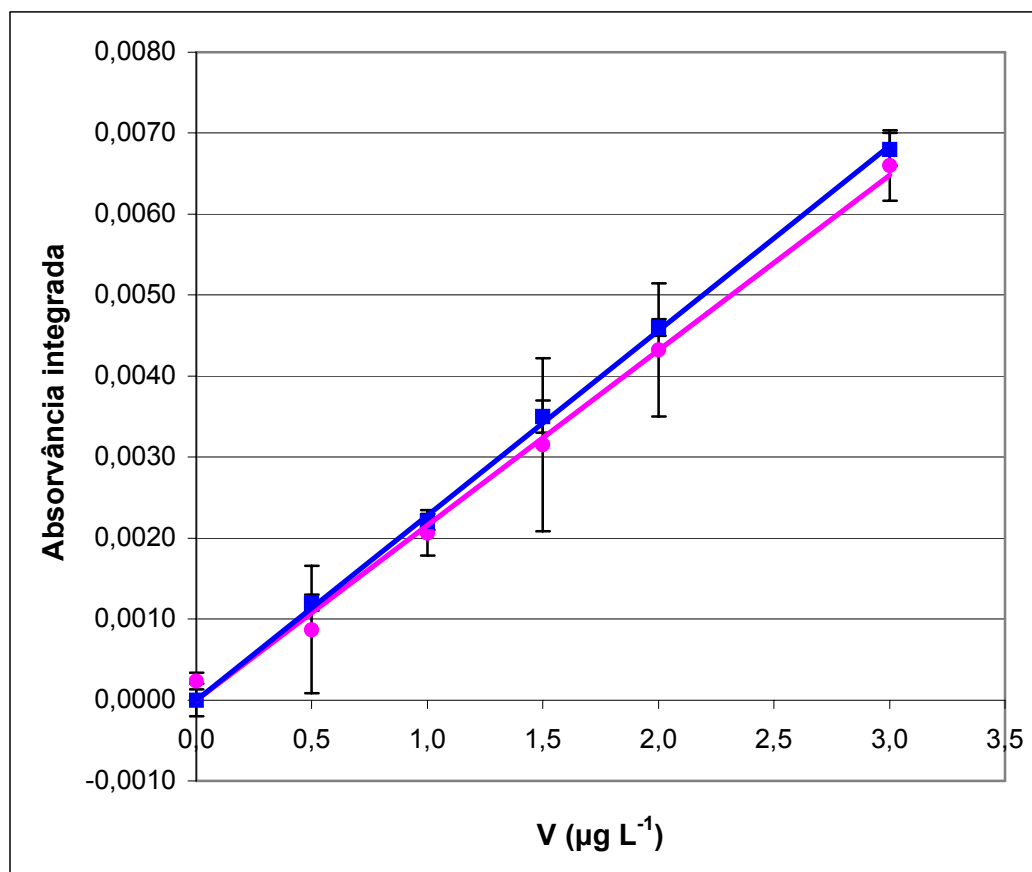


Figura 20. Curvas de calibração do vanádio em meio de HNO₃ 2,5 %v/v (■) e na presença da matriz (●), usando o programa de temperatura otimizado, temperatura de atomização 2600°C e diluição 2+1 da amostra com HNO₃ 2,5% (v/v).

Tabela 9. Procedimento e programa de temperatura após modificações.

Etapa	Temperatura (C°)	Rampa (s)	Permanência (s)	Vazão do gás (mL/min)
Secagem	110	1	30	250
Secagem	130	15	30	250
Pirólise	1240	10	20	250
Atomização	2600	0	7	0
Limpeza	2610	1	4	250
Volume de injeção da amostra 30 µL				
Diluição da amostra: duas partes de soro + uma parte de HNO ₃ 2,5% (v/v)				
Volume de injeção de modificador 10 µL				
Massa do modificador (5 partes Pd + 3 partes Mg): 9 µg/10µL				

Foi estudado o comportamento da curva de calibração na presença da matriz de cinco amostras de soro diferentes, pela da adição do analito

à essas amostras. Na figura 21, que mostra as curvas obtidas, observa-se que não houve diferença significativa entre as suas inclinações. A tabela 10 mostra as inclinações obtidas e a razão das mesmas em relação à da curva aquosa. Nos resultados obtidos das cinco amostras estudadas apenas uma apresentou uma razão menor que 0,9, as outras quatro amostras apresentaram razões iguais a 0,9 indicando que a influência de diferentes tipos de soro foi pequena. Neste caso também, foi realizado o teste t e verificou-se que a matriz não afeta o ensaio ($t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$). O teste t realizado em pares (curva aquosa x curva com a matriz) demonstrou significância em dois dos quatro pontos da curva ($t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabelado}}$). Foi realizado o teste mono-caudal analisando o limite inferior da curva e neste teste cinco dos vinte pontos ficaram fora do limite de confiança de 95%. Apesar de alguns resultados apontarem para uma influência da matriz pouco significativa, foi definido que os testes seriam realizados utilizando a curva em HNO₃ 2,5% v/v, evitando assim trabalhar com a técnica de adição padrão.

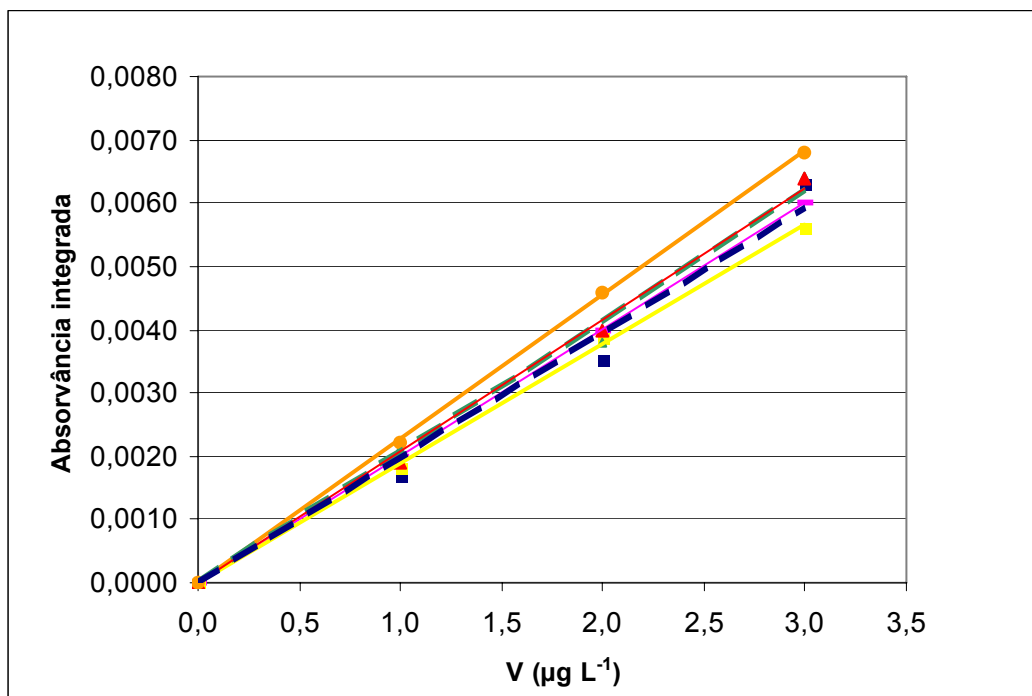


Figura 21. Curvas de adição de analito a diferentes amostras de soro : amostra A (■), amostra B (—), amostra C (■), amostra D (▲), amostra E (▲) e solução de calibração em HNO₃ 2,5% v/v (●).

Tabela 10. Inclinações das curvas de adição de analito e razões de inclinação entre estas curvas e a curva aquosa ($m_{\text{matriz}} / m_{\text{aquosa}}$).

	Coeficiente angular (m)	($m_{\text{matriz}} / m_{\text{aquosa}}$)
Amostra A	0,00207	0,9
Amostra B	0,00199	0,9
Amostra C	0,00189	0,8
Amostra D	0,00210	0,9
Amostra E	0,00213	0,9

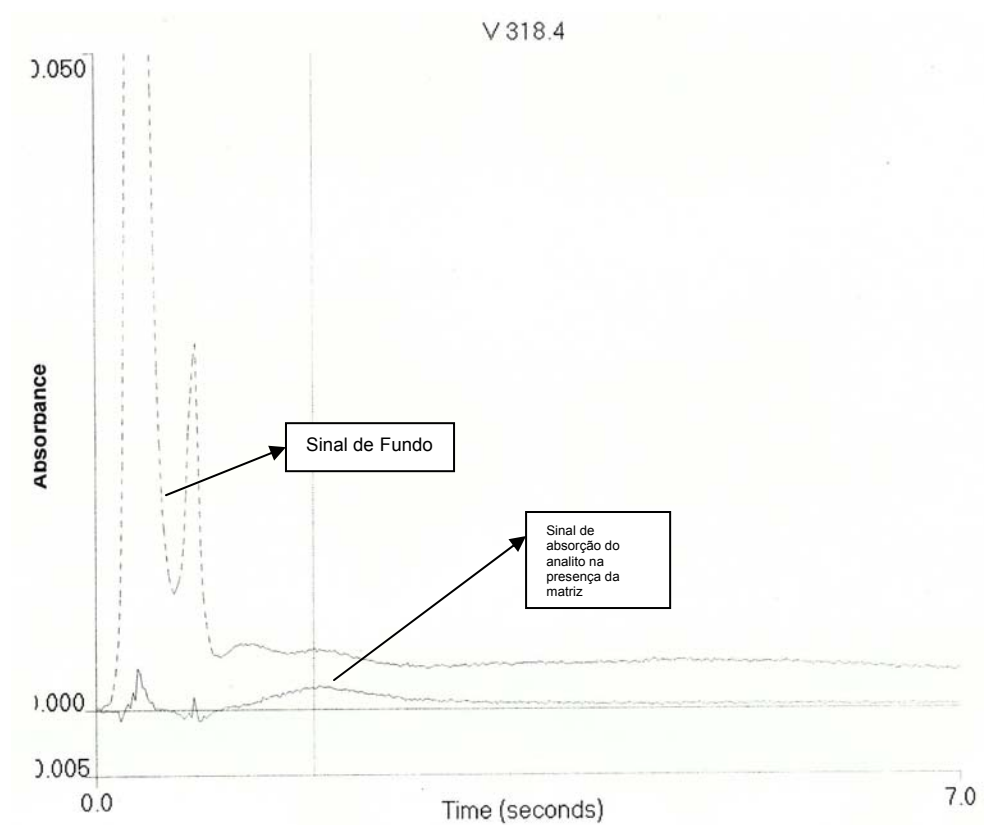


Figura 22. Perfil dos sinais de absorção e fundo na presença da matriz.

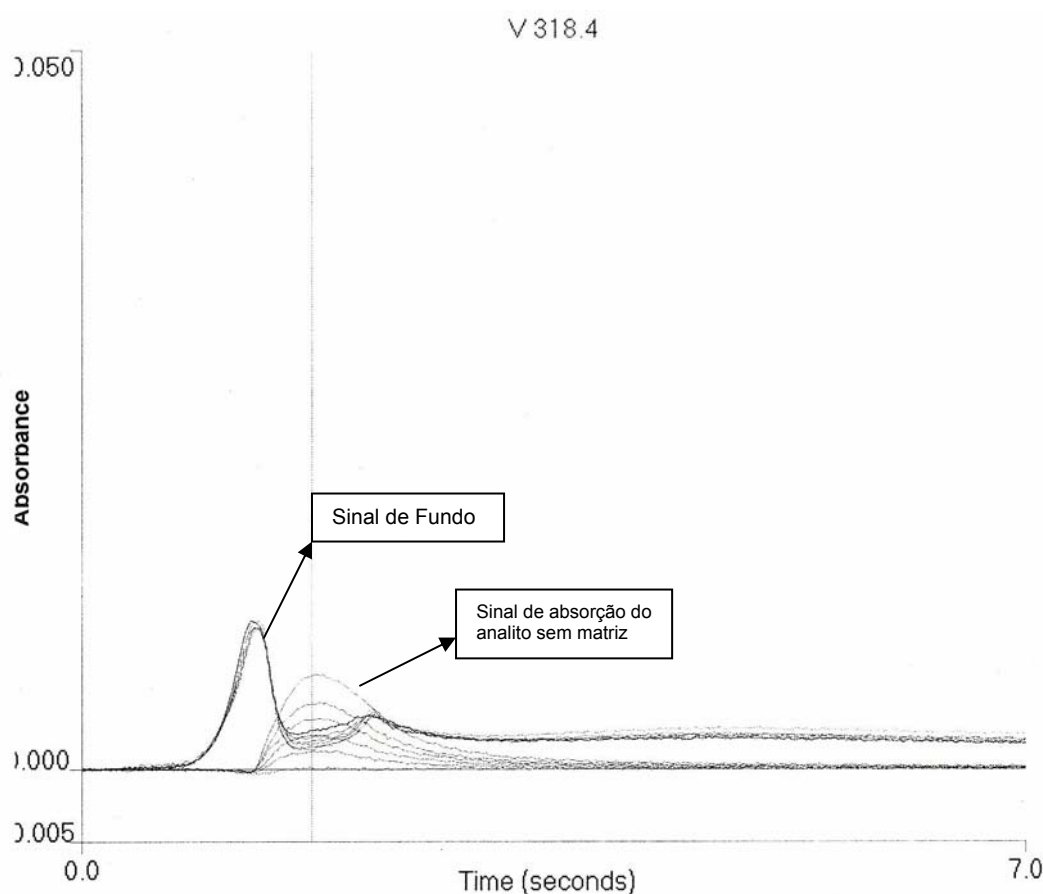


Figura 23. Sobreposição dos sinais de absorção e fundo na ausência da matriz. Soluções em HNO₃ 2,5% v/v nas concentrações de : 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 µg L⁻¹.

Observando as figuras 22 e 23 foi verificado que, apesar da alta temperatura de atomização, o perfil se apresenta alargado. Na presença da matriz, o tempo do máximo (relativo à altura) do pico se apresenta um pouco atrasado em relação às soluções de calibração (1,7 → 1,8 s), explicando talvez a diferença no coeficiente angular.

Considerando os resultados encontrados, foi definido que a curva de calibração do método será em HNO₃ 2,5% v/v, uma vez que a matriz não interfere significativamente no ensaio. A partir deste ponto, todos os testes foram realizados utilizando a curva em HNO₃ 2,5% v/v.

5.2

Linearidade

A linearidade determina a capacidade do método em produzir respostas que sejam linearmente proporcionais à concentração do analito

dentro de uma faixa especificada, em que demonstra a exatidão e precisão requeridas. Nesta faixa, a sensibilidade pode ser considerada constante. A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito.

O coeficiente de correlação linear (r) é usado para indicar se os dados de calibração ajustam-se a um modelo linear. Pode-se considerar a reta como modelo matemático adequado para o método se r for maior do que 0,9. No presente estudo, foi encontrado um r de 0,9989 para a curva da figura 24. A curva foi realizada com dez replicatas. Como o intervalo de confiança do coeficiente linear contém a origem (-0,00013 a 0,00024), o modelo linear pode ser considerado como do tipo $y=mx$, onde y é a absorvância integrada, m é o coeficiente angular e x é a concentração de vanádio.

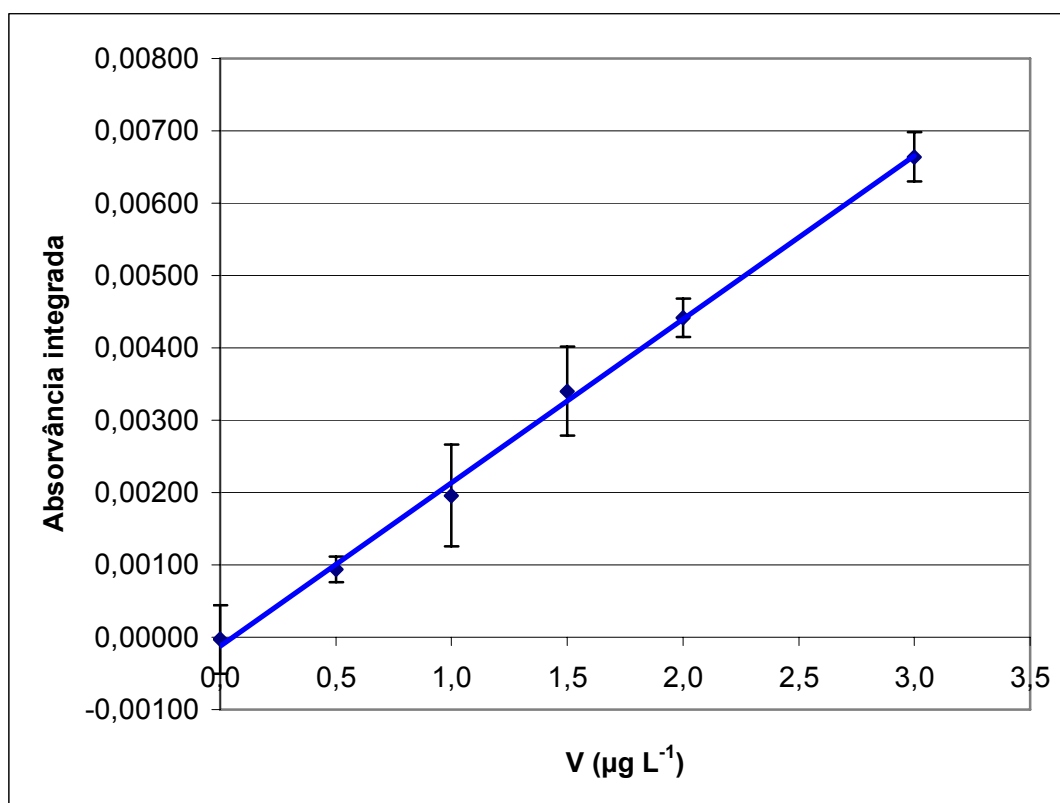


Figura 24. Curva de calibração do vanádio em meio de HNO_3 2,5% v/v, usando o programa e condições da tabela 9.

Na análise de variância, foi feito o ajuste do modelo linear e os resultados estão na tabela 11. Para o nível de significância de 0,05, a

regressão linear é significativa ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$) e a falta de ajuste do modelo não é significativa ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$), sendo que o modelo explica 99,82% da variabilidade encontrada.

Tabela 11. Análise de variância dos dados que geraram o gráfico da figura 24 para o ajuste do modelo linear

Fonte de variação	Soma Quadrática	Número de gl	Média Quadrática	F calculado	F crítico
Regressão	0,000066	1	0,000066	1397,55	4,95
Resíduo	0,00000047	10	0,00000047		
Falta de ajuste	0,00000035	4	0,000000089	4,43	4,53
Erro puro	0,00000012	6	0,000000020		
Total	0,000067	11			
% de variância explicada=			99,29		
% máximo de variância explicada=			99,82		

5.3

Limite de detecção do método

O limite de detecção é a menor concentração de analito na amostra que pode ser distinguida de zero com uma determinada segurança, mas não quantificada. O limite de detecção foi determinado utilizando-se uma amostra com concentração de analito próximo a zero (o menor valor encontrado). A amostra foi analisada 10 vezes em 10 preparações diferentes e foram calculados a média e o desvio padrão. O limite de detecção foi calculado usando a expressão, conforme documento da IUPAC⁴¹, $LD = t_{n-1,1-\alpha} \cdot s_0$, onde o valor de $t_{n-1,1-\alpha}$ utilizado foi 3 e s_0 , o desvio padrão, em concentração, calculado das 10 determinações. Deste modo, $LD = 3 \cdot s_0$, ou seja, o limite de detecção encontrado para o método desenvolvido foi de $0,30 \mu\text{g L}^{-1}$.

5.4

Limite de quantificação do método

O limite de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e exatidão.

Pode ser considerado como um múltiplo (duas ou três vezes) do limite de detecção ou um múltiplo 10 do desvio padrão da dosagem de uma amostra com concentração de analito próximo a zero (o menor valor encontrado). A amostra foi analisada (em triplicata) 10 vezes em 10 preparações diferentes e foram calculados a média e o desvio padrão. O limite de quantificação do método obtido foi de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ calculado pela equação⁴¹ $LQ = 10 \cdot s_0$, onde s_0 é o desvio padrão em concentração calculado das 10 determinações.

5.5

Faixa linear de trabalho

A faixa linear de trabalho é definida como o intervalo entre o nível inferior e superior de concentração do analito onde é possível a determinação com a precisão, exatidão e linearidade adequadas e especificadas para o método⁴⁰. A faixa linear do método foi definida no limite inferior como o limite de quantificação $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e no limite superior pelo valor do maior concentração da solução analítica, $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$, já que o teste da curva demonstrou sua linearidade. Uma vez que não são esperadas concentrações de vanádio em soro acima deste valor, concentrações maiores não foram testadas. Entretanto, o comportamento ainda será linear acima deste valor.

5.6

Exatidão

A exatidão é definida como sendo o grau de concordância entre o resultado de um método e o valor de referência aceito convencionalmente como verdadeiro. A exatidão deve ser declarada quantitativamente, na forma de tendência. Os métodos usualmente aceitos para os estudos da exatidão são a recuperação, a análise de material de referência certificado e a comparação com métodos de referência.

5.6.1

Estudos de recuperação

A recuperação pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com o analito. Uma boa recuperação não garante a exatidão, mas uma recuperação fora dos limites aceitáveis indica uma falta de exatidão.

A recuperação neste estudo foi estimada pela análise em triplicata de amostras fortificadas com as seguintes concentrações de vanádio: 1, 2 e 3 $\mu\text{g L}^{-1}$. A adição foi realizada na cubeta fazendo a diluição de um pool de soros com uma solução da diluição (na proporção de 2+1) contendo o analito. A curva de calibração foi realizada em meio de HNO_3 2,5% v/v. O cálculo da recuperação foi feito através da expressão “Recuperação (%) = $\{(C_1 - C_0) / C_{ad}\} \cdot 100$ ”, onde C_0 é a concentração da amostra sem a fortificação, C_1 a concentração da amostra fortificada e C_{ad} é a concentração adicionada.

Tabela 12. Resultados dos estudos de recuperação.

Concentração adicionada $\mu\text{g L}^{-1}$	Recuperação (%)			
	1ª replicata	2ª replicata	3ª replicata	Média
1	109,3	85,0	97,2	97,2 \pm 12,1
2	103,2	91,1	103,2	99,2 \pm 7,0
3	107,3	117,4	91,1	105,3 \pm 13,3

Deve-se observar que, no nível de concentração em questão, a faixa aceitável para a recuperação é de 80 a 120%⁴⁰.

5.6.2

Análise de material de referência certificado

Para o presente estudo, foi adquirido um material de referência certificado (MRC) do *National Institute of Standards & Technology* (NIST). O material de referência certificado 1598a é uma mistura de soro bovino e suíno com

constituintes inorgânicos. Foi realizada a análise do material de referência certificado em dois dias diferentes (n=5). O valor certificado do vanádio é de $1,88 \pm 0,11 \mu\text{g L}^{-1}$. A média encontrada foi $1,86 \mu\text{g L}^{-1}$ (relativa aos dois dias de análise), o desvio padrão $0,12 \mu\text{g L}^{-1}$ e o intervalo de confiança (n=10) para 95% foi de $1,86 \pm 0,08 \mu\text{g L}^{-1}$. Foi calculado o erro relativo – 0,82% e o índice Z – 0,14, considerado satisfatório segundo o DOQ-CGCRE-008 do INMETRO⁴⁰.

5.7

Precisão

A precisão avalia a dispersão entre resultados independentes da mesma amostra, em condições definidas. A precisão é expressa pelo desvio padrão ou desvio padrão relativo. Para a validação de um método executado apenas por um laboratório, basta o estudo da repetitividade e da precisão intermediária (ou reprodutibilidade intralaboratório)⁴⁰.

5.7.1

Repetitividade

É a precisão determinada em condições de repetitividade: mesmo método, mesmo analista, mesmo equipamento e repetições em curto intervalo de tempo (no mesmo dia). Neste estudo, foi realizada a análise de três níveis de amostra fortificada, com as seguintes concentrações de vanádio: 1, 2 e $3 \mu\text{g.L}^{-1}$. Foram dosadas oito replicatas de cada concentração, calculadas as médias, os desvios padrão e os coeficientes de variação. Os resultados encontrados estão na tabela 13.

Tabela 13. Resultados dos estudos de precisão (repetitividade).

Concentração de analito adicionada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1,0	2,0	3,0
Média ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1,43	2,69	3,95
Desvio padrão ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$1,47 \times 10^{-1}$	$2,24 \times 10^{-1}$	$3,32 \times 10^{-1}$
Coefficiente de variação (%)	10,3	8,3	8,4

5.7.2

Reprodutibilidade intralaboratório

É a precisão avaliada na mesma amostra e no mesmo laboratório, porém variando o analista, o equipamento e em momentos diferentes. Neste estudo, a precisão intermediária foi avaliada variando o analista, e em tempos diferentes, em três níveis de concentração de uma amostra fortificada com as seguintes concentrações de vanádio: 1, 2 e 3 $\mu\text{g L}^{-1}$. Foram analisadas oito replicatas de cada concentração, calculadas as médias, os desvios padrão e os coeficientes de variação. Os resultados encontrados estão na tabela 14.

Tabela 14. Resultados dos estudos de reprodutibilidade (precisão intermediária).

Concentração de analito adicionada ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	1,0	2,0	3,0
Média ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	1,42	2,57	3,81
Desvio padrão ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	$5,16 \times 10^{-2}$	$1,45 \times 10^{-1}$	$1,60 \times 10^{-1}$
Coefficiente de variação (%)	3,6	5,6	4,2

5.7

Robustez

A robustez é a resistência a mudanças nos resultados produzidos por um método quando alterações mínimas são realizadas nas condições experimentais estabelecidas. O método é considerado robusto, quando a

variação deste for maior ou igual a 10%. Para determinar a robustez foram utilizados os dados da otimização multivariada. Todos os parâmetros avaliados foram considerados robustos na faixa apresentada, com exceção da temperatura de pirólise, que apresentou uma faixa robusta com variação menor que 10%.

Tabela 15. Resultados dos estudos da robustez do método.

Descrição	Mínimo	Média	Máximo	Varição (%)
Temperatura de pirólise (°C)	1180	1255	1330	6
Massa de modificador ($\mu\text{g} / 10 \mu\text{L}$)	6	9,1	12,2	34
Volume de amostra injetado (μL)	26	30,5	35	15
Fator de diluição da amostra	1+4	1+2	1+1	15
Concentração de HNO_3 no diluente (%)	2,1	2,9	3,8	29

5.8

Parâmetros analíticos de mérito

Os parâmetros de mérito do método foram estabelecidos conforme a tabela 9. A curva foi considerada linear até pelo menos $3 \mu\text{g L}^{-1}$, que é o intervalo analítico de interesse, e os limites de detecção e quantificação encontrados foram respectivamente $0,3$ e $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$. A massa característica obtida foi $50 \text{ pg} / 0,0044 \text{ s}^{-1}$, dentro da faixa esperada para o equipamento, ($33,6$ a $50,4 \text{ pg} / 0,0044 \text{ s}^{-1}$). Nos estudos de exatidão foram obtidas recuperações médias de 97,2%; 99,2% e 105,3%, para concentrações de 1, 2 e $3 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. No caso da precisão dos resultados a repetitividade mostrou que o maior coeficiente de variação encontrado foi 10,3% na amostra adicionada de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$. Por outro lado o maior coeficiente de variação foi 5,6% na amostra adicionada de $2 \mu\text{g.L}^{-1}$, com a precisão intermediária. Foram obtidos valores maiores na repetitividade do que na reprodutibilidade, contrariando os resultados usualmente encontrados, isso se deve possivelmente falta de estabilidade da amostra enriquecida com vanádio. Estes parâmetros foram considerados adequados para finalidade do método.