

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA

KATIA GABRIEL

**VALIDAÇÃO DO VOLUME DE AMOSTRA UTILIZADO NO ENSAIO DE  
MERCÚRIO TOTAL EM ÁGUAS POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO  
ATÔMICA COM GERAÇÃO QUÍMICA DE VAPOR FRIO**

Porto Alegre, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE QUÍMICA

KATIA GABRIEL

**VALIDAÇÃO DO VOLUME DE AMOSTRA UTILIZADO NO ENSAIO DE  
MERCÚRIO TOTAL EM ÁGUAS POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO  
ATÔMICA COM GERAÇÃO QUÍMICA DE VAPOR FRIO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado junto à atividade de ensino “Projeto Tecnológico” do Curso de Química Industrial, como requisito parcial para a obtenção do grau de Química Industrial.

Profa. Dra. Morgana Bazzan Dessuy

Orientadora

Porto Alegre, 2015

## RESUMO

A determinação de mercúrio em águas é de grande importância ambiental devido às propriedades tóxicas dos compostos que o contêm. A técnica comumente utilizada na determinação deste elemento é a Espectrometria de Absorção Atômica com Geração Química de Vapor Frio (CV-AAS). Ela baseia-se na redução química do mercúrio previamente convertido ao estado de oxidação  $\text{Hg}^{2+}$ , a mercúrio metálico. O método analítico empregado para determinação de Hg em águas tem como referência o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* de autoria das instituições Associação Americana de Saúde Pública (APHA), Associação Americana de Trabalhos em Água (AWWA) e Federação Ambiental da Água (WEF), internacionalmente conhecidas, sendo, portanto, considerado normalizado. O método normalizado descreve o uso de uma alíquota de amostra de 100 mL para cada determinação. Neste trabalho é proposta a redução do volume da alíquota da amostra de 100 para 20 mL, visando o preparo simultâneo de maior número de amostras, diminuindo o tempo de análise, o consumo de reagentes e os resíduos gerados. Portanto, neste trabalho, a metodologia foi testada empregando o volume de 20 mL, validando-o frente ao método normalizado. Devido à alteração do escopo para o qual o método foi concebido quanto ao volume, a confiabilidade analítica foi garantida através de estudos de exatidão, linearidade, seletividade, limites de detecção e quantificação, precisão e incerteza de medição. A faixa de concentração utilizada de 0,40 a 4,00  $\mu\text{g L}^{-1}$  mostrou-se linear, com um coeficiente de determinação de 0,9984. A metodologia mostrou-se indiferente à presença de interferentes na matriz para a determinação do analito, aplicando-se o teste F para a seletividade. Os limites de detecção e de quantificação obtidos foram, respectivamente, de 0,25 e 0,36  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A precisão do método foi comprovada pelos coeficientes de variação abaixo de 10% para repetitividade e reprodutibilidade. A incerteza de medição foi estimada considerando como principais fontes o desvio de repetitividade e reprodutibilidade do ensaio, o padrão da curva de calibração e suas diluições.

**Palavras-chave:** Espectrometria de absorção atômica com vapor frio. Análise de águas. Determinação de mercúrio total. Validação.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações do analito obtidas para diferentes volumes de amostra.....	27
Tabela 2 - Respostas do analito nas soluções padrão sem matriz.....	28
Tabela 3 - Respostas do analito nas soluções padrão adicionadas na matriz.....	28
Tabela 4 - Respostas do analito para a construção da curva de calibração e cálculo dos resíduos.....	30
Tabela 5 - Respostas do analito em uma solução padrão de 0,20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para determinação do LDM e do LQ.....	32
Tabela 6 - Resultados dos ensaios de recuperações do analito para 5 diferentes amostras.....	33
Tabela 7 - Concentrações do analito obtidas para as soluções padrão de 0,50, 1,00 e 1,50 $\mu\text{g L}^{-1}$ nos 3 dias de análise.....	34
Tabela 8 - Concentrações do analito obtidas pelo analista 1 para soluções padrão de diferentes concentrações nos dois dias de análise.....	35
Tabela 9 - Concentrações do analito obtidas pelo analista 2 para soluções padrão de diferentes concentrações nos dois dias de análise.....	36
Tabela 10 - Comparação dos resultados obtidos pelos analistas 1 e 2, em dias diferentes.....	36
Tabela 11 - Concentrações ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de mercúrio nas 3 replicatas das 5 diferentes amostras, obtidos pelo analista 1, para o estudo formal de repetibilidade e reprodutibilidade.....	37
Tabela 12 - Concentrações ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de mercúrio nas 3 replicatas das 5 diferentes amostras, obtidos pelo analista 2, para o estudo formal de repetibilidade e reprodutibilidade.....	37
Tabela 13 - Parâmetros estatísticos calculados para o estudo de R&R.....	38
Tabela 14 - Contribuições das fontes para o cálculo da incerteza.....	41
Tabela 15 - Parâmetros avaliados e resultados obtidos.....	42
Tabela 16 - Consumo de reagentes e custo, para o uso de 100 mL de amostra.....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAS – Espectrometria de Absorção Atômica (do inglês: *Atomic Absorption Spectrometry*)

APHA – Associação Americana de Saúde Pública (do inglês: *American Public Health Association*)

AWWA - Associação Americana de Trabalhos em Água (do inglês: *American Water Works Association*)

CORSAN – Companhia Riograndense de Saneamento

CV – Coeficiente de Variação

CV AAS – Espectrometria de Absorção Atômica com Vapor Frio (do inglês: *Cold Vapor AAS*)

CVG AAS - Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Vapor Químico (do inglês: *Chemical Vapor Generation*)

DMA – Análise Direta de Mercúrio (do inglês: *Direct Mercury Analysis*)

F AAS – Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (do inglês: *Flame AAS*)

HG AAS - Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Hidretos (do inglês: *Hydride Generation AAS*)

ICP-MS - Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (do inglês: *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*)

ICP OES - Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (do inglês: *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*)

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

ISO/IEC – Organização Internacional de Padronização / Comissão Eletrotécnica Internacional (do inglês: *International Organization of Standardization / International Electrotechnical Commission*)

LDM – Limite de Detecção do Método

LQ - Limite de Quantificação

R&R – Repetibilidade e Reprodutibilidade

TD AAS - Decomposição Térmica, Amalgamação e Espectrometria de Absorção Atômica (do inglês: *Thermal Decomposition, Amalgamation and Atomic Absorption Spectrometry*)

USEPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (do inglês: *United States Environmental Protection Agency*)

VMP – Valor Máximo Permitido

WEF – Federação Ambiental da Água (do inglês: *Water Environment Federation*)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	8
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	10
<b>2.1 Geral</b> .....	10
<b>2.2 Específicos</b> .....	10
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	11
<b>3.1 Compostos contendo mercúrio</b> .....	11
<b>3.2 Métodos para a determinação de mercúrio</b> .....	11
3.2.1 Espectrometria de Absorção Atômica .....	13
3.2.2 Espectrometria de Absorção Atômica por Geração de Vapor Frio – CV AAS .....	14
<b>3.3 Validação de métodos analíticos</b> .....	15
3.3.1 Exatidão – Método normalizado x Método não normalizado .....	16
3.3.2 Seletividade .....	16
3.3.3 Linearidade .....	17
3.3.4 Limite de detecção e de quantificação .....	17
3.3.5 Exatidão .....	18
3.3.6 Precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) .....	18
3.3.7 Estudo formal de repetibilidade e reprodutibilidade .....	19
3.3.8 Incerteza de medição .....	21
<b>4 PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	22
<b>4.1 Materiais e reagentes</b> .....	22
<b>4.2 Preparo das amostras</b> .....	22
<b>4.3 Equipamentos</b> .....	23
<b>4.4 Validação</b> .....	23
4.4.1 Exatidão – Método normalizado x Método não normalizado .....	23
4.4.2 Seletividade .....	23
4.4.3 Linearidade .....	24
4.4.4 Limite de detecção e de quantificação .....	24
4.4.5 Exatidão .....	24
4.4.6 Precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) .....	25
4.4.7 Estudo formal de repetibilidade e reprodutibilidade .....	25

4.4.8 Incerteza de medição .....	25
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>27</b>
<b>5.1 Exatidão – Método normalizado x Método não normalizado .....</b>	<b>27</b>
<b>5.2 Seletividade .....</b>	<b>28</b>
<b>5.3 Linearidade .....</b>	<b>29</b>
<b>5.4 Limite de detecção e de quantificação .....</b>	<b>31</b>
<b>5.5 Exatidão .....</b>	<b>32</b>
<b>5.6 Precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) .....</b>	<b>33</b>
<b>5.7 Estudo formal de repetibilidade e reprodutibilidade .....</b>	<b>37</b>
<b>5.8 Incerteza de medição .....</b>	<b>39</b>
<b>5.9 Parâmetros avaliados .....</b>	<b>42</b>
<b>6 AVALIAÇÃO ECONÔMICA .....</b>	<b>43</b>
<b>7 IMPACTO AMBIENTAL .....</b>	<b>45</b>
<b>8 CONCLUSÃO .....</b>	<b>46</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>47</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A qualidade da água potável é garantida pelas empresas de saneamento brasileiras através do cumprimento à Portaria N° 2.914, de 12 de dezembro de 2011, do Ministério da Saúde. Este instrumento legal dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano, estabelecendo um padrão de potabilidade a ser controlado por laboratórios próprios, conveniados ou subcontratados. Entre as substâncias químicas que representam risco à saúde e devem ter sua concentração monitorada, está o mercúrio. No Rio Grande do Sul, o Laboratório Central de Águas da Companhia Riograndense de Saneamento (CORSAN) é o responsável pela determinação de mercúrio na água captada e tratada pela empresa. As análises são realizadas empregando-se uma metodologia analítica que atende às normas internacionais, o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Métodos Padrão para Inspeção de Águas e Águas Residuais) de autoria das instituições americanas: Associação Americana de Saúde Pública (APHA), Associação Americana de Trabalhos em Água (AWWA) e Federação Ambiental da Água (WEF), o qual, no decorrer do texto, será referido apenas como *Standard Methods*. Para um monitoramento que atenda a frequência semestral estabelecida na Portaria 2.914/11, o Laboratório Central de Águas da CORSAN executa o ensaio de mercúrio pela técnica da Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Vapor Frio (CV AAS) em aproximadamente 4.320 amostras anuais, de água bruta superficial e subterrânea, água tratada e da rede de distribuição da CORSAN.

O mercúrio é um elemento potencialmente tóxico à saúde humana. Considerando a toxicidade, a busca pela redução dos resíduos gerados, tanto na indústria como nos laboratórios químicos, atualmente representa um grande desafio para as pesquisas. Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho é validar o método analítico utilizado pelo laboratório da CORSAN, para a determinação de mercúrio, reduzindo o volume da alíquota das amostras de 100 mL, indicado pelo *Standard Methods*, para 20 mL. Esta redução resulta em uma economia no consumo de reagentes e na quantidade de resíduos gerados (que serão posteriormente tratados), ambos reduzidos proporcionalmente ao volume de amostra. Além da redução de custos referente aos reagentes e ao tratamento de resíduos, a capacidade analítica aumenta, pois é possível ampliar o número de amostras

digeridas simultaneamente, sob as mesmas condições, o que, conseqüentemente, melhora, também, a homogeneidade do ensaio, principalmente na etapa de preparo das amostras.

A validação do método será evidenciada pela avaliação dos resultados experimentais obtidos para os seguintes parâmetros: exatidão entre os métodos, seletividade, linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão (compreendendo repetibilidade e reprodutibilidade), exatidão (através de ensaios de recuperação), e estimativa da incerteza de medição (envolvendo o estudo formal de repetibilidade e reprodutibilidade).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Este trabalho teve como objetivo geral validar o método analítico para a determinação de mercúrio em águas pela técnica de CV AAS, utilizando um volume de amostra de 20 mL.

### **2.2 Específicos**

i) comprovar estatisticamente a semelhança entre os resultados obtidos pelo método proposto (20 mL de amostra) frente ao método normalizado (100 mL de amostra);

ii) avaliar a interferência da matriz da amostra, a linearidade, os limites de detecção e de quantificação, a precisão e a exatidão do método ao utilizar o volume proposto;

iii) estimar a incerteza de medição associada aos resultados obtidos com o volume reduzido de amostra;

iv) comparar os custos das análises pelos dois métodos.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Compostos contendo mercúrio

O mercúrio é um metal de transição, de número atômico 80 e massa 200,59, que apresenta valências +1 e +2. Está presente na natureza em várias formas químicas: metálico (Hg), sais inorgânicos, e também na forma orgânica, sendo a principal ocorrência na forma do minério HgS (Cinábrio).<sup>1</sup> Na água, são frequentemente encontradas as espécies  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^0$  e complexos estáveis com ligantes orgânicos. Em sedimentos contendo sulfetos, o mercúrio inorgânico pode ser metilado a dimetilmercúrio,  $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ , uma forma potencialmente tóxica acumulada nos peixes que podem, por sua vez, causar prejuízo à saúde humana quando consumidos.

A abundância média de mercúrio na crosta terrestre é de  $0,09 \text{ mg kg}^{-1}$ ; nos solos é de 30 a  $160 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ ; nas águas é de  $0,07 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  e nas águas subterrâneas é de 0,5 a  $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ .<sup>1</sup> Mason et al. descreveu o ciclo do mercúrio, destacando a interferência humana como principal fonte de emissões causadoras do desequilíbrio entre o mercúrio presente nos oceanos e na atmosfera.<sup>2</sup>

O metal é utilizado, principalmente, no preparo de amálgamas dentárias e em instrumentos de medida (termômetros, barômetros e manômetros). A exposição humana a altos níveis de mercúrio causa danos no sistema imunológico, cérebro, coração, rins e pulmões.<sup>1-3</sup>

Tendo em vista os riscos à saúde oferecidos pelo mercúrio e seus compostos, o Ministério da Saúde estabelece como Valor Máximo Permitido (VMP) de mercúrio a concentração de  $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  na água potável.<sup>4</sup> Já nos Estados Unidos, de acordo com a Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA), o limite máximo permitido de mercúrio na água para consumo humano é de  $2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ .<sup>3</sup>

#### 3.2 Métodos para a determinação de mercúrio

Para a determinação de mercúrio em águas, CV AAS é a técnica mais indicada e recomendada pelo *Standard Methods*, tendo a Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS) como método alternativo.<sup>1</sup> Esta

técnica embora mais sensível, possui elevado custo relativo ao equipamento e consumo de gás.

Nos últimos anos, a utilização de métodos mais rápidos e que não exijam preparo prévio das amostras, vem sendo descrita em trabalhos científicos envolvendo a determinação de mercúrio em amostras ambientais. Analisadores portáteis de mercúrio foram avaliados por Kelly et al. para análise de solos contaminados e plantas, demonstrando precisão e exatidão adequadas, e similaridade aos resultados obtidos por CV AAS e ICP-OES.<sup>5</sup> Ferreira et al., em uma revisão recente da literatura, citam o emprego da Análise Direta de Mercúrio (DMA) para a quantificação de mercúrio em alimentos, com a principal vantagem de eliminar o uso de reagentes químicos.<sup>6</sup> Estes analisadores utilizam decomposição térmica para a dessorção e atomização do mercúrio presente na amostra, que é varrido para a célula analítica através do ar ambiente e quantificado por AAS.<sup>5-6</sup>

Leiva et al. comparou a Decomposição Térmica, seguida de Amalgamação e detecção por Espectrometria de Absorção Atômica (TD AAS), um sistema de medição integrado para análise direta da amostra que elimina os erros introduzidos durante o pré-tratamento, com a técnica de CV AAS. Obteve resultados semelhantes pelas duas técnicas, para amostras de solo, apresentando a primeira como ambientalmente correta devido à redução do consumo de reagentes e resíduos gerados.<sup>7</sup>

Para outras amostras, como mel, sangue, urina e tecidos animais, a técnica mais utilizada também é a CV AAS, aparecendo sempre como uma técnica consolidada por normas internacionais para diferentes matrizes. Desta forma, a CV AAS comumente é utilizada em estudos comparativos frente a outras técnicas utilizadas para a determinação de mercúrio. Palmer et al. usou ICP-MS para amostras de sangue<sup>8</sup> e Vieira et al. usou DMA para quantificar este elemento em amostras de mel,<sup>9</sup> comparando estas técnicas com CV AAS. Ribeiro et al. validou a técnica de DMA para o uso em determinações de mercúrio em tecidos animais.<sup>10</sup>

A aplicação da técnica de CV AAS requer um minucioso preparo das amostras, exigindo que sejam previamente digeridas em meio oxidante, para que todas as espécies de mercúrio presentes sejam convertidas a  $\text{Hg}^{2+}$ . Este tratamento prévio se faz necessário, pois o mercúrio orgânico não é reduzido pelo cloreto estano em na etapa imediatamente anterior às determinações, podendo levar a resultados inferiores.<sup>1</sup>

### 3.2.1 Espectrometria de Absorção Atômica

A espectrometria de absorção atômica (AAS) teve início em 1955 com os estudos de Walsh, na Austrália, e de Alkemade e Milatz, na Holanda. Em 1959 surgiu o primeiro espectrômetro comercial, e hoje o método analítico é amplamente empregado para a quantificação de inúmeros elementos químicos, principalmente metais.<sup>11</sup> A Espectrometria de Absorção Atômica divide-se em três técnicas essenciais: AAS com Chama (F AAS), AAS com Forno de Grafite (GF AAS) e AAS com Geração de Vapor Químico (CVG AAS). Dentre as técnicas de CVG AAS pode-se citar a AAS com Geração de Hidretos (HG AAS) e a AAS com Geração de Vapor Frio (CV AAS).

Determinações por AAS requerem que o analito esteja em fase gasosa, sendo a atomização uma etapa crítica, determinante para a precisão e a exatidão do método, na qual ocorre a volatilização do analito, convertendo-o em átomos na fase gasosa. Após a atomização, uma radiação monocromática de comprimento de onda específico, proveniente de uma fonte externa, incide sobre o analito atomizado, sendo absorvida e sofrendo uma atenuação que é diretamente proporcional à quantidade de átomos presentes.<sup>12</sup>

Esta absorção se deve às interações entre os fótons e os átomos. A absorbância  $A$  do meio é definida pela equação 1:

$$A = \log \frac{P_0}{P} \quad (1)$$

Onde " $P_0$ " é a potência inicial e " $P$ " é a potência transmitida após o feixe de radiação passar através do meio que contém o analito.<sup>13</sup>

A absorbância está relacionada à concentração das espécies absorventes pela equação 2, conhecida como Lei de Beer:

$$A = abc \quad (2)$$

Onde " $a$ " é a absorvidade ( $L \text{ g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), " $b$ " é o comprimento do caminho óptico (cm) e " $c$ " é a concentração ( $\text{g L}^{-1}$ ).

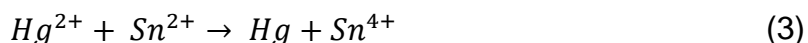
Nos equipamentos de AAS, a radiação provém da lâmpada de cátodo oco, que possui um ânodo de tungstênio e um cátodo cilíndrico composto pelo metal do analito, selado em um tubo de vidro contendo um gás inerte (argônio ou neônio). O gás ioniza quando uma tensão de aproximadamente 300 V é aplicada, gerando uma corrente com a migração de íons para os eletrodos. Os cátions de argônio

(neônio) chocam-se contra o cátodo, desalojando átomos do metal. Alguns desses átomos encontram-se no estado excitado e emitem comprimento de onda característico ao retornar ao estado fundamental, reduzindo o risco de interferências espectrais, pois a sobreposição de linhas de outros elementos é dificultada. Após a interação com o analito, essa radiação atenuada entra em um monocromador, que tem a função de isolar a linha de interesse. O detector (tubo fotomultiplicador), por sua vez, mede a potência final do feixe, convertendo-a em um sinal elétrico que é processado e enviado para um computador. O analista então, visualiza no sistema computacional uma resposta em absorvância e, através da construção de uma curva de calibração, pode relacioná-la com a concentração. Assim, a quantificação do analito nas amostras é efetuada, frente aos padrões de concentração conhecida.<sup>11</sup>

### 3.2.2 Espectrometria de Absorção Atômica por geração de Vapor Frio - CV AAS

Dentre as técnicas de AAS, a CV AAS é uma das mais utilizadas, e apropriadas, para a determinação de mercúrio. Na CV AAS, a amostra é introduzida na forma líquida e o analito é convertido à fase gasosa através de uma reação química apropriada. Diferentemente das demais técnicas, a CV AAS não necessita de aquecimento na etapa de atomização. Isso se deve ao fato de o mercúrio ser o único elemento com uma pressão de vapor apreciável a temperatura ambiente. Esta característica também diferencia a técnica em relação à Geração de Hidretos (HG AAS), na qual hidretos voláteis são inicialmente formados por uma reação química, para posteriormente, sob aquecimento, gerarem, o vapor atômico do analito.

A reação utilizada para a geração química de vapor frio de mercúrio baseia-se na redução do mercúrio inorgânico  $Hg^{2+}$  pelo cloreto estano em meio ácido, conforme descrito pela equação 3:



Alternativamente, o mercúrio pode ser gerado a partir da reação com o boro-hidreto de sódio.<sup>14</sup>

Além da forma inorgânica, o mercúrio também está presente na natureza na forma orgânica, que não é reduzida pelo cloreto estano, tornando indispensável o tratamento prévio das amostras por digestão, para evitar resultados inferiores nas determinações.<sup>15</sup>

### 3.3 Validação de Métodos Analíticos

Padrões cada vez mais elevados de qualidade são exigidos nas indústrias e empresas a nível mundial, bem como nas brasileiras. Neste contexto, sistemas de Controle de Qualidade são indispensáveis para a confiabilidade analítica quando se trata de ensaios que comprovem a qualidade dos produtos oferecidos por estas empresas. Laboratórios que possuam seus sistemas de Garantia da Qualidade implementados utilizam-se de métodos normalizados, aceitos como confiáveis pelos órgãos acreditadores. No Brasil, a competência dos laboratórios para a realização de ensaios é avaliada em auditorias pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), através da norma 17025, publicada pela Organização Internacional de Padronização conjuntamente com a Comissão Eletrotécnica Internacional (ISO/IEC).

A confiabilidade de um laboratório está relacionada com a escolha de seus métodos analíticos. Métodos reconhecidos, como os descritos nas normas USEPA e *Standard Methods*, são aceitos internacionalmente, porém quando modificados, devem ser validados com o objetivo de confirmar que sejam apropriados para o uso pretendido.<sup>16-17</sup>

A validação envolve estrutura adequada (padrões rastreáveis, controle de temperatura, higiene, segurança, formação dos analistas), não existindo um modelo a ser seguido.<sup>18</sup> Pela própria definição, conforme o Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM), a validação é uma "verificação na qual os requisitos especificados são adequados para um uso pretendido"<sup>19</sup>, devendo ficar a critério do laboratório os requisitos a serem avaliados, tendo sempre como parâmetros básicos a exatidão e a precisão da metodologia.

O INMETRO disponibiliza um documento orientativo sobre a validação de métodos analíticos, indicando os parâmetros que devem ser avaliados, conforme o tipo de ensaio. Para análise de elementos traço (concentrações inferiores a 0,01%), são recomendados: precisão, seletividade, recuperação, robustez, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação.<sup>20</sup> Albano apresenta, em recente obra, um guia abordando conceitos e aplicações práticas dos principais parâmetros requeridos como evidência da validação de ensaios, introduzindo a necessidade da estimativa da incerteza de medição do método.<sup>21</sup> A seguir são discutidos, individualmente, os parâmetros de validação avaliados neste trabalho.



### 3.3.1 Exatidão – Método normalizado x Método não normalizado

A exatidão avalia o grau de concordância entre o resultado medido e o valor de referência, aceito como verdadeiro por convenção. Pode ser determinada através da comparação dos resultados obtidos através de um método normalizado com os de um método não normalizado, a ser validado. Para isso, são estipuladas hipóteses do teste-t, onde a hipótese nula ( $H_0$ ) supõe a igualdade entre os métodos, e a hipótese alternativa ( $H_1$ ) supõe que eles são significativamente diferentes. Para que a hipótese nula seja estatisticamente aceita, o valor de t calculado deve ser menor que o valor de t tabelado. As equações 4 e 5 demonstram os cálculos a serem realizados para obter o valor t que deve ser comparado ao valor tabelado<sup>21</sup>:

$$E_{med} = \frac{S_d}{\sqrt{n}} \quad (4)$$

Onde " $E_{med}$ " é o erro da média dos desvios, " $S_d$ " é o desvio padrão entre as diferenças dos resultados obtidos pelos dois métodos e " $n$ " é o número de amostras analisadas.

$$t_{calculado} = \frac{\bar{d}}{E_{med}} \quad (5)$$

Onde " $\bar{d}$ " é a média das diferenças dos resultados obtidos pelos dois métodos.

### 3.3.2 Seletividade

A seletividade de um método está relacionada com a distinção da resposta do analito perante outros componentes presentes na amostra. Testes de seletividade garantem a detecção do analito de interesse, sem que a medição seja alterada por interferência da matriz da amostra. Nos casos em que somente há disponibilidade da amostra sem o analito, aplica-se o teste F para verificar se as variâncias de dois grupos, um com a matriz e outro sem, podem ser consideradas iguais.<sup>20-21</sup>

### 3.3.3 Linearidade

A linearidade de um método analítico demonstra a sua capacidade em gerar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de uma determinada faixa.<sup>21</sup> O coeficiente de determinação ( $r^2$ ) é um parâmetro da curva de calibração utilizado como critério de aceitação, devendo ser maior que 0,99 para que o método seja considerado linear. Além disso, os resíduos podem ser plotados em um gráfico para que possam ser analisados quanto a sua aleatoriedade. São conhecidos como resíduos, as diferenças entre os valores medidos e os valores esperados, ou seja, a diferença entre a concentração de cada ponto, calculada através da regressão linear, e a concentração em que o padrão foi preparado (valor convencional).

O sinal analítico obtido compõe o eixo das ordenadas na representação da curva de calibração, enquanto a concentração da solução padrão compõe o eixo x, seguindo o modelo matemático descrito pela equação 6:

$$A_{int} = a \times Conc + b \quad (6)$$

Onde " $A_{int}$ " é a absorvância medida, " $a$ " é a inclinação da curva de calibração (coeficiente angular), " $Conc$ " é a concentração do analito e " $b$ " é a interseção com o eixo y (coeficiente linear). A linearidade do método é observada pelo coeficiente de determinação ( $r^2$ ), que indica o grau de relação entre as variáveis e quanto mais próximo de um, maior a dependência linear entre elas. O Teste de Grubbs é usualmente aplicado para avaliar pontos extremos de variabilidade aleatória, conhecidos como *outliers*, que possam ser desconsiderados por diferirem dos demais dados de um conjunto.

### 3.3.4 Limite de detecção e de quantificação

O Limite de Detecção do Equipamento (LDE) corresponde a concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes a razão sinal/ruído do equipamento e é determinado pelas respostas obtidas por leituras de brancos. Na prática, se utiliza o Limite de Detecção do Método (LDM), que é o menor valor detectável com uma precisão aceitável, correspondendo à concentração do analito medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que esta

concentração é maior que zero. O LDM é determinado a partir da análise de brancos contendo o analito.

Limite de Quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada com exatidão e precisão aceitáveis, correspondendo ao valor do branco com o analito mais 5, 6 ou 10 desvios-padrão.<sup>20-21</sup>

### 3.3.5 Exatidão

É o grau de concordância entre o valor medido e o valor verdadeiro de um mensurando. Pode ser medida pela taxa de recuperação do analito em uma matriz fortificada com uma quantidade conhecida do mesmo, ou pela análise de uma amostra de concentração conhecida e comparação com o valor verdadeiro.<sup>21</sup> A exatidão pode ser definida como a tendência em apresentar resultado maior ou menor que o valor real, estando relacionada à existência de erro sistemático. Este tipo de erro é importante na identificação de problemas instrumentais, nas metodologias e/ou resultantes da falta de treinamento dos analistas.<sup>11</sup>

### 3.3.6 Precisão (repetibilidade e reprodutibilidade)

A repetibilidade avalia o grau de concordância entre os resultados medidos utilizando-se o mesmo equipamento, o mesmo analista e as mesmas condições, em um curto espaço de tempo.<sup>21</sup> O coeficiente de variação (CV) é normalmente utilizado para avaliar a repetibilidade, sendo calculado em função do desvio-padrão e da média, através da equação 7:

$$CV (\%) = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Média}} \times 100 \quad (7)$$

Para análises repetidas efetuadas em um material de referência ou material fortificado, a equação de Horwitz é usada para analisar se a repetibilidade é satisfatória<sup>22</sup>:

$$CV_{\text{máx}} = 2^{(1-0,5 \log C)} \quad (8)$$

Onde "  $CV_{\text{máx}}$  " é o coeficiente de variação máximo (coeficiente de Horwitz), em porcentagem, e "  $C$  " é a concentração do analito em  $\text{g g}^{-1}$ . A repetibilidade é considerada satisfatória quando o CV, calculado pela equação 7, é menor que o  $CV_{\text{máx}}$ , calculado pela equação 8.

A reprodutibilidade avalia o grau de concordância entre os resultados medidos sob condições variadas, sendo avaliada por comparações interlaboratoriais. Quando estudada por um único laboratório, a reprodutibilidade é denominada precisão intermediária e as condições a serem variadas podem ser, por exemplo, equipamentos, analistas ou condições ambientais diferentes.<sup>21</sup>

### 3.3.7 Estudo formal de repetibilidade e reprodutibilidade

Conhecido como estudo da média e da amplitude, tem o objetivo de decompor as parcelas de variabilidade devido à Repetibilidade e à Reprodutibilidade, tendo importante contribuição na estimativa da incerteza de medição.<sup>21-23</sup>

Diferentes amostras e diferentes analistas são necessários para o estudo. Após a execução dos ensaios, uma sequência de cálculos é efetuada com o objetivo de conhecer o índice R&R, que determina se o sistema de medição é adequado, considerando a variabilidade do processo. Conhecendo a amplitude entre as médias das médias dos analistas ( $R_o$ ), a amplitude média entre os analistas ( $R_e$ ) e a amplitude entre as amostras ( $R_a$ ), inicialmente se determina a variabilidade da repetitividade ( $\sigma_{repe}$ ), pela equação 9:

$$\sigma_{repe} = \frac{R_e}{d_2} \quad (9)$$

Onde  $d_2$  é um valor tabelado, relacionado à amplitude das amostras, que leva em consideração o número de repetições e o número de amostras multiplicado pelo número de analistas.

Com o valor de  $\sigma_{repe}$  é possível calcular a variação da repetitividade ( $VE$ ), pela equação 10:

$$VE = 5,15 \times \sigma_{repe} \quad (10)$$

Onde 5,15 é o número de desvios-padrão ( $\pm 2,575$  desvios-padrão da média) que contém 99% dos dados em uma distribuição normal.

Sabendo-se o valor de  $\sigma_{repe}$ , determina-se a variabilidade da reprodutibilidade ( $VO$ ), pela equação 11:

$$VO = \sqrt{\left(5,15 \times \frac{R_o}{d_2}\right)^2 - \frac{(5,15 \times \sigma_{repe})^2}{nr}} \quad (11)$$

Onde  $d_2$  é novamente um valor tabelado (agora levando em consideração o número de repetições e o número de analistas para uma mesma amostra) e  $nr$  é o número de repetições (número de amostras multiplicado pelo número de replicatas).

Com o valor de  $VO$ , determina-se o desvio da reprodutibilidade ( $\sigma_{repro}$ ), pela equação 12:

$$\sigma_{repro} = \frac{VO}{5,15} \quad (12)$$

Agora, com os valores de  $VE$  e  $VO$ , a variação de  $R\&R$  é determinada através da equação 13:

$$R\&R = \sqrt{VE^2 + VO^2} \quad (13)$$

As contribuições da repetitividade e da reprodutibilidade são calculadas, respectivamente, pelas equações 14 e 15:

$$\text{Contribuição da Repe (\%)} = \frac{VE^2}{R\&R^2} \quad (14)$$

$$\text{Contribuição da Repe (\%)} = \frac{VO^2}{R\&R^2} \quad (15)$$

Para encontrar o valor percentual de  $R\&R$ , ainda é necessário conhecer a variação das amostras determinada pela equação 17 após o cálculo do desvio das amostras (equação 16), para que possa ser aplicada na equação 18, que fornece a variação total.

$$\text{Desvio das amostras} = \frac{R_a}{d_2} \quad (16)$$

$$VA = \text{Desvio das amostras} \times 5,15 \quad (17)$$

$$VT = \sqrt{R\&R^2 + VA^2} \quad (18)$$

Finalmente, o percentual de  $R\&R$  pode ser determinado pela equação

$$R\&R (\%) = 100 \times \frac{R\&R}{VT} \quad (19)$$

Como critérios de aceitação para o R&R(%), valores até 10% são ideais, entre 10 e 30% são aceitáveis e acima de 30% são inaceitáveis.<sup>21-23</sup>

### 3.3.8 Incerteza de medição

É a dúvida remanescente associada ao resultado da medição que caracteriza uma faixa de dispersão dos valores atribuídos ao mensurando.<sup>24</sup> Esta faixa abrange uma grande fração da distribuição de valores com um determinado nível de confiança que corresponda à realidade do método. Diversos componentes contribuem para a incerteza de medição, sendo estimados com base na distribuição estatística de desvios-padrão de resultados experimentais.

## 4 PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 Materiais e reagentes

Os frascos contendo as amostras, os balões volumétricos e toda a vidraria utilizada no preparo das soluções, na digestão das amostras e durante o ensaio, foram previamente lavados e descontaminados. Inicialmente, o material foi imerso em um banho de detergente neutro (EXTRAN<sup>®</sup>) 0,05% (v/v) por 12 horas e, posteriormente, enxaguado e imerso em outro banho de ácido nítrico 50% em água ultrapura (v/v), por outras 12 horas. Finalmente, foram enxaguados com água ultrapura em excesso e secos.

As soluções padrão aquosas utilizadas foram preparadas a partir de diluições adequadas de uma solução estoque de 1000 mg L<sup>-1</sup> de mercúrio Merck em ácido nítrico 1% (v/v).

### 4.2 Preparo das amostras

As amostras foram retiradas do local de armazenamento (câmara fria). Após atingirem a temperatura de trabalho ( $20 \pm 6$  °C), foram medidos 20 mL, com pipeta calibrada, de cada amostra e transferidos para tubos de vidro adequados. A cada tubo foi adicionado: 1 mL de ácido sulfúrico pobre em metais, 0,5 mL de ácido nítrico pobre em metais, 3 mL de permanganato de potássio 5% (m/v), e 1,6 mL de persulfato de potássio 5% (m/v). Os tubos foram fechados com tampas de vidro e levados ao banho-maria, onde a digestão foi realizada a uma temperatura controlada de  $95 \pm 3$  °C por duas horas. Os padrões para a curva de calibração, bem como todas as soluções estudadas, foram submetidos a este procedimento.

No momento da análise, foi adicionado 1,6 mL de cloridrato de hidroxilamina 10% (m/v). Esta adição é necessária para reagir com o excesso de KMnO<sub>4</sub>, pois durante a redução, cloretos são transformados em cloro livre, que absorve no comprimento de onda de 253,7 nm.

Os procedimentos acima descritos referem-se ao uso do volume de amostra proposto pela validação. O método normalizado (*Standard Methods*) descreve um volume maior de amostra, de 100 mL, portanto cada reagente adicionado tem o volume também multiplicado por cinco. Assim, para a exatidão entre os métodos, foram medidas amostras nos dois volumes (20 e 100 mL) para

fins de comparação. Para os demais testes, todas as alíquotas de amostra foram de 20 mL.

A redução a mercúrio metálico na forma de vapor ocorreu pela reação com cloreto estano 10% (v/v) em meio ácido a uma taxa de aspiração das soluções de 1 mL min<sup>-1</sup>.

### 4.3 Equipamentos

As amostras e os padrões foram digeridos em banho-Maria modelo 40T/5F (DMG, Brasil). A água utilizada nos ensaios é de alta pureza, classificada como água do Tipo I, isenta de partículas, íons e microorganismos. produzida a partir da água potável pelo equipamento modelo Integral (Milli-Q®, França).

A determinação de mercúrio nas amostras foi realizada utilizando-se um espectrômetro de absorção atômica modelo SpectrAA 240 FS (Varian, Austrália), equipado com acessório gerador de vapor, modelo VGA-76 (Varian, Austrália). A lâmpada de cátodo oco operou com corrente de 4 mA, emitindo radiação no comprimento de onda de 253,7 nm e uma lâmpada de deutério foi usada como corretor de fundo. Nitrogênio com pureza de 99,999% foi utilizado como gás de arraste (IBG, São Paulo, Brasil), com uma vazão de 2 L min<sup>-1</sup>.

### 4.4 Validação

#### 4.4.1 Exatidão - Método normalizado x Método não normalizado

A exatidão do método a ser validado, com o uso de 20 mL de amostra, foi determinada pela comparação com o método normalizado que descreve o uso de 100 mL de amostra. Foram preparadas 12 amostras para cada um dos volumes, sob as mesmas condições. Devido à ausência do analito, cada amostra foi previamente fortificada, em balão volumétrico, através da adição de 250 µL de uma solução de 1 mg L<sup>-1</sup> de mercúrio, para obter concentrações de 0,50 µg L<sup>-1</sup>. As medições ocorreram, posteriormente, em triplicata, no mesmo dia, pelo mesmo analista.

#### 4.4.2 Seletividade

Foram preparados dois grupos, cada um contendo 7 amostras, um sem a matriz e o outro com, para cada nível de concentração (0,40 µg L<sup>-1</sup>, 1,00 µg L<sup>-1</sup> e



2,00  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). As medidas foram feitas, posteriormente, em triplicata, no mesmo dia, pelo mesmo analista. Os resultados foram avaliados através do teste F, por comparação com o valor de F tabelado, para verificar se as variâncias das amostras podem ser consideradas estatisticamente iguais:

$$F_{\text{calculado}} = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (20)$$

Onde " $s_1^2$ " é a maior variância média, obtida para um grupo de amostras, e " $s_2^2$ " é a menor variância média, obtida para o outro grupo.

#### 4.4.3 Linearidade

A faixa linear estudada, de 0,40 a 4,00  $\mu\text{g L}^{-1}$ , compreende a faixa de trabalho do laboratório (0,40 a 2,00  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), para a qual a curva de calibração é preparada diariamente. Na rotina, o nível inferior corresponde a concentração do analito de 0,40  $\mu\text{g L}^{-1}$ , próxima ao limite de quantificação, e o nível superior (2,00  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) da curva analítica corresponde ao dobro do valor máximo de mercúrio permitido na água tratada, segundo a Portaria 2914.

A curva analítica foi construída utilizando padrão de mercúrio, obtendo-se o sinal de resposta em área de pico - absorvância integrada ( $A_{int}$ ) como função da concentração do analito (em  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Primeiramente, a partir de uma solução estoque de 1000  $\text{mg L}^{-1}$ , foram preparadas soluções intermediárias de 10 e 0,10  $\text{mg L}^{-1}$  de mercúrio e então, a partir de diluições da solução de 0,10  $\text{mg L}^{-1}$ , foram preparadas as seguintes concentrações: 0,40; 0,70; 1,00; 2,00; 3,00 e 4,00  $\mu\text{g L}^{-1}$ . As seis concentrações foram analisadas cada uma em triplicata.

#### 4.4.4 Limite de detecção e de quantificação

O limite de detecção do método (LDM) e o limite de quantificação (LQ) foram determinados pela análise de 7 amostras de branco contendo o analito. Para isto, adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de uma solução de mercúrio 0,05  $\text{mg L}^{-1}$  em água ultrapura a balões volumétricos de 50 mL, obtendo-se soluções com concentrações de 0,20  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

#### 4.4.5 Exatidão

A exatidão do método que utiliza 20 mL de amostra também foi avaliada através da realização de ensaios de recuperação, que refletem a

quantidade do analito recuperada no processo, em relação a quantidade real presente. Quantidades conhecidas do analito foram adicionadas (*spike*) a cinco diferentes amostras para se obter concentrações próximas ao LQ ( $0,50 \mu\text{g L}^{-1}$ ), analisadas em um dia, e ao centro da faixa de trabalho ( $1,00 \mu\text{g L}^{-1}$ ), analisadas em outro dia.

#### 4.4.6 Precisão (repetibilidade e reprodutibilidade)

A repetibilidade foi determinada pela análise de um conjunto de sete amostras de água reagente (água ultrapura com 0,2% de ácido nítrico, mesma concentração das amostras para preservação a pH menor que 2) fortificadas com o analito em três concentrações diferentes ( $0,50$ ;  $1,00$  e  $1,50 \mu\text{g L}^{-1}$ ), por três dias dentro da mesma semana.

A reprodutibilidade foi determinada por dois analistas, cada um analisando, em dias diferentes, dois conjuntos de sete amostras de água reagente, fortificadas com o analito nas mesmas concentrações utilizadas para a repetibilidade ( $0,50$ ;  $1,00$  e  $1,50 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

#### 4.4.7 Estudo formal de repetibilidade e reprodutibilidade

Além dos testes de repetibilidade e reprodutibilidade demonstrados no item 4.4.6 deste trabalho, determinados isoladamente, foi executado o estudo formal.

Como o analito não é detectado nas amostras analisadas na rotina do laboratório, o estudo iniciou com a fortificação de 200 mL de 5 diferentes amostras com 2 mL de uma solução  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ , para a obtenção de uma concentração final de  $0,50 \mu\text{g L}^{-1}$  de mercúrio. Diferentes analistas (1 e 2) executaram o ensaio em triplicata para cada uma das amostras. As leituras foram realizadas no mesmo dia, porém cada analista preparou suas amostras e otimizou o equipamento antes de suas leituras.

#### 4.4.8 Incerteza de medição

O cálculo de incerteza consistiu na definição das componentes e suas transformações em incertezas padrão, utilizando o divisor adequado, relacionado a sua distribuição de probabilidade. Como fontes relevantes de incerteza para o ensaio, foram considerados: a concentração da solução padrão de mercúrio utilizada

para a construção da curva de calibração e suas diluições (provenientes do volume medido, do posicionamento do menisco e da dilatação volumétrica), a repetibilidade e a reprodutibilidade, a incerteza do equipamento e a incerteza da curva de calibração.

Todos os parâmetros estatísticos, como médias, variâncias, desvios-padrão e coeficientes de variação, foram calculados com o auxílio de *software* para o tratamento dos dados obtidos experimentalmente (MICROSOFT EXCEL 2013). Os valores demonstrados nas tabelas, para estes parâmetros, foram arredondados de acordo com a expressão dos resultados experimentais.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Exatidão - Método normalizado x Método não normalizado

Os resultados obtidos para a comparação da exatidão entre o método normalizado, que utiliza 100 mL de amostra, e o método a ser validado, que utiliza 20 mL, encontram-se na tabela 1.

Tabela 1 - Concentrações do analito obtidas para diferentes volumes de amostra.

Pares de amostras	Volume: 20 mL	Volume: 100 mL	d*
	Resultados ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Resultados ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	
1	0,46	0,47	-0,01
2	0,47	0,48	-0,01
3	0,47	0,47	0,00
4	0,42	0,40	0,02
5	0,43	0,43	0,00
6	0,43	0,42	0,01
7	0,41	0,41	0,00
8	0,44	0,44	0,00
9	0,42	0,43	-0,01
10	0,43	0,40	0,03
11	0,42	0,41	0,01
12	0,44	0,41	0,03
		$S_d^{**}$	0,014
		$\bar{d}^{***}$	0,006

\* d é a diferença entre os resultados obtidos pelo método que utiliza 20 mL de amostra e o método que utiliza 100 mL;  $^{**}S_d$  é o desvio-padrão entre as diferenças dos resultados obtidos pelos dois métodos;  $^{***}\bar{d}$  é a média das diferenças dos resultados.

Os cálculos para fins de comparação entre os métodos, utilizando os dados da tabela 1, foram executados segundo as equações 4 e 5, para 11 graus de liberdade e 95% de confiança, obtendo-se um valor de  $t_{\text{calculado}}$  igual a 1,4. O valor de  $t_{\text{tabelado}}$  para os mesmos graus de liberdade, com a mesma confiança, é 2,2.

Sendo o valor de  $t_{\text{calculado}}$  obtido a partir dos resultados experimentais, menor que o valor de  $t_{\text{tabelado}}$ , conclui-se que o uso de 20 mL de amostra (método a

validar) não produz resultados significativamente diferentes dos resultados obtidos pelo método que utiliza 100 mL de amostra (método normalizado).

## 5.2 Seletividade

Os resultados, para as duas curvas, com e sem adição de matriz, encontram-se nas tabelas 2 e 3. Cada ponto foi medido em triplicata e nas tabelas são demonstrados os valores das médias das absorvâncias lidas.

Tabela 2 - Respostas do analito nas soluções padrão sem matriz.

Replicata	Absorvâncias médias para cada nível de concentração		
	0,40 µg L <sup>-1</sup>	1,00 µg L <sup>-1</sup>	2,00 µg L <sup>-1</sup>
1	0,0319	0,0928	0,2146
2	0,0314	0,0947	0,2150
3	0,0339	0,0878	0,2245
4	0,0298	0,0967	0,2050
5	0,0325	0,0944	0,2169
6	0,0321	0,0920	0,2195
7	0,0320	0,0981	0,2205
<b>Variância</b>	1,51x10 <sup>-6</sup>	1,14x10 <sup>-5</sup>	3,79x10 <sup>-5</sup>
<b>Média</b>	0,0319	0,0938	0,2166
<b>Desvio-padrão</b>	0,0012	0,0034	0,0062

Tabela 3 - Respostas do analito nas soluções padrão adicionadas na matriz.

Replicata	Absorvâncias para cada nível de concentração		
	0,40 µg L <sup>-1</sup>	1,00 µg L <sup>-1</sup>	2,00 µg L <sup>-1</sup>
1	0,0370	0,1053	0,2227
2	0,0390	0,1115	0,2306
3	0,0396	0,1103	0,2305
4	0,0392	0,1109	0,2314
5	0,0397	0,1123	0,2293
6	0,0392	0,1128	0,2257
7	0,0417	0,1205	0,2356
<b>Variância</b>	1,90x10 <sup>-6</sup>	2,04x10 <sup>-5</sup>	1,73x10 <sup>-5</sup>
<b>Média</b>	0,0393	0,1119	0,2294
<b>Desvio-padrão</b>	0,0014	0,0045	0,0042

Partindo-se dos dados das tabelas 2 e 3, os cálculos foram executados segundo a equação 20, na qual foram aplicadas as variâncias médias entre as três concentrações. Neste caso,  $s_1^2 = 1,69 \times 10^{-5}$ , proveniente da médias das variâncias das soluções padrão sem matriz, e  $s_2^2 = 1,32 \times 10^{-5}$ , proveniente da médias das variâncias das soluções padrão adicionadas na matriz, obtendo-se um  $F_{\text{calculado}}$  de 1,284.

O F tabelado para 6 graus de liberdade (n-1) tanto no numerador quanto no denominador, e para um nível de confiança de 95% é de 4,284. Uma vez que o valor de F calculado foi menor que o valor tabelado, é possível afirmar que as variâncias dos grupos de amostras analisados, sem e com a matriz, podem ser consideradas estatisticamente iguais. Desta forma, pode-se dizer que a matriz não tem um efeito sobre a precisão do método na faixa de concentração utilizada, não afetando o resultado do ensaio.

### 5.3 Linearidade

O Teste de Grubbs foi aplicado para a avaliação de pontos extremos (*outliers*), que podem ser excluídos nos casos em que diferem estatisticamente dos demais. Para o cálculo do valor de G, foi utilizada a equação 21:

$$G = \frac{g_i - \bar{g}}{s} \quad (21)$$

Onde "G" é o valor de Grubbs calculado, " $g_i$ " é o valor do possível *outlier*, " $\bar{g}$ " é a média do conjunto de dados investigados e "s" é o desvio-padrão desses dados. Um *outlier* é evidenciado por um valor de G maior que o valor de  $G_{\text{tabelado}}$  para o nível de significância escolhido.

O sinal analítico obtido para as três replicatas de cada ponto da curva de calibração e as concentrações correspondentes estão expressos na tabela 4, bem como o valor de G calculado para cada ponto.

Tabela 4 - Respostas do analito para a construção da curva de calibração e cálculo dos resíduos.

Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Absorbância Integrada (s)	Valor de $G$ (Teste de Grubbs)	Absorbância Prevista	Resíduos	CV* das Absorbâncias (%)
0,4	0,0429	1,119	0,0435	0,0006	
0,4	0,0458	0,313	0,0435	-0,0023	4,48
0,4	0,0468	0,806	0,0435	-0,0033	
0,7	0,0797	0,801	0,0779	-0,0018	
0,7	0,0809	1,121	0,0779	-0,0030	0,86
0,7	0,0800	0,320	0,0779	-0,0021	
1,0	0,1088	1,095	0,1123	0,0035	
1,0	0,1115	0,229	0,1123	0,0008	2,02
1,0	0,1128	0,866	0,1123	-0,0005	
2,0	0,2197	1,028	0,2270	0,0073	
2,0	0,2222	0,058	0,2270	0,0048	1,14
2,0	0,2243	0,970	0,2270	0,0027	
3,0	0,3326	1,076	0,3417	0,0091	
3,0	0,3436	0,174	0,3417	-0,0019	2,57
3,0	0,3500	0,901	0,3417	-0,0083	
4,0	0,4436	1,128	0,4564	0,0128	
4,0	0,4630	0,351	0,4564	-0,0066	2,86
4,0	0,4686	0,777	0,4564	-0,0122	

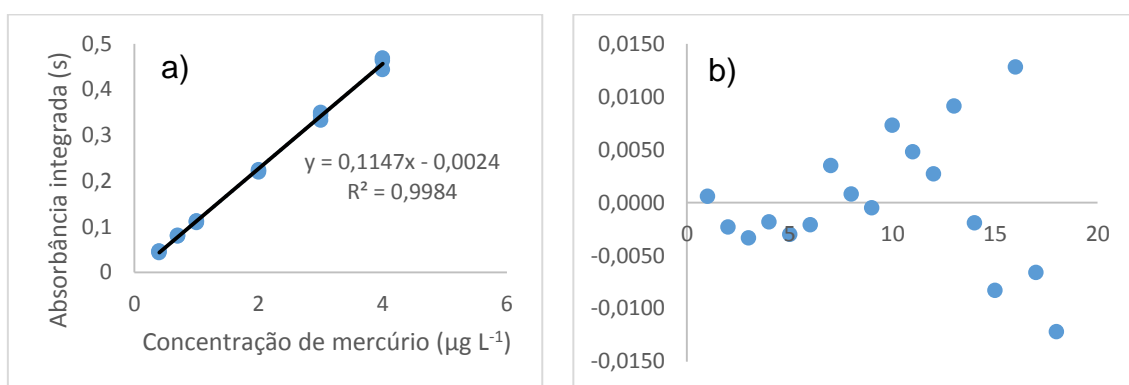
\* Coeficiente de variação.

Aplicando-se o Teste de Grubbs, nenhum ponto foi considerado um *outlier*. todos os valores de  $G$  foram inferiores ao valor de  $G_{\text{tabelado}}$  de 1,153 para três observações ( $n=3$ ) e 95% de confiança, portanto todos os dados experimentais foram considerados na obtenção da reta que representa a curva de calibração. O coeficiente de variação também foi calculado, ficando abaixo de 5% para todos os pontos e representando uma precisão adequada entre as medidas.

Na figura 1 estão representados a curva analítica (a) e o perfil dos resíduos obtidos para cada ponto (b), onde os pontos compõem o eixo das abscissas. Fazendo-se a regressão linear para os dados apresentados na figura 1 (a), obteve-se a reta de equação  $A_{\text{int}} = 0,1147 \times \text{Conc} - 0,0024$ , onde o coeficiente angular  $0,1147 \text{ s } \mu\text{g L}^{-1}$  representa a variação da resposta em função da concentração do analito (sensibilidade). O  $r^2 = 0,9984$ , indicou que o método é linear para a faixa escolhida, de  $0,40$  a  $4,00 \mu\text{g L}^{-1}$  e, portanto, para a faixa de trabalho, de

0,40 a 2,00  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Os resíduos da curva de calibração correspondem às diferenças entre os valores esperados e os medidos, e foram calculados pela subtração entre a absorbância prevista e a absorbância medida (absorbância integrada). A absorbância prevista, por sua vez, foi obtida pela substituição da concentração de cada ponto na equação da reta representativa da curva de calibração. A aleatoriedade dos resíduos nos pontos analisados demonstra a ausência de tendências e erros sistemáticos ao longo da faixa considerada.

Figura 1 - Curva analítica de mercúrio (a) e gráfico de resíduos calculados (b)



#### 5.4 Limite de detecção e de quantificação

Os limites de detecção do método (LDM) e de quantificação (LQ) foram calculados de acordo com Albano e Rodriguez<sup>21</sup>, através das equações 22 e 23:

$$LDM = X + 3,143 s \quad (22)$$

$$LQ = X + 10s \quad (23)$$

Onde " $X$ " é a média dos valores dos brancos, 3,143 é a abcissa da distribuição de *Student* para 99% de confiança e 6 graus de liberdade (7 amostras) e " $s$ " é o desvio-padrão dos brancos contendo o analito. Neste processo foi importante a experiência do analista, baseada em valores de LDM e LQ determinados anteriormente. Adotou-se como critério um CV de 20% entre as replicatas, de forma que em determinações anteriores, replicatas preparadas em concentrações mais baixas que 0,20  $\mu\text{g L}^{-1}$  resultaram em um CV maior que o critério adotado, indicando que a concentração estava abaixo do LDM. Assim, novas replicatas foram preparadas conforme descrito em 4.4.4, resultando nas medidas apresentadas na tabela 5.



Tabela 5 - Respostas do analito em uma solução padrão de 0,20 µg.L<sup>-1</sup> para determinação do LDM e do LQ.

Replicata	Valores lidos (µg L <sup>-1</sup> )
1	0,19
2	0,20
3	0,19
4	0,21
5	0,22
6	0,21
7	0,23
<b>Média</b>	<b>0,21</b>
<b>Desvio-padrão</b>	<b>0,01</b>

A partir da média e do desvio-padrão, foram determinados os valores de 0,25 µg L<sup>-1</sup> como o LDM e de 0,36 µg L<sup>-1</sup> como o LQ.

### 5.5 Exatidão

Com o objetivo de avaliar a exatidão do método, foram executados ensaios de recuperação. As concentrações de mercúrio nas amostras e as concentrações obtidas após a fortificação das mesmas, demonstradas na tabela 6, foram aplicadas na equação 24, permitindo o cálculo do percentual de recuperação.

$$Recuperação (\%) = \left( \frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (24)$$

Onde " $C_1$ " é a concentração determinada na amostra fortificada, " $C_2$ " é a concentração determinada na amostra sem adição do analito e " $C_3$ " é a concentração para a qual a amostra foi fortificada. Neste caso,  $C_3 = 0,50 \mu\text{g L}^{-1}$  para o primeiro grupo de 5 amostras analisadas e  $C_3 = 1,00 \mu\text{g L}^{-1}$  para o outro grupo, também de 5 amostras. Os resultados das recuperações também podem ser vistos na tabela 6.

Tabela 6 – Resultados dos ensaios de recuperações do analito para 5 diferentes amostras.

Amostra	Fortificação para 0,50 $\mu\text{g L}^{-1}$			Fortificação para 1,00 $\mu\text{g L}^{-1}$		
	C <sub>1</sub> *	C <sub>2</sub> **	Recuperação(%)	C <sub>1</sub> *	C <sub>2</sub> **	Recuperação(%)
1	0,49	0,03	92	1,03	0,03	100
2	0,50	0,00	100	1,01	0,00	101
3	0,49	0,09	80	1,03	0,09	94
4	0,53	0,03	100	1,05	0,03	102
5	0,46	0,04	84	1,03	0,04	99

\*C<sub>1</sub> é a concentração determinada na amostra fortificada; \*\*C<sub>2</sub> é a concentração determinada na amostra sem adição do analito.

Para o primeiro grupo de amostras, fortificadas com uma concentração mais baixa de mercúrio (0,50  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), as recuperações apresentaram maior variação, entre 80 e 100%, o que é perfeitamente esperado para a medição de valores mais baixos, próximos ao LQ. Já para o nível de concentração mais alto (1,00  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), o analito foi recuperado com uma pequena oscilação entre 94 e 102%. De uma forma geral, avaliando-se o estudo como um todo (considerando os dois níveis de concentração estudados), as recuperações variaram entre 80 e 102%, permitindo afirmar que o método apresenta a exatidão adequada, segundo o critério de aceitação de 70 a 130% do valor fortificado, adotado pelo *Standard Methods*.

## 5.6 Precisão (repetibilidade e reprodutibilidade)

Na tabela 7 encontram-se os resultados do teste de repetibilidade com os respectivos valores percentuais de CV calculados pela equação 7, e os valores de CV máximos calculados através da equação de Horwitz (equação 8).

Tabela 7 - Concentrações do analito obtidas para as soluções padrão de 0,50, 1,00 e 1,50  $\mu\text{g L}^{-1}$  nos 3 dias de análise.

Replicata	Concentração calculada ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) para cada nível*								
	1º dia			2º dia			3º dia		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1	0,51	1,03	1,49	0,47	0,95	1,41	0,52	0,92	1,54
2	0,52	1,05	1,53	0,45	1,00	1,43	0,47	0,94	1,60
3	0,49	1,06	1,55	0,46	1,01	1,50	0,48	0,91	1,59
4	0,50	1,03	1,54	0,46	1,01	1,50	0,49	0,92	1,59
5	0,50	1,05	1,54	0,47	1,00	1,36	0,46	0,88	1,60
6	0,49	1,06	1,54	0,47	1,02	1,49	0,44	0,89	1,61
7	0,50	1,05	1,53	0,48	1,01	1,49	0,42	0,84	1,59
<b>Média</b>	0,50	1,05	1,53	0,47	1,00	1,45	0,47	0,90	1,59
<b>Desvio-padrão</b>	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02	0,06	0,03	0,03	0,02
<b>CV (%)</b>	2,13	1,20	1,27	2,10	2,31	3,78	7,02	3,69	1,43
<b>CV<sub>máx</sub><sup>***</sup> (%)</b>	50,2	45,3	42,6	50,2	45,3	42,6	50,2	45,3	42,6

\*A, B e C representam os níveis de concentração, respectivamente 0,50; 1,00 e 1,50  $\mu\text{g L}^{-1}$ , em que as amostras foram fortificadas. \*\*CV<sub>máx</sub> é o limite de variação aceitável pela equação de Horwitz.

Para o cálculo dos valores de CV<sub>máx</sub> considera-se a concentração da substância em  $\text{g g}^{-1}$ , porém para frações mássicas inferiores a 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , a aplicação da equação resulta em valores elevados. Neste caso, segundo a Decisão 657 da Comissão Europeia, os valores de CV devem ser o mais baixo possível. O mesmo documento estabelece 20% como coeficiente de variação máximo para frações mássicas inferiores a 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

No estudo realizado, todos os valores de CV calculados ficaram abaixo de 10%, indicando uma repetibilidade satisfatória, refletindo um pequeno afastamento entre os resultados das medidas. Para o teste de reprodutibilidade, os resultados encontram-se nas tabelas 8, 9 e 10.

Tabela 8 - Concentrações do analito obtidas pelo analista 1 para soluções padrão de diferentes concentrações nos dois dias de análise.

Replicata	Concentração calculada ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) para cada nível*					
	1º dia			2º dia		
	A	B	C	A	B	C
1	0,51	1,03	1,49	0,47	0,95	1,41
2	0,52	1,05	1,53	0,45	1,00	1,43
3	0,49	1,06	1,55	0,46	1,01	1,50
4	0,50	1,03	1,54	0,46	1,01	1,50
5	0,50	1,05	1,54	0,47	1,00	1,36
6	0,49	1,06	1,54	0,47	1,02	1,49
7	0,50	1,05	1,53	0,48	1,01	1,49
<b>Média</b>	0,50	1,05	1,53	0,47	1,00	1,45
<b>Desvio-padrão</b>	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02	0,06
<b>CV (%)</b>	2,13	1,20	1,27	2,10	2,31	3,78

\*A, B e C representam os níveis de concentração, respectivamente 0,50; 1,00 e 1,50  $\mu\text{g L}^{-1}$ , em que as amostras foram fortificadas.

Tabela 9 - Concentrações do analito obtidas pelo analista 2 para soluções padrão de diferentes concentrações nos dois dias de análise.

Replicata	Concentração calculada ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) para cada nível*					
	1º dia			2º dia		
	A	B	C	A	B	C
1	0,47	1,03	1,52	0,49	0,94	1,45
2	0,51	1,05	1,54	0,44	0,94	1,51
3	0,50	1,04	1,53	0,48	0,92	1,54
4	0,52	1,04	1,52	0,43	0,93	1,48
5	0,51	1,04	1,55	0,46	0,93	1,50
6	0,51	1,07	1,58	0,45	0,93	1,49
7	0,51	1,07	1,57	0,46	0,92	1,51
<b>Média</b>	0,50	1,05	1,54	0,46	0,93	1,50
<b>Desvio-padrão</b>	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,03
<b>CV (%)</b>	3,21	1,50	1,53	4,61	0,88	1,88

\*A, B e C representam os níveis de concentração, respectivamente 0,50; 1,00 e 1,50  $\mu\text{g L}^{-1}$ , em que as amostras foram fortificadas.

Tabela 10 – Comparação dos resultados obtidos pelos analistas 1 e 2, em dias diferentes.

Analista	Média das Concentrações ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) para cada nível*		
	A	B	C
1 (1º dia)	0,50	1,05	1,53
2 (1º dia)	0,50	1,05	1,54
1 (2º dia)	0,47	1,00	1,45
2 (2º dia)	0,46	0,93	1,50
<b>Média das médias</b>	0,48	1,01	1,51
<b>Desvio-padrão</b>	0,02	0,06	0,04
<b>CV (%)</b>	4,27	5,64	2,69

\*A, B e C representam os níveis de concentração, respectivamente 0,50; 1,00 e 1,50  $\mu\text{g L}^{-1}$ , em que as amostras foram fortificadas

Pode-se afirmar que a reprodutibilidade intralaboratorial é satisfatória, pois os resultados levaram a coeficientes de variação inferiores a 10%, para os três níveis de concentração avaliados.

### 5.7 Estudo formal de repetibilidade e reprodutibilidade

Os resultados obtidos visando conhecer a contribuição de R&R para a metodologia, estudados com as mesmas amostras, analisadas nas mesmas condições, para cada um dos analistas, são mostrados nas tabelas 11 e 12.

Tabela 11 – Concentrações ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de mercúrio nas 3 replicatas das 5 diferentes amostras, obtidas pelo analista 1, para o estudo formal de repetibilidade e reprodutibilidade.

Amostras	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )			Média	Amplitude
	1	2	3		
1	0,49	0,49	0,50	0,493	0,01
2	0,50	0,50	0,49	0,497	0,01
3	0,49	0,49	0,50	0,493	0,01
4	0,52	0,54	0,53	0,530	0,02
5	0,46	0,46	0,45	0,457	0,01
			<b>Média</b>	<b>0,494</b>	<b>0,012</b>

Tabela 12 – Concentrações ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de mercúrio nas 3 replicatas das 5 diferentes amostras, obtidas pelo analista 2, para o estudo formal de repetibilidade e reprodutibilidade.

Amostras	Replicata			Média	Amplitude
	1	2	3		
1	0,49	0,49	0,50	0,493	0,01
2	0,50	0,49	0,49	0,493	0,01
3	0,50	0,51	0,51	0,507	0,01
4	0,50	0,51	0,51	0,507	0,01
5	0,43	0,43	0,43	0,430	0,00
			<b>Média</b>	<b>0,486</b>	<b>0,008</b>

Alguns valores obtidos a partir dos resultados das tabelas 11 e 12 são importantes para os cálculos, a serem considerados: amplitude entre as médias das médias dos analistas ( $R_o$ ) = 0,008; amplitude média entre os analistas ( $R_e$ ) = 0,010;

amplitude entre as amostras ( $Ra$ ) = 0,075; número de replicatas ( $nr$ ) = 15.

Aplicando-se de  $Ro$ ,  $Re$ ,  $Ra$  e  $nr$  nas devidas equações (9 a 13), foram obtidos os valores necessários para o encontro do percentual de contribuição da repetibilidade e da reprodutibilidade para o sistema de medição. Constatou-se que a contribuição das mesmas é homogênea, sendo próxima de 50% para cada. Essa contribuição homogênea reflete que o desempenho do método independe da execução sob as mesmas condições (repetibilidade), ou sob condições variadas (reprodutibilidade), isto é, a variabilidade das medições sofre as mesmas influências se executada pelo mesmo analista, ou por analistas diferentes.

Continuando a aplicação das equações 16 a 19, chegou-se ao percentual de R&R, que avalia a adequabilidade do sistema de medição. Na tabela 13, encontram-se todos os resultados obtidos para cada variável pela aplicação das equações 9 a 19.

Tabela 13 – Parâmetros estatísticos calculados para o estudo de R&R.

<b>Parâmetro calculado</b>	<b>Resultado</b>	<b>Equação utilizada</b>
$\sigma_{repe}$	0,0058	9
$VE$	0,0299	10
$VO$	0,0282	11
$\sigma_{repro}$	0,0055	12
$R\&R$	0,0411	13
<i>Contribuição da Repe (%)</i>	53	14
<i>Contribuição da Repe (%)</i>	47	15
<i>Desvio das amostras</i>	0,0302	16
$VA$	0,1555	17
$VT$	0,1608	18
$R\&R$ (%)	25,5	19

O valor de 25,5%, é aceitável, segundo os critérios comentados no item 3.3.7. A literatura descreve que valores entre 10 e 30%, podem ser adequados dependendo da aplicação, do instrumento, etc. Considerando a concentração de mercúrio utilizada no estudo, próxima ao LQ, visto que o método é aplicado para

amostras que em sua maioria não contêm o analito, e o número mínimo de amostras estudadas, o percentual obtido foi aceito e utilizado como uma fonte de contribuição para a incerteza de medição, que será discutida no próximo item deste trabalho.

## 5.8 Incerteza de medição

Partindo-se de informações fornecidas pelos certificados da solução padrão, da micropipeta e dos balões utilizados na curva de calibração, a incerteza de cada uma das fontes foi calculada inicialmente para que, posteriormente, pudesse ser combinada às demais, gerando uma incerteza final, associada ao resultado da medição. Considerando-se a confidencialidade dos dados do laboratório da CORSAN, os valores de cada incerteza estão demonstrados na tabela 14, e o R&R (repetibilidade e reprodutibilidade) será utilizado para fins de demonstração do cálculo.

A identificação do tipo de componente de incerteza para cada uma das fontes definiu o divisor adequado relacionado à distribuição de probabilidade desse componente. No caso do R&R, o tipo de componente é baseado no desvio-padrão, *t-Student* é a distribuição de probabilidade e o divisor é 1. A incerteza padrão foi obtida pela equação 25.

$$Inc\ pad = \frac{Inc}{Div} \quad (25)$$

Onde “*Inc*” é a incerteza de cada uma das fontes, calculada com base nos certificados e “*Div*” é o divisor correspondente à distribuição de probabilidade.

Para converter a incerteza-padrão de todas as variáveis para a mesma unidade, calcula-se os coeficientes de sensibilidade, através de derivadas parciais. Para o R&R, o coeficiente de sensibilidade é igual a 1, pois o valor corresponde à mesma unidade de medida ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Assim, a contribuição da incerteza de cada fonte é dada pela equação 26.

$$Cont\ Inc = Inc\ pad \times Coef\ Sens \quad (26)$$

Onde “*Cont Inc*” é a contribuição de incerteza que corresponde a uma medida de dispersão equivalente a um desvio-padrão com a mesma unidade de medida do mensurando, “*Inc pad*” é a incerteza padrão e “*Coef Sens*” é o coeficiente de sensibilidade.



Neste momento, com todas as fontes conhecidas e transformadas na mesma unidade, é possível combinar as contribuições de todas elas, isto é, calcular a incerteza combinada. Esta é calculada através da raiz quadrada do somatório quadrático das contribuições de incerteza padrão de cada fonte, conforme a equação 27.

$$Inc\ comb = \sqrt{\sum_{i=1}^N (Cont\ Inc)_i^2} \quad (27)$$

Onde “*Inc comb*” é a incerteza combinada e “*Cont Inc*” é a contribuição de cada fonte para a incerteza de medição.

A última coluna da tabela 14 é importante para a determinação do grau de liberdade efetivo. Isto é necessário, pois quando se considera incerteza, alguns componentes não são obrigatoriamente avaliados estatisticamente, exigindo um conceito mais genérico para o grau de liberdade associado ao mensurando. O grau de liberdade efetivo para um sistema é definido pela equação 28 (fórmula de Welch-Satterthwaite).

$$\nu_{eff} = \frac{(Inc\ comb)^4}{\sum_{i=1}^N \frac{(Cont\ Inc)^4}{\nu}} \quad (28)$$

Onde “ $\nu_{eff}$ ” é o grau de liberdade efetivo, “*Inc comb*” é a incerteza combinada, “*Cont Inc*” é a contribuição de cada fonte para a incerteza de medição e “ $\nu$ ” é o grau de liberdade de cada uma dos componentes.

Com  $\nu_{eff}$ , obtém-se a constante k tabelada, que servirá para expandir a incerteza combinada ao nível de confiança desejado, conforme a equação 29.

$$Inc\ Exp = Inc\ Comb \times k \quad (29)$$

Considerando uma probabilidade de abrangência de 95%, a constante k tabelada obtida foi de 2,06.

Tabela 14 – Contribuições das fontes para o cálculo da incerteza.

Fonte	Inc	Dist Prob	Div	Inc pad	Coef Sens	Cont Inc	GL ( $\nu$ )
<b>R&amp;R</b>	0,018	t-Student	1	0,018	1	0,018	28
<b>Padrões</b>	0,037	normal	2	0,018	1	0,018	Infinitos
<b>Curva</b>	0,087	t-Student	$\sqrt{12}$	0,025	1	0,025	11
<b>Equip</b>	2,000	Retang	$\sqrt{3}$	1,155	0,772	0,001	Infinitos
<b>Incerteza combinada</b>							0,036
<b><math>\nu_{eff}</math></b>							43
<b>k</b>							2,06
<b>Incerteza expandida</b>							0,07

O estudo de R&R representa o desempenho da metodologia frente à variação do ensaio quando executado em diferentes dias e por diferentes analistas. A sua contribuição para a estimativa da incerteza de medição é dada pela razão entre o valor de R&R (calculado no item 5.7) e a média dos resultados entre os dois analistas (tabelas 11 e 12), obtidos no estudo, segundo a equação 30.

$$Inc(R\&R) = \frac{RM \times R\&R}{Média} \quad (30)$$

Onde “ $Inc(R\&R)$ ” é a incerteza obtida pelo estudo de R&R, “ $RM$ ” é o resultado da medição, “ $R\&R$ ” é a variação (desvio) e “ $Média$ ” é a média dos resultados, calculada através do estudo. Desta forma, cada resultado ( $RM$ ) obtido por esta metodologia leva a uma contribuição diferente para a incerteza, baseada no valor medido. Substituindo  $R\&R = 0,041$  e  $Média = 0,49$ , provenientes do estudo formal de R&R, um resultado de medição de  $0,50 \mu\text{g L}^{-1}$ , por exemplo, leva a uma  $Inc(R\&R)$  de 0,042, um  $k$  igual a 2,06 e uma incerteza final de 0,10.

A maior contribuição para incerteza provém da curva de calibração, pois o laboratório adota 10% como critério de aceitação para o desvio-padrão relativo para cada ponto da curva, lido em triplicata.

Já a contribuição do padrão reflete o modo de preparo de cada solução utilizada na execução do ensaio, pois as concentrações utilizadas requerem diversas etapas de preparo e diluição, que agregam pequenos desvios e quando combinadas tornam-se a segunda maior contribuição.

A incerteza do equipamento, por sua vez, está vinculada as características ópticas do equipamento durante os testes de qualificação do mesmo. Os desvios apresentados devido ao uso, são normalizados e corrigidos, mas agregam uma pequena parcela de contribuição, sendo a menor de todas as fontes.

### 5.9 Parâmetros avaliados

Considerando o grande número de dados experimentais obtidos e os diversos parâmetros avaliados neste estudo de validação, na tabela 15 os resultados são apresentados de forma compilada para facilitar a visualização.

Tabela 15 – Parâmetros avaliados e resultados obtidos.

Parâmetro	Resultados/ observações
Exatidão – Método normalizado x Método não normalizado	Metodologias estatisticamente iguais.
Seletividade	A metodologia é seletiva para Hg.
Linearidade	Atende os requisitos de linearidade até $2,00 \mu\text{g L}^{-1}$ (faixa de trabalho), com $r^2 \geq 0,99$ .
Limite de Detecção e Quantificação	LDM = $0,25 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg LQ = $0,36 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg
Precisão (repetibilidade e reprodutibilidade)	Repetibilidade satisfatória: CV < 5% Reprodutibilidade satisfatória: CV < 10%
Exatidão	$0,50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg = recuperações entre 80 e 100% $1,00 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg = recuperações entre 94 e 102%
Estudo formal de R&R	Contribuição da Repetibilidade = 53% Contribuição da Reprodutibilidade = 47% Desvio de R&R para o cálculo de incerteza = 0,041 (R&R)% aceitável = 25,5%
Incerteza de medição	$\pm 0,13$ para uma concentração de $0,50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg

## 6 AVALIAÇÃO ECONÔMICA

A avaliação dos custos de cada metodologia é importante para a substituição do volume de 100 mL de amostra, indicado pelo método normalizado, pelo volume de 20 mL proposto pelo método validado. Custos referentes à energia, água ultrapura, salário do analista, tempo de análise, vidraria, gás (Nitrogênio) e equipamento utilizado são semelhantes para os dois métodos e, portanto, desprezíveis para fins de comparação. Como fatores consideráveis para o cálculo dos custos têm-se os reagentes e o tratamento de resíduos. Os reagentes são necessários nas etapas de digestão e análise, enquanto os resíduos gerados são coletados e enviados para tratamento adequado após as determinações de mercúrio.

Para o cálculo comparativo, foram consideradas as quantidades de reagentes necessários em cada batelada, definida como o conjunto de análises de 35 amostras, além da curva analítica. Os valores dos reagentes utilizados, segundo cotação realizada em outubro de 2015, estão demonstrados na tabela 16, bem como o consumo anual estimado.

Tabela 16 – Consumo de reagentes e custo, para o uso de 100 mL de amostra.

Reagente	Quantidade	Custo	Consumo anual	Custo anual
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> com baixo teor de mercúrio</b>	1 litro	R\$ 439,00	Aprox. 21,6 litros	Aprox. R\$ 9.500,00
<b>HNO<sub>3</sub> com baixo teor de mercúrio (&lt;0,000005%)</b>	1 litro	R\$ 436,00	Aprox. 10,8 litros	Aprox. R\$ 4.750,00
<b>KMnO<sub>4</sub> com baixo teor de mercúrio (&lt;0,0000005%)</b>	1.000 gramas	R\$ 2.260,00	Aprox. 3.250 gramas	Aprox. R\$ 7.350,00
<b>Persulfato de Potássio PA</b>	250 gramas	R\$ 652,00	Aprox. 1.750 gramas	Aprox. R\$ 4.500,00
<b>Cloridrato de Hidroxilamina com baixo teor de mercúrio (&lt;0,000001%)</b>	250 gramas	R\$ 491,00	Aprox. 3.500 gramas	Aprox. R\$ 7.000,00
			<b>Consumo anual total</b>	<b>Aprox. R\$ 33.000,00</b>

A metodologia validada, para a qual se utiliza um volume reduzido de amostra, diferencia-se em termos de custo, dos valores mostrados na tabela 16, pois o consumo de reagentes é proporcionalmente reduzido. Para o uso de 20 mL de amostra, o custo é cinco vezes mais baixo, resultando em um gasto anual aproximado de apenas R\$ 6.600,00.

Em relação aos custos envolvendo tratamento dos resíduos gerados nas duas metodologias, é importante destacar a redução do volume de 432.000 para 86.400 litros. O custo para o tratamento é de R\$ 1,10 por litro, representando uma economia anual de aproximadamente R\$ 380.000,00.

Somando-se os valores acima mencionados, o gasto anual total com reagentes e resíduos é reduzido de R\$ 500.000,00 para R\$ 100.000,00, podendo sofrer variações de acordo com o número de ensaios realizados pelo laboratório.

## **7 IMPACTO AMBIENTAL**

Considerando a potencialidade tóxica dos resíduos contendo mercúrio, durante as análises estes são devidamente coletados e têm como destino um tratamento envolvendo a precipitação do metal. As concentrações deste metal nos resíduos gerados pelos métodos em estudo são semelhantes, porém a principal vantagem do método validado é a utilização de um volume de amostra menor e, conseqüentemente, a geração de um volume de resíduos também menor. Proporcionalmente, são gerados cinco vezes menos resíduos.

## 8 CONCLUSÃO

O método para a determinação de mercúrio com a utilização de 20 mL de amostra mostrou-se estatisticamente semelhante ao método normalizado, que utiliza um volume de 100 mL de amostra, sendo considerado exato e preciso, e estando validado para o uso, embora o ensaio de robustez ainda possa ser aplicado para complementar o estudo. É importante salientar que houve um rigor no controle da temperatura da sala e do banho-maria, bem como na qualidade dos reagentes e suas validades, com a finalidade de evitar interferências desses parâmetros nos resultados analíticos. Este cuidado deve ser mantido para garantir a confiabilidade de futuros resultados obtidos pelo método validado.

A modificação do método representou, para o laboratório, uma redução de cinco vezes no custo, além de oferecer maior agilidade e melhor homogeneidade das condições de análise. O tempo do ensaio é reduzido pois a diminuição do volume permite o preparo simultâneo de um maior número de amostras em função do tamanho do banho-maria utilizado na preparação das amostras. Consequentemente, são obtidas amostras mais homogêneas, digeridas sob as mesmas condições, contribuindo para a rastreabilidade do ensaio e o controle de qualidade do laboratório.

## REFERÊNCIAS

- 1) AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, WATER ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22nd.ed. Washington. 2012. 541 p.
- 2) MASON, R. P. et al. The biogeochemical cycling of elemental mercury: anthropogenic influences. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 58, n. 15, p. 3191-3198, 1994.
- 3) USEPA. 19 de Outubro de 2015. Disponível em: <<http://www2.epa.gov/mercury/basic-information-about-mercury>> Acesso em 01 novembro 2015.
- 4) MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria nº 2.914**. Brasília, 12 dezembro 2011.
- 5) KELLY, J. G. et al. Rapid determination of mercury in contaminated soil and plant samples using portable mercury direct analyzer without sample preparation, a comparative study. **Water Air Soil Pollut**, v. 223, p. 2361-2371, 2012.
- 6) FERREIRA, S. L. C. et al. Analytical strategies of sample preparation for the determination of mercury in food matrices - a review. **Microchemical Journal**, v. 121, p. 227-236, 2015.
- 7) LEIVA, M. A.; MORALES, S.; SEGURA, R. Comparative measurements and their compliance with standards of total mercury analysis in soil by cold vapour and thermal decomposition, amalgamation and atomic absorption spectrometry. **Water Air Soil Pollut**, v. 224, p. 1-13, 2013.
- 8) PALMER, C. D. et al. Determination of lead, cadmium and mercury in blood for assessment of environmental exposure: a comparison between inductively coupled plasma-mass spectrometry and atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta**, v. 61, p. 980-990, 2006.
- 9) VIEIRA, H. P.; NASCENTES, C. C.; WINDMOLLER, C. C. Development and comparison of two analytical methods to quantify the mercury content in honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 34, p. 1-6, 2014.
- 10) RIBEIRO, R. F. L.; GERMANO, A. Development and validation of a method for the determination of Hg in animal tissues (equine muscle, bovine kidney and swine kidney and poultry muscle) by direct mercury analysis (DMA). **Microchemical Journal**, v. 121, p. 237-243, 2015.
- 11) SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de química analítica**. 8.ed. São Paulo: Cengage Learning, 2008. 1124 p.
- 12) DEDINA, J. **Encyclopedia of analytical chemistry: Generation of volatile compounds for analytical atomic spectroscopy**. Brno: R. A. Meyers, 2010.
- 13) SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. p. 144-158.



- 14) GUILHEN, S. N. et al. Validação de metodologia analítica para determinação de mercúrio total em amostras de urina por espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CV-AAS) - Estudo de caso. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1285-1290, 2010.
- 15) WELZ, B.; VALE, M. G. R. **Analytical instrumentation handbook: atomic absorption spectrometry and related techniques**. 3rd.ed. Boca Raton: CRC Press, 2004. p. 75-124.
- 16) ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR ISO IEC 17025: Requisitos gerais para a competência dos laboratórios de ensaio e de calibração**. Rio de Janeiro: 2005.
- 17) MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Manual de garantia da qualidade analítica**. Brasília: 2011.
- 18) LEITE, F. **Validação em análise química**. 5.ed. Campinas: Átomo, 2008. 357 p.
- 19) INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Vocabulário internacional de metrologia**. 1.ed. Rio de Janeiro: INMETRO, 2012.
- 20) INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. 4.ed. INMETRO, 2011.
- 21) ALBANO, F. M.; RODRIGUEZ, M. T R. **Validação e garantia da qualidade de ensaios laboratoriais**. 2.ed. Porto Alegre: Rede Metrológica RS, 2015. 129 p.
- 22) COMISSÃO EUROPEIA. **Decisão 657**. 2002.
- 23) CARPINETTI, L. C. R.; COSTA, A. F. B.; EPPRECHT, E. K. **Controle estatístico de qualidade**. 2.ed. São Paulo: Atlas, 2013. 334 p.
- 24) INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Guia para a expressão de incerteza de medição**. 1.ed. Rio de Janeiro: INMETRO, 2008.