

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA

VERIDIANA SILVEIRA LIMA

**CONFIABILIDADE ANALÍTICA E GARANTIA DA QUALIDADE DA ANÁLISE DE  
NÍQUEL EM TECIDO VEGETAL**

Porto Alegre, 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA

VERIDIANA SILVEIRA LIMA

**CONFIABILIDADE ANALÍTICA E GARANTIA DA QUALIDADE DA ANÁLISE DE  
NÍQUEL EM TECIDO VEGETAL**

Trabalho de conclusão apresentado junto à  
atividade de ensino “Trabalho de Conclusão de  
Curso - QUI” do Curso de Química, como  
requisito parcial para a obtenção do grau de  
Bacharel em Química

Prof. Dr. Maria Tereza Raya Rodriguez  
Orientador

Prof. Vera Lúcia Atz  
Co-orientador

Porto Alegre, 25 de novembro de 2011

## RESUMO

No presente trabalho foi verificada a confiabilidade analítica e a garantia da qualidade do ensaio químico de determinação de níquel em amostras de tecido vegetal utilizando-se a técnica analítica de espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite através de um estudo dos seguintes parâmetros analíticos: limite de detecção do equipamento, limite de detecção do método, limite de quantificação, linearidade da curva de calibração, repetitividade, reprodutibilidade e exatidão do método. O estudo dos limites de detecção e de quantificação do método revelou que o método é capaz de detectar o teor de Ni acumulado em tecidos vegetais e determinar com confiabilidade analítica sua concentração em plantas bioacumuladoras de interesse ambiental. O estudo da linearidade da curva de calibração verificou que a resposta analítica do equipamento utilizado para as determinações (espectrofotômetro) tem uma relação linear com a concentração do analito, apresentando sensibilidade constante na faixa de interesse do método. O estudo da repetitividade e da reprodutibilidade do método permitiu avaliar a precisão do método e o sistema de medição do laboratório como satisfatórios. O estudo da exatidão do método evidenciou que os resultados obtidos pelo método a ser validado possuem exatidão aceitável quando comparados aos resultados obtidos por outro método de exatidão conhecida. Dessa forma, os parâmetros analíticos necessários para avaliar a confiabilidade analítica dos resultados e garantir a qualidade do ensaio foram obtidos com sucesso, possibilitando então a confirmação do desempenho do método.

**Palavras-chave:** biomonitoramento ambiental, forno de grafite, *Lolium multiflorum*, níquel, validação

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>5</b>
1.1 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL E O USO DE PLANTAS BIOINDICADORAS ....	5
1.2 TOXICIDADE DE NÍQUEL PARA PLANTAS .....	6
1.3 MÉTODOS QUÍMICOS PARA ANÁLISE DE NÍQUEL .....	6
1.4 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FORNO DE GRAFITE.....	7
1.5 OBJETO DE TRABALHO .....	9
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>10</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>12</b>
3.1 TÉCNICA DE ANÁLISE DE NÍQUEL EM TECIDO VEGETAL POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FORNO DE GRAFITE.....	12
<b>3.1.1 Preparação da amostra .....</b>	<b>12</b>
<b>3.1.2 Digestão da amostra .....</b>	<b>13</b>
<b>3.1.3 Determinação por espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite .</b>	<b>13</b>
<b>3.1.4 Programação da temperatura e alíquotas para análise.....</b>	<b>14</b>
3.2 CONFIABILIDADE ANALÍTICA E VALIDAÇÃO DO MÉTODO .....	15
<b>3.2.1 Linearidade da curva de calibração .....</b>	<b>16</b>
<b>3.2.2 Limite de detecção do equipamento (LDE) .....</b>	<b>16</b>
<b>3.2.3 Limite de detecção do método (LDM).....</b>	<b>16</b>
<b>3.2.4 Limite de Quantificação (LQ) .....</b>	<b>17</b>
<b>3.2.5 Repetitividade (REPE) e Reprodutibilidade (REPRO).....</b>	<b>17</b>
<b>3.2.6 Exatidão.....</b>	<b>17</b>
<b>3.2.7 Procedimento Experimental.....</b>	<b>18</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>21</b>
4.1 LINEARIDADE DA CURVA DE CALIBRAÇÃO .....	21
4.2 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO.....	24

4.3 ESTUDO RÁPIDO DE REPETITIVIDADE E REPRODUTIBILIDADE .....	25
4.4 EXATIDÃO.....	27
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>29</b>
<b>6 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>30</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL E O USO DE PLANTAS BIOINDICADORAS

A contaminação ambiental é um problema que tem se intensificado em todo o mundo nos últimos anos. Devido aos crescentes problemas causados pela poluição ambiental nos países industrializados e nos países em desenvolvimento, há um interesse justificado em encontrar métodos adequados e economicamente viáveis para monitorar as condições ambientais e detectar o nível de contaminação da atmosfera. (1)

A poluição atmosférica é caracterizada por alterações na composição do ar e nas suas propriedades tornando-o impróprio, nocivo ou ofensivo à saúde pública, prejudicando assim as atividades normais da comunidade ou causando danos à flora e a fauna. As causas da poluição do ar podem ter origem em ações diretas ou indiretas do homem e podem ser geradas por diversas fontes poluidoras. (2)

As refinarias de petróleo são fontes relevantes de emissão de poluentes atmosféricos, incluindo principalmente emissões fugitivas de compostos voláteis de enxofre, óxidos de nitrogênio, monóxido de carbono e hidrocarbonetos. Além disso, a regeneração periódica dos catalisadores de processo gera correntes gasosas que podem carregar material particulado finamente dividido contendo níquel (Ni) e outros metais tóxicos. (3)

Bioindicadores são organismos ou grupos de organismos capazes de responder às condições ambientais através de alterações no seu metabolismo, fisiologia, morfologia ou na sua composição química. Esses indivíduos quando expostos a ambientes contaminados, são capazes de assimilar e/ou acumular metais e outros compostos tóxicos em seus tecidos, sem que suas funções vitais sejam perturbadas. Estes organismos podem ser usados para detectar alterações ambientais induzidas por atividades humanas que podem se tornar nocivas à população. (4)

Diversos trabalhos descrevem o uso de bioindicadores no monitoramento de poluentes atmosféricos. Hermann Ellenberg e colaboradores no livro *Biological Monitoring* de 1991 relatam estudos realizados com plantas bioacumuladoras (árvores, ervas e gramíneas) na avaliação da qualidade do ar e suas aplicações em diferentes regiões do mundo, os resultados mostram-se satisfatórios e vantajosos quando comparados com outros métodos uma vez que os procedimentos são simples e de baixo custo.

O biomonitoramento pode ser realizado de forma passiva, utilizando-se organismos de ocorrência natural, presentes no ambiente de estudo, ou de forma ativa, introduzindo-se organismos-teste padronizados na área de estudo e observando-se seu comportamento frente à exposição na área afetada. (5)

Arndt e Steubing (1) apresentam estudos bem sucedidos realizados através da exposição de líquens transplantados (*Hypogymnia physodes*) e métodos padronizados de cultura de azevém (*Lolium multiflorum*) no monitoramento ativo de poluentes atmosféricos, por acumulação de substâncias tóxicas nos tecidos destas espécies durante o período de exposição na área monitorada.

O monitoramento ativo da qualidade do ar pode ser realizado através do cultivo padronizado e posterior exposição dessas plantas bioacumuladoras em locais a serem avaliados. Estas espécies podem então fornecer informações sobre o padrão geográfico da qualidade do ar e a tendência temporal da concentração de substâncias tóxicas presentes no ambiente (6).

## 1.2 TOXICIDADE DE NÍQUEL PARA PLANTAS

Algumas plantas podem ser mais sensíveis à toxicidade de níquel do que os animais, embora ambos sejam afetados pela descarga de efluentes gasosos e resíduos sólidos das indústrias. (7) A concentração normal de Ni encontrada em material vegetal seco varia geralmente de 0,1 a 5  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de acordo com a espécie, parte da planta, estágio de maturidade na época de amostragem, teor do solo, acidez do solo entre outros fatores. (8) Em geral, com exceção das espécies acumuladoras e hiperacumuladoras que podem apresentar tolerância a altos níveis de Ni sem alterações de suas funções vitais, a toxidez de níquel se expressa quando a sua concentração na matéria seca das plantas for maior do que 50  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . (9)

Plantas que crescem em ambientes contaminados com Ni apresentam uma série de distúrbios nutricionais, sendo muitas vezes os sintomas de toxicidade de níquel confundidos com deficiências ou toxicidade de elementos essenciais. (10) A sintomatologia da toxidez de níquel se apresenta como clorose e posterior necrose de folhas, iniciando-se pelas folhas novas. Em gramíneas consiste em clorose ao longo das nervuras deixando as folhas internas esbranquiçadas e, em casos extremos, pode haver necrose nas margens e redução no crescimento. (11)

## 1.3 MÉTODOS QUÍMICOS PARA ANÁLISE DE NÍQUEL

Existem diversos métodos analíticos para determinação de Ni entre eles destacam-se os métodos que utilizam as técnicas de espectrometria de massas com fonte de plasma de acoplamento indutivo (ICP-MS), espectrometria de emissão óptica com fonte de plasma de acoplamento indutivo (ICP-OES), espectroscopia de fluorescência atômica (AFS), fluorescência de raios X (XRF), polarografia, voltametria, espectroscopia de absorção atômica

com chama (FAAS) e espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS). (12)

Dentre as técnicas destacadas a técnica analítica de espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite fornece um método simples, rápido e de baixo custo para quantificação de Ni em plantas tendo em vista que o procedimento é relativamente livre de interferentes, não necessita de modificador de matriz e é moderadamente sensível, com limite de detecção para Ni de aproximadamente  $0,2 \mu\text{g.g}^{-1}$  de tecido vegetal, sendo então aplicável para amostras de controle ambiental. (7)

Em matriz vegetal a determinação da concentração de Ni por GFAAS requer o preparo prévio de solução da amostra. O preparo desta solução necessita de um processo de oxidação envolvendo combustão (incineração a seco) ou digestão ácida (incineração via úmida) com o objetivo de mineralizar a matéria orgânica presente na amostra. O método de digestão ácida apresenta vantagens em relação ao método de combustão, pois apresenta melhor índice de recuperação, menor risco de perda de material e requer pequenas quantidades de amostra. (13)

#### 1.4 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FORNO DE GRAFITE

A espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite é também conhecida como espectroscopia de absorção atômica com atomização eletrotérmica.

Na atomização eletrotérmica, a amostra é introduzida no forno ou câmara de grafite, a qual é submetida a um aquecimento progressivo previamente programado. A temperatura da câmara sobe à medida que se aumenta a diferença de potencial aplicada nos extremos da câmara ou à secção transversal, sendo o calor desenvolvido por efeito de Joule. (14) Durante a atomização os átomos presentes na amostra são levados ao estado fundamental. Uma lâmpada de cátodo oco emite radiação no comprimento de onda específico do analito, os átomos do analito absorvem parte desta radiação passando para o estado excitado. A quantidade de energia absorvida é proporcional a concentração do analito na amostra, e pode ser calculada através da diferença de energia emitida pela fonte e a energia que chega ao detector após absorção. (15)

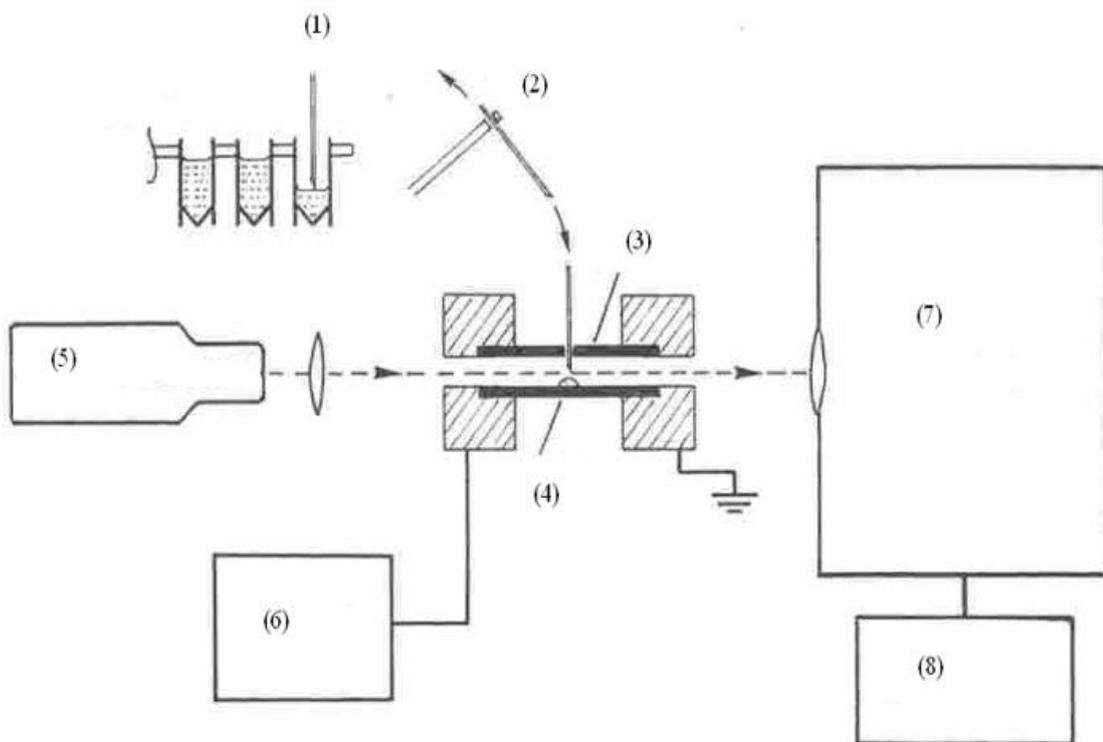
Para o desenvolvimento de um método de análise por absorção atômica com forno de grafite é necessário inicialmente realizar um estudo do programa de temperatura do forno com base na natureza do analito e tipo de matriz a ser estudada.

Um programa de temperaturas típico de atomização eletrotérmica é composto por 4 etapas com temperaturas distintas: 1 - secagem, para eliminar o solvente; 2 - pirólise ou calcinação,

para eliminação dos componentes da matriz; 3 - atomização, para levar os átomos ao estado fundamental seguido da absorção atômica, o sinal gerado é transiente, rápido e é integrado pelo computador; 4 - limpeza, para evitar efeito de memória nas análises subsequentes.

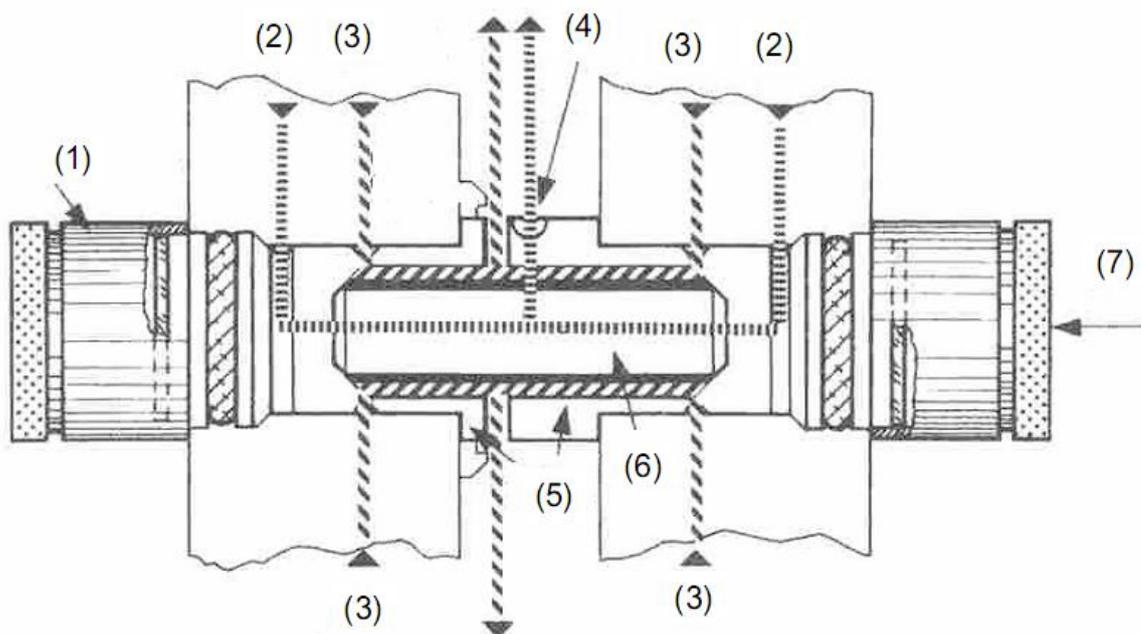
A quantidade de amostra introduzida no sistema varia de 1 a 100  $\mu\text{L}$ . Esta pode ser introduzida no tubo de grafite com o auxílio de uma micropipeta ou usando um sistema de amostragem automático. (16)

Um esquema básico de instrumentação de GFAAS é mostrado na Figura 1.



**Figura 1 - Esquema de instrumentação de GFAAS: (1) amostrador automático, (2) capilar com amostra, (3) tubo de grafite/forno, (4) amostra, (5) fonte de radiação: lâmpada de cátodo oco, (6) potência de abastecimento do forno, (7) monocromador, (8) detector. Adaptado de Riddle (1993).**

O esquema de um atomizador de forno de grafite é representado pela Figura 2. O forno é composto basicamente pelos seguintes elementos: tubo de grafite, ligações elétricas, armazenamento de água fria e fluxo de gás interno e externo.



**Figura 2 - Atomizador de forno de grafite: (1) janela, (2) fluxo de gás interno, (3) fluxo de gás externo, (4) local de injeção da amostra, (5) contatos de grafite, (6) tubo de grafite, (7) feixe de luz. Adaptado de Ribeiro (2006).**

Durante a análise os componentes de grafite são protegidos interna e externamente por um fluxo de argônio gasoso, que minimiza a oxidação do forno de grafite e previne a formação de óxidos metálicos. O fluxo de gás também purga os vapores gerados pela matriz.

### 1.5 OBJETO DE TRABALHO

O ensaio químico de determinação de níquel em tecido vegetal por espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite é aplicado para avaliação da qualidade do ar e utiliza a estratégia ambiental de Bioindicação Vegetal. As plantas bioindicadoras nas quais é analisado o teor de Ni acumulado no tecido vegetal são oriundas do projeto de extensão vigente nº 3543 denominado BIO/BIOMONITORAMENTO QUALIDADE DO AR – REFAP firmado entre CENECO/UFRGS, FAURGS e REFAP.

Este biomonitoramento ativo é realizado através da exposição da planta *Lolium multiflorum*. As plantas são cultivadas em estufa, localizada na área externa do Centro de Ecologia da UFRGS, e posteriormente são encaminhadas à REFAP onde permanecem expostas às emissões industriais por período de trinta dias em nove estações localizadas no interior e no entorno da refinaria. Existe ainda uma estação considerada branco ou controle, localizada na universidade onde as plantas permanecem expostas ao ar distante das emissões da refinaria. Após período de exposição as plantas são amostradas e encaminhadas ao Laboratório de

absorção atômica, onde passam por um processo de lavagem, secagem, moagem, digestão e determinação de níquel. Este procedimento é realizado mensalmente durante a vigência do projeto. A contaminação do ar por Ni causada pelas emissões da refinaria é avaliada através da comparação entre o teor de Ni acumulado pelas plantas expostas na refinaria com o teor de níquel encontrado nas plantas do ponto controle localizado na universidade.

## **2 OBJETIVOS**

O objetivo do presente trabalho foi avaliar e verificar a confiabilidade analítica do método aplicado pelo laboratório para o ensaio químico de determinação de Ni em tecido vegetal utilizando a técnica analítica de espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite, através de um estudo dos seguintes parâmetros analíticos: limite de detecção do equipamento, limite de detecção do método, limite de quantificação do método, linearidade da curva de calibração, exatidão, repetitividade e reprodutibilidade do método.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 TÉCNICA DE ANÁLISE DE NÍQUEL EM TECIDO VEGETAL POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FORNO DE GRAFITE

Os métodos de espectroscopia de absorção atômica utilizam a radiação eletromagnética que é absorvida pelos átomos da amostra. Através destes, é possível obter informações das amostras em estudo, quer a nível qualitativo, quer a nível quantitativo. A informação qualitativa é fornecida pelo comprimento de onda no qual a radiação é absorvida e a informação quantitativa é fornecida pela quantidade de radiação eletromagnética que é absorvida (17)

A técnica de análise de níquel em tecido vegetal por espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite que será avaliada neste trabalho requer preparação prévia das amostras seguida de digestão ácida das mesmas, com o objetivo de mineralizar a matéria orgânica da qual é composta a matriz vegetal obtendo-se uma solução concentrada rica em íons livres dos elementos constituintes da planta. Uma quantidade dessa solução digerida é pipetada para dentro do forno de grafite e é atomizada eletrotermicamente. Durante a atomização, os átomos são levados ao estado fundamental. Esses átomos no estado fundamental são capazes de absorver energia específica ressonante proveniente de uma lâmpada de cátodo oco que emite radiação no comprimento de onda específico do elemento níquel. A diferença de energia emitida pela fonte e a energia que chega ao detector, após absorção de parte dessa energia pelos átomos de níquel da solução atomizada, é proporcional à concentração de níquel presente na solução, sendo a concentração de Ni na solução proporcional a concentração de Ni no tecido vegetal.

O Laboratório de absorção atômica segue um procedimento operacional padrão (POP) baseado na normativa EPA (*Environmental Protection Agency*) METHOD 3052 para o tratamento preliminar de amostras sólidas para determinação de metais por espectroscopia de absorção atômica. A metodologia empregada para determinação de níquel nas plantas oriundas do projeto (objeto de estudo deste trabalho) segue esse POP. O teor de Ni é dosado em espectrofotômetro com forno de grafite. As etapas do procedimento, equipamentos, materiais utilizados e o programa de temperatura do forno são apresentados a seguir:

##### 3.1.1 Preparação da amostra

As amostras de plantas encaminhadas ao centro de ecologia passam por um procedimento inicial de lavagem com água corrente, água destilada e secagem em estufa à aproximadamente

60 °C. Após a secagem as plantas são moídas em moinho de facas, homogeneizadas e armazenadas em sacos plásticos até serem digeridas.

### **3.1.2 Digestão da amostra**

O método de digestão utilizado é o método de digestão em vaso fechado por aquecimento. O procedimento requer utilização de balança analítica para pesagem, ácido nítrico concentrado grau analítico p.a. de marca amplamente conhecida para digestão, bombas de pressão com tubo interno de teflon e estufa para aquecimento, funis de vidro e papel filtro quantitativo para filtração, balões volumétricos, pipetas graduadas e frascos de polietileno com tampa para armazenagem da solução resultante da digestão. Os equipamentos e vidrarias devem estar devidamente limpos e calibrados. A lavagem dos todos os materiais e vidrarias utilizados no procedimento é realizada mediante contato com solução de HNO<sub>3</sub> 30 % (v/v) por no mínimo 24 horas, após esse período os mesmos são enxaguados com água destilada.

Pesa-se aproximadamente 0,5 gramas de amostra seca, moída e homogênea diretamente no vaso de teflon anotando-se o valor exato da pesagem. Adiciona-se ao material pesado 2 ml de água destilada e 5 ml de ácido nítrico concentrado (HNO<sub>3</sub>), homogeniza-se a mistura e aguarda-se o desprendimento inicial dos gases para evitar vazamentos durante o processo de aquecimento. As bombas são fechadas com pressão padrão específica e são levadas ao aquecimento em estufa por 2 horas a uma temperatura de aproximadamente 90 °C. Após o aquecimento as bombas são resfriadas à temperatura ambiente e podem ser abertas com devido cuidado para evitar perda de material. Filtra-se o material digerido com papel filtro e transfere-se quantitativamente o filtrado para um balão volumétrico de 50 ml com o auxílio de um funil de vidro, ajustando o volume com água destilada. Homogeniza-se a solução e transfere-se para frascos de polietileno bem fechados. Paralelamente às digestões deve ser realizada a digestão de um branco com adição de todos os reagentes utilizados (2 ml água destilada + 5 ml HNO<sub>3</sub>) seguindo-se o mesmo procedimento realizado com as amostras. As amostras digeridas devem permanecer sob refrigeração a 4°C até a análise.

### **3.1.3 Determinação por espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite**

A determinação da concentração de Ni nas amostras digeridas por GF-AAS é realizada em espectrofotômetro da marca Perkin Elmer modelo SIMAA 6000 (*Simultaneous Multi-element A A Spectrometer*), equipado com amostrador automático (AS-72 PE), corretor de fundo

baseado no efeito Zeeman e tubos de grafite com plataforma integrada recobertos com grafite pirolítico. Utiliza-se gás argônio com pureza 99,998 % da marca White Martins-Praxair como gás de purga e lâmpada de cátodo oco (HCL-PE Lumina<sup>TM</sup>) de Ni como fonte de radiação. A Tabela I apresenta o comprimento de onda monitorado, a abertura da fenda do monocromador e a corrente da lâmpada.

**Tabela I** - Parâmetros instrumentais utilizados para determinação de Ni por GFAAS

Comprimento de onda (nm)	Corrente da lâmpada (mA)	Fenda espectral (nm)
232	25	0,2

As soluções de calibração para a análise são preparadas a partir de diluições adequadas de solução padrão de Tritisol<sup>®</sup> Merck contendo 1000 mg.L<sup>-1</sup> de Ni. A faixa de concentração da curva de calibração é de 0 – 50 µg.L<sup>-1</sup>. A curva de calibração é preparada diariamente e diretamente pelo amostrador automático (AS-72 PE), através de diluições apropriadas de uma solução estoque de níquel de 50 µg.L<sup>-1</sup> com HNO<sub>3</sub> 5 % (v/v). Solução de HNO<sub>3</sub> 5 % (v/v) é utilizada como diluente na preparação da curva de calibração pelo amostrador automático.

### 3.1.4 Programação da temperatura e alíquotas para análise

O programa de temperatura do forno e as alíquotas para análise seguem as recomendações e especificações do fabricante do equipamento para o tipo de metal e matriz analisados. O programa de aquecimento do forno é apresentado na Tabela II, sendo a absorbância medida mediante integração do sinal transiente (área do pico). O volume de solução da amostra ou da solução de calibração introduzida no tubo de grafite é de 20 µL.

**Tabela II** – Programa de aquecimento do forno de grafite.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C.s <sup>-1</sup> )	Tempo de permanência (s)	Vazão do gás (mL.min <sup>-1</sup> )
Secagem 1	110	5	20	250
Secagem 2	130	15	20	250
Pirólise	1200	10	30	250
Atomização	2400	0*	3	0
Limpeza	2550	1	3	250

\* leitura do sinal

### 3.1.5 Cálculos

Para o cálculo da concentração final de Ni acumulada no tecido vegetal das plantas na unidade  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  utiliza-se a Equação 1, sendo  $[Ni](\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$  a concentração de Ni encontrada na amostra digerida menos a concentração de Ni encontrada no branco, através da análise em espectrofotômetro na unidade micrograma por litro,  $BV(\text{ml})$  o volume do balão volumétrico utilizado para avolumar o material digerido em mililitros e  $Peso(\text{g})$  a quantidade de amostra digerida em gramas.

$$[Ni](\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}) = \frac{[Ni](\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}) \times \frac{BV(\text{ml})}{1000}}{Peso(\text{g})} \quad (1)$$

### 3.2 CONFIABILIDADE ANALÍTICA E VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Segundo Albano e Raya-Rodriguez (18) conforme a norma NBR ISO/IEC 17025 (19) uma vez que uma metodologia é selecionada para realizar um ensaio laboratorial se faz necessário a verificação da confiabilidade analítica do ensaio. O processo de validação é capaz de avaliar se as condições do laboratório, a equipe de analistas, os materiais de referência utilizados e os instrumentos analíticos existentes são adequados à finalidade proposta, garantindo a qualidade do ensaio e assegurando a confiabilidade analítica dos resultados.

Um método de ensaio químico pode ser validado através de evidência objetiva da validação do método analítico. Essa evidência pode ser obtida realizando-se um estudo dos parâmetros analíticos envolvidos na realização do ensaio. (18)

Para verificar a confiabilidade analítica e garantir a qualidade do ensaio químico de determinação de níquel em tecido vegetal por espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite foi realizado um estudo para obtenção dos seguintes parâmetros analíticos: limite de detecção do equipamento, limite de detecção do método, limite de quantificação, linearidade da curva de calibração, exatidão, repetitividade e reprodutibilidade do método. Estes parâmetros analíticos foram obtidos através de testes estatísticos conforme Albano e Raya-Rodriguez (18).

### **3.2.1 Linearidade da curva de calibração**

Para um método quantitativo a linearidade expressa uma relação linear entre o analito e resposta do sinal medido. A faixa linear de trabalho é definida como a faixa de concentrações do analito na qual o método pode ser aplicado com precisão, exatidão e sensibilidade constante.

Após a escolha da faixa de trabalho de um método de ensaio a faixa linear de trabalho pode ser avaliada. Os limites de detecção e de quantificação determinarão seu limite inferior, e o limite superior irá depender do sistema de resposta do equipamento utilizado para a medição.

Os requisitos para que uma curva de calibração seja considerada linear incluem a obtenção do coeficiente de regressão ( $R^2$ ) que deve ser maior que 0,99 e do coeficiente de correlação linear ( $r$ ) que deve ser maior que 0,9 obtidos através de regressão linear. Além disso deve-se calcular os resíduos da regressão (valores medidos - valores esperados). O gráfico do perfil dos resíduos deve possuir uma ordem aleatória e indicar ausência de tendências e erros sistemáticos ao longo da faixa. A incerteza relativa à curva de calibração do equipamento será determinada pelo desvio padrão dos resíduos.

Neste trabalho a linearidade da curva de calibração foi avaliada analisando-se no espectrofotômetro 7 concentrações diferentes de solução padrão de Ni em triplicata ao longo da faixa de trabalho aplicando-se a regressão linear considerando a concentração do padrão analisado no eixo “x” e a resposta analítica (absorbância) no eixo “y”, analisando-se o perfil dos resíduos de regressão e determinando-se a incerteza relativa à curva de calibração.

### **3.2.2 Limite de detecção do equipamento (LDE)**

O limite de detecção do equipamento pode ser definido como o menor valor detectado por um equipamento (eletrônico, instrumental, etc.) em função de seu ruído de fundo. O limite de detecção de um equipamento corresponde à concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes a razão sinal/ruído do equipamento. Neste trabalho o LDE foi calculado através da média das absorbâncias obtidas no espectrofotômetro de 7 replicatas de material branco sem analito somada a três desvios padrão das leituras das replicatas.

### **3.2.3 Limite de detecção do método (LDM)**

O limite de detecção do método pode ser definido como a concentração mínima do analito que pode ser determinada com 95% ou 99% de confiança de que sua concentração é maior do que zero. Neste trabalho o LDM foi calculado através da média das absorbâncias obtidas no

espectrofotômetro de 7 replicatas de material branco com analito somada ao desvio padrão das leituras das replicatas multiplicado pelo valor de  $t$  tabelado obtido a partir da distribuição de *Student* (unilateral) para 99% de confiança (18).

### **3.2.4 Limite de Quantificação (LQ)**

O limite de quantificação pode ser definido como a menor concentração do analito que pode ser medida com precisão e exatidão aceitável. Neste trabalho o LQ foi calculado através da média das absorvâncias obtidas no espectrofotômetro de 7 replicatas de material branco com analito somada a dez desvios padrão das leituras das replicatas.

### **3.2.5 Repetitividade (REPE) e Reprodutibilidade (REPRO)**

A repetitividade de um método analítico reflete o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo analito, efetuadas sob as mesmas condições de medição (mesmo procedimento de medição, mesmo observador, mesmo instrumento de medição, repetição em curto período de tempo, etc.).

A reprodutibilidade de um método analítico reflete o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo analito, efetuadas sob condições variadas de medição (diferentes analistas, diferentes equipamentos, diferentes condições ambientais, etc.).

Neste trabalho realizou-se um estudo rápido de repetitividade e reprodutibilidade com o objetivo de avaliar a precisão do método.

### **3.2.6 Exatidão**

A exatidão é o grau de concordância entre o resultado de uma medida experimental e o valor de referência aceito convencionalmente como verdadeiro, indicando a existência ou não de erro sistemático (troca de amostra controle, valor incorreto de padrão, reagentes mal preparados, variação na temperatura, leituras em comprimento de onda diferente do recomendado, etc.).

A exatidão de um método pode ser determinada de diversas formas. Neste trabalho avaliou-se a exatidão do método por comparação dos resultados das análises obtidos pela técnica a ser avaliada (GFAAS) com os resultados obtidos por uma técnica de exatidão conhecida (ICP-OES). A escolha da técnica de ICP-OES deveu-se ao fato de tratar-se de uma técnica

amplamente usada em laboratórios analíticos. O teste de exatidão foi executado com o auxílio do *software Microsoft Excel*<sup>®</sup> utilizando-se o Teste-T (amostras em par para médias).

### 3.2.7 Procedimento Experimental

Para obtenção dos parâmetros analíticos elegeu-se arbitrariamente uma amostra pertencente ao projeto para realizar o estudo de validação da metodologia. A amostra selecionada aleatoriamente foi a amostra número 129 pertencente a requisição de serviço número 024\2011, a amostra foi coletada na estação de exposição denominada ponto 5 e recebida pelo laboratório dia 10/05/11.

Seguiu-se o mesmo procedimento de preparação de amostra descrito anteriormente no item 3.1.1 para obtenção e homogeneização da amostra utilizada no estudo de validação.

Foram realizadas 7 digestões desta amostra e uma digestão de material branco (2 ml de água destilada + 5 ml de ácido nítrico concentrado). As digestões foram realizadas independentemente em dias alternados conforme procedimento de digestão descrito no item 3.1.2. A digestão do branco foi realizada em paralelo à digestão da última via de amostra. A tabela III mostra a quantidade de amostra (em gramas) pesada para realização das digestões, os pesos foram utilizados para o cálculo da concentração final de Ni para cada replicata da amostra.

**Tabela III** - Quantidade de amostra pesada para cada replicata de amostra digerida

<b>Replicata/Digestão</b>	<b>peso (g)</b>
1	0,5360
2	0,5012
3	0,5030
4	0,5028
5	0,5049
6	0,5014
7	0,5018

A escolha da faixa de concentrações para avaliação da linearidade da curva de calibração do espectrofotômetro foi baseada nos limites de detecção do equipamento e do método, e no histórico dos resultados das análises de Ni das plantas expostas no ponto 5 durante a vigência do projeto. Para a avaliação da linearidade da curva de calibração foram preparadas soluções padrão de Ni nas seguintes concentrações (1, 5, 10, 20, 30, 50 e 70 µg/L) em triplicata, todas as soluções foram preparadas a partir de diluições de uma solução padrão de Tritisol<sup>®</sup> Merck

contendo  $1000 \text{ mg.L}^{-1}$  de Ni. As soluções foram preparadas em balões volumétricos calibrados e utilizou-se pipetador automático calibrado para pipetagem dos volumes. Cada uma do total das 21 soluções padrão preparadas foram analisadas no modo absorvância do espectrofotômetro especificado no item 3.1.3 utilizando as condições de análise descritas no item 3.1.4.

Os limites de detecção do método e do equipamento bem como o limite de quantificação do método foram determinados a partir dos dados obtidos no modo absorvância do espectrofotômetro analisando-se 7 amostras preparadas com material branco sem adição de analito (solução  $\text{HNO}_3$  5% v/v) para o LDE e 7 amostras preparadas com material branco com adição de analito ( $1 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  de Ni em solução  $\text{HNO}_3$  5% v/v) para o LDM e LQ.

Após o termino das digestões dosou-se o teor de níquel das 7 replicatas da amostra digerida e do branco, no espectrofotômetro conforme itens 3.1.3 e 3.1.4.

Passados alguns dias da primeira leitura das amostras no espectrofotômetro, a leitura das amostras foi repetida, em condições idênticas as da leitura anterior com exceção da curva de calibração que foi construída no dia, imediatamente antes da análise, tendo como objetivo a avaliação da repetitividade e a reprodutibilidade do método.

Posteriormente, para avaliar a exatidão do método as amostras digeridas foram encaminhadas à Central Analítica do Instituto de Química da UFRGS para dosagem de níquel utilizando a técnica de ICP-OES. O equipamento utilizado foi um espectrômetro ICP-OES, modelo Optima™ 2000 DV, da marca Perkin Elmer. Argônio comercial (White Martins/Praxair) foi utilizado para a geração do plasma, como gás de nebulização e auxiliar. Como gás de purga do sistema óptico do equipamento foi utilizado nitrogênio com pureza de 99,996% da marca White Martins/Praxair. Os parâmetros instrumentais utilizados são listados na tablea IV.

**Tabela IV** – Parâmetros instrumentais usados nas determinações por ICP-OES

Potência de radiofrequência	1300 W
Vazão do gás principal	$15 \text{ L.min}^{-1}$
Vazão do gás auxiliar	$0,2 \text{ L.min}^{-1}$
Vazão do gás de nebulização	$0,8 \text{ L.min}^{-1}$
Nebulizador	Ultrassônico (US - 5000 AT CETAC) $T=140 \text{ }^\circ\text{C}$ ; $-4^\circ\text{C}$
Vista de observação	Alta
Resolução	Automático, 2,5 s a 5,0 s
Vazão da amostra	$2,0 \text{ mL. min}^{-1}$
Comprimento de onda	231,604 nm

A partir dos resultados das determinações da concentração de Ni nas soluções das replicatas de amostra digerida e no branco por GFAAS e ICP-OES obtidos na unidade  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , foi calculado o teor de Ni em  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de tecido vegetal, para cada uma das replicatas da amostra utilizando-se a Equação 1, descrita no item 3.1.5.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo dos parâmetros analíticos para validação do método de determinação de Ni em plantas por espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite, bem como os resultados obtidos e a discussão dos valores encontrados são apresentados a seguir:

### 4.1 LINEARIDADE DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

A Tabela V mostra os dados experimentais obtidos para avaliação da linearidade da curva de calibração do espectrofotômetro. A partir dos valores de absorbância encontrados para as triplicatas das soluções padrão analisadas foi construído o gráfico de regressão linear (Fig. 3) relacionando-se a concentração do padrão analisado, eixo “x”, com a resposta analítica (absorbância), eixo “y”. Ajustando-se os dados ao modelo de regressão linear obteve-se a equação da reta ( $y = 0,0027x + 0,0046$ ) com um coeficiente de correlação linear (R) igual a 0,9996 e coeficiente de regressão ( $R^2$ ) igual a 0,9992, Os resíduos da regressão (Erro) foram calculados através da diferença entre os valores de absorbância medidos e os valores de absorbância calculados pela reta ajustada. Estes dados também são apresentados na Tabela V e foram utilizados para a construção do gráfico do perfil dos resíduos (Fig. 4). O desvio padrão dos resíduos foi calculado, sendo utilizado como a fonte de incerteza relativa à curva de calibração do equipamento obtendo-se o valor de 0,0019.

**Tabela V** – Dados experimentais obtidos para avaliação da linearidade da curva de calibração do equipamento

<b>Pontos</b>	<b>Padrão</b>	<b>Absorbância</b>	<b>Resultado esperado (reta)</b>	<b>Erro (resíduo)</b>
1	1,00	0,0055	0,0073	-0,0018
2	1,00	0,0060	0,0073	-0,0013
3	1,00	0,0081	0,0073	0,0008
4	5,00	0,0199	0,0181	0,0018
5	5,00	0,0160	0,0181	-0,0021
6	5,00	0,0171	0,0181	-0,0010
7	10,00	0,0308	0,0316	-0,0008
8	10,00	0,0302	0,0316	-0,0014
9	10,00	0,0321	0,0316	0,0005
10	20,00	0,0613	0,0586	0,0027
11	20,00	0,0599	0,0586	0,0013
12	20,00	0,0615	0,0586	0,0029
13	30,00	0,0877	0,0856	0,0021
14	30,00	0,0883	0,0856	0,0027
15	30,00	0,0836	0,0856	-0,0020
16	50,00	0,1411	0,1396	0,0015
17	50,00	0,1382	0,1396	-0,0014
18	50,00	0,1367	0,1396	-0,0029
19	70,00	0,1954	0,1936	0,0018
20	70,00	0,1918	0,1936	-0,0018
21	70,00	0,1950	0,1936	0,0014
			<b>Sr</b>	<b>0,0019</b>

Sr = Desvio padrão dos resíduos (incerteza)

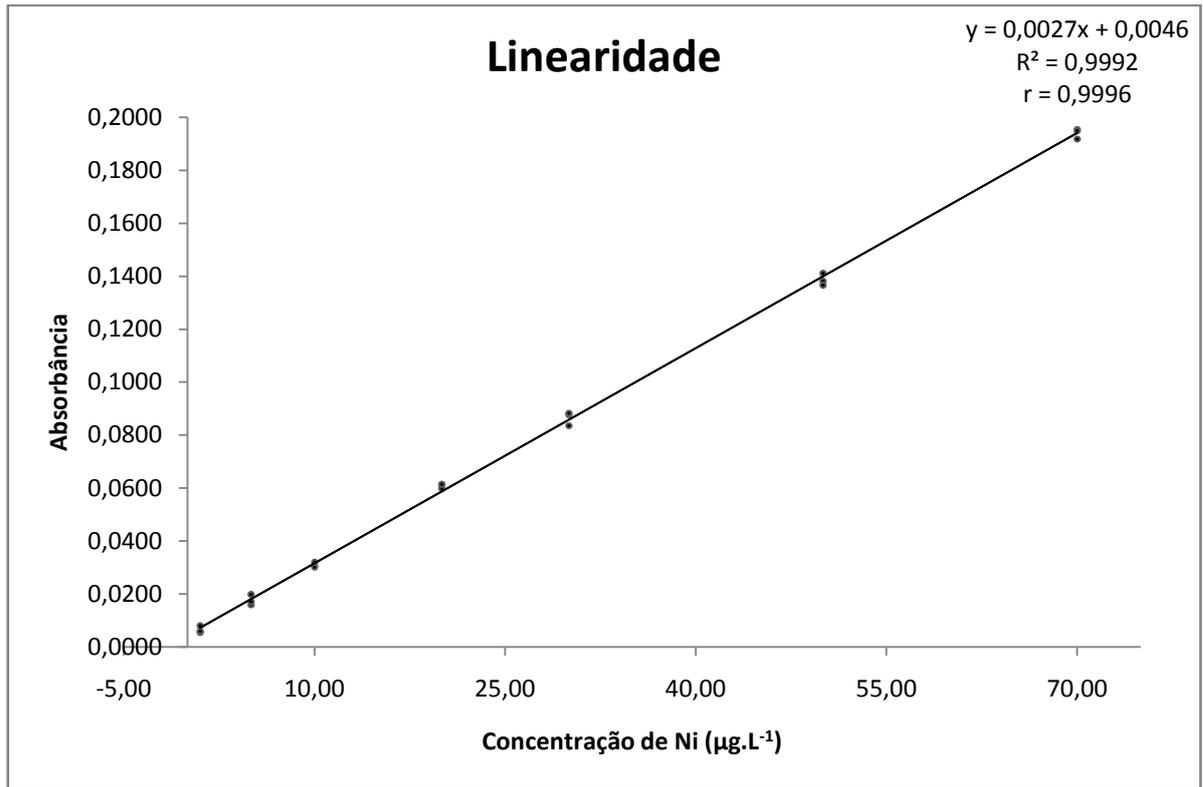


Figura 3 – Gráfico de regressão linear

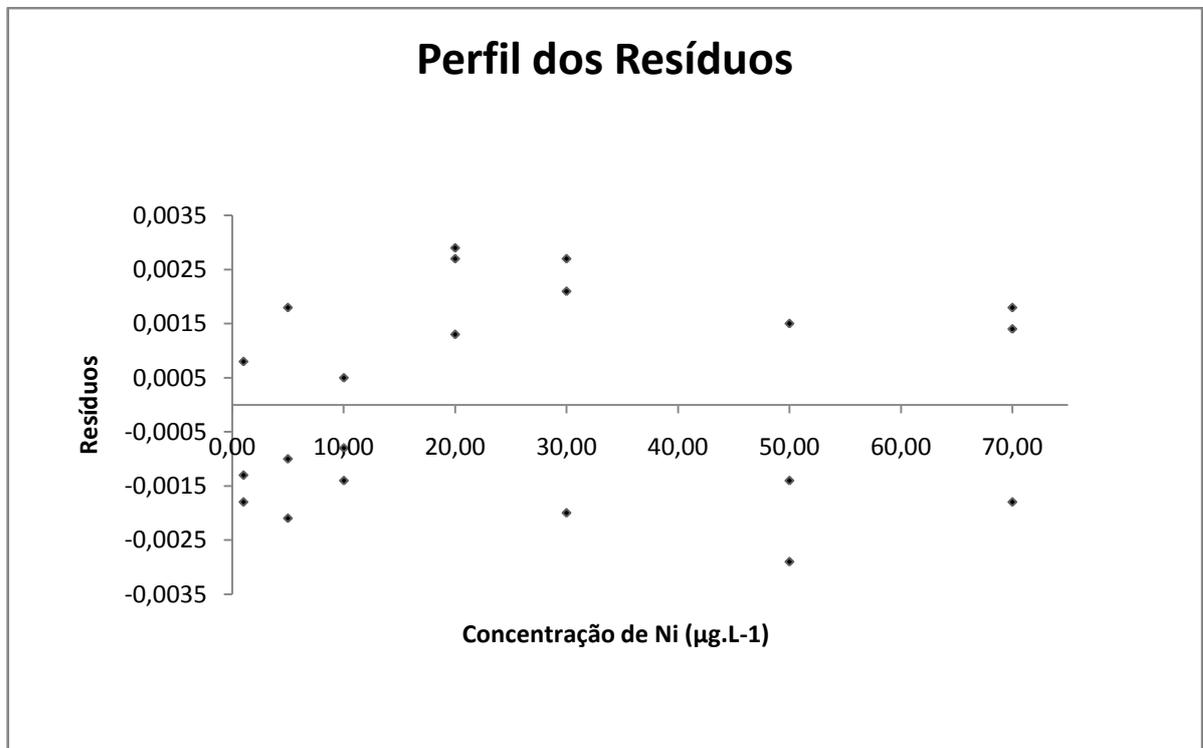


Figura 4 – Gráfico do perfil dos resíduos da regressão

Analisando-se o Gráfico de regressão linear (Fig. 3) e o Gráfico do perfil dos resíduos da regressão (Fig. 4) pode-se concluir que para a faixa de concentração estudada (de 1  $\mu\text{g.L}^{-1}$  a 70  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) a resposta analítica do equipamento (absorbância) tem uma relação linear com a concentração do analito, pois os coeficientes de regressão ( $R^2$ ) e de correlação linear (R) da curva obtida através do ajuste dos dados experimentais do estudo da linearidade ao modelo de regressão linear apresentam valores acima de 0,99, satisfazendo o critério de linearidade. Além disso, nota-se que o Gráfico do perfil dos resíduos (Fig. 4) apresenta uma distribuição aleatória dos pontos indicando ausência de tendências e erros sistemáticos ao longo da faixa. Portanto conclui-se que a técnica de determinação de Ni por GFAAS apresenta sensibilidade constante na faixa de concentração da curva de calibração gerada pelo equipamento para realização de análises na faixa estudada (de 1  $\mu\text{g.L}^{-1}$  a 70  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), apresentando uma incerteza de 0,0019  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , e portanto apresenta linearidade na faixa de interesse do método a ser validado.

#### 4.2 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

O Limite de detecção do equipamento, o Limite de detecção do método e o Limite de quantificação para a determinação de Ni por GFAAS foram determinados através da análise de 7 replicatas de amostras preparadas com material branco sem adição de analito para LDE e com adição de analito (1  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de Ni) para LDM e LQ no modo absorbância do espectrofotômetro. Os valores de absorbância encontrados bem como a média e o desvio padrão (S) das replicatas estão relacionados na tabela VI.

**Tabela VI** – Dados experimentais obtidos para estudo dos limites de detecção e de quantificação

<b>Replicatas (branco)</b>	<b>Valores para LDE (absorbância)</b>	<b>Replicatas (branco + analito)</b>	<b>Valores para LDM e LQ (absorbância)</b>
1	0,0031	1	0,0062
2	0,0031	2	0,0058
3	0,0018	3	0,0055
4	0,0027	4	0,0052
5	0,0019	5	0,0053
6	0,0033	6	0,0061
7	0,0015	7	0,0064
Média	0,00249	Média	0,00579
Desvio (S)	0,000736	Desvio (S)	0,000467

O cálculo do LDE foi efetuado somando-se a média das absorvâncias das 7 replicatas do branco sem analito a três desvios padrão das replicatas. O cálculo do LDM foi efetuado através da média das absorvâncias das 7 replicatas do branco com analito somada ao desvio padrão das replicatas multiplicado pelo valor de  $t$  tabelado obtido a partir da distribuição de *Student* (17) unilateral para 99% de confiança ( $t = 3,143$ ). O cálculo do LQ foi efetuado somando-se a média das absorvâncias das 7 replicatas do branco com analito a dez desvios padrão das replicatas.

Os valores de LDE, LDM e LQ calculados através dos valores de absorvância obtidos experimentalmente foram transformados para  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , utilizando-se a equação de regressão linear apresentada no item 4.1 ( $y = 0,0027x + 0,0046$ ), e para adequar os resultados obtidos ao tipo de amostra (plantas) os resultados foram convertidos para a unidade  $\mu\text{g.g}^{-1}$ , utilizando-se a (Eq. 1) do item 3.1.5 considerando-se nesse cálculo a quantidade aproximada de amostra digerida (0,5 g).

A tabela VII apresenta os limites de detecção do equipamento e do método bem como o limite de quantificação para método de determinação de Ni em tecido vegetal por GFAAS.

**Tabela VII** – Valores encontrados para limite de detecção do equipamento, limite de detecção do método e limite de quantificação mostrando os resultados em absorvância,  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e  $\mu\text{g.g}^{-1}$ , respectivamente.

LDE	LDM	LQ
0,0047 (absorvância)	0,0072 (absorvância)	0,0105 (absorvância)
0,034 ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	0,983 ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	2,17 ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )
0,0034 ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ )	0,0983 ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ )	0,217( $\mu\text{g.g}^{-1}$ )

O teor de Ni normalmente encontrado em tecido vegetal seco varia de 0,1 a 5  $\mu\text{g.g}^{-1}$  aproximadamente, de acordo com dados da literatura (8). Analisando os resultados encontrados para os limites de detecção do equipamento (0,0034  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) e do método (0,098  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) e o limite de quantificação (0,217  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) conclui-se que a técnica analítica de determinação de Ni por GFAAS é aplicável para quantificação do teor de Ni em tecido vegetal, pois é capaz de detectar o teor de Ni acumulado em plantas, além de determinar com confiabilidade analítica concentrações de Ni a partir de 0,217  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de tecido vegetal.

#### 4.3 ESTUDO RÁPIDO DE REPETITIVIDADE E REPRODUTIBILIDADE

Segundo Albano e Raya-Rodriguez (18) o estudo rápido da repetitividade e reprodutibilidade de um método permite avaliar a variabilidade da repe e da repro. Neste trabalho o estudo

rápido da repetitividade e da reprodutibilidade foi utilizado para avaliar a precisão do método de determinação de Ni em tecido vegetal utilizando a técnica analítica de GFAAS e também para avaliar o sistema de medição do laboratório. O critério para avaliação da repetitividade do método foi a análise no espectrofotômetro, sob condições idênticas, de 5 digestões independentes da mesma amostra. O critério para avaliação da reprodutibilidade foi a repetição desta análise utilizando o mesmo equipamento, em dia diferente e em curva de calibração diferente. A tabela VIII mostra os resultados da determinação do teor de Ni em  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de tecido vegetal de 5 replicatas da amostra 129 realizadas no mesmo equipamento em dias diferentes, utilizando curvas de calibração diferentes.

**Tabela VIII** – Resultados do estudo da Repe e da Repro do método: 5 digestões independentes da mesma amostra, realizadas em dias diferentes e em curvas diferentes, mostrando a amplitude entre os resultados das análises e a média das amplitudes.

Digestões	Dia 1 – curva 1	Dia 2 – curva 2	Amplitude (R)
1	0,308	0,299	0,009
2	0,302	0,308	0,006
3	0,305	0,313	0,008
4	0,307	0,318	0,011
5	0,317	0,328	0,011
<b>R<sub>média</sub></b>			<b>0,009</b>

Resultados em  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de Ni

Para avaliar a variabilidade da repe e da repro procedeu-se conforme procedimento descrito na literatura (18): Estimou-se o desvio de medição ( $\sigma_m$ ) dividindo o valor médio da amplitude (0,009) das análises por 1,19 (valor estimado com base no critério e no número de componentes de variabilidade, no caso, 5 replicatas da mesma amostra analisadas em 2 dias/curvas diferentes) encontrando-se um desvio de medição igual a 0,00756. A próxima etapa foi a obtenção da variação da repe e da repro (R&R) obtida multiplicando-se o valor do desvio de medição por 5,15 (para 99% de confiança), obtendo-se um valor de R&R igual a 0,0389. Posteriormente calculou-se o % de R&R, dividindo seu valor pela variabilidade total (VT) do ensaio em questão. O valor de VT foi estimado através do desvio padrão da carta controle do ensaio. A carta controle do ensaio é obtida pelo Laboratório através do histórico dos resultados das análises de solução padrão de Ni ( $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) no espectrofotômetro. A carta controle gerada pelo Laboratório possui um desvio padrão com o valor de 0,295. Estimando-se a variabilidade do ensaio por 6 vezes este desvio obteve-se um valor de VT igual a 1,770. Calculou-se então o valor percentual de variação da repe e da repro, R&R(%), obtendo-se o valor de 2,20%.

De acordo com AIAG em MSA de 2002 (20) a faixa de aceitação para o R&R(%) é estimada de acordo com a tabela IX:

**Tabela IX** – Faixa de aceitação do percentual de variação da repe e da repro R&R(%)

<b>R&amp;R(%)</b>	<b>Interpretação</b>
< 10%	Aceitável
10% até 30%	Até pode ser aceito, mas necessita de melhorias
> 30%	Inaceitável

Analisando a Tabela IX conclui-se que o método de determinação de Ni em tecido vegetal utilizando a técnica analítica de GFAAS apresenta variabilidade de repetitividade e reprodutibilidade dentro dos padrões aceitáveis, pois o valor de R&R(%) determinado para o ensaio foi de 2,20%, menor do que 10%, portanto, pelos critérios estabelecidos, a variabilidade da repe e da repro está dentro da faixa de aceitação podendo-se concluir que o método apresenta precisão aceitável.

#### 4.4 EXATIDÃO

A avaliação da exatidão do método de determinação de Ni em tecido vegetal por GFAAS foi realizada através da comparação dos resultados da análise de 7 replicatas da amostra 129 pela técnica a ser validada com os resultados obtidos por uma técnica de exatidão conhecida (ICP-OES). Como a análise das replicatas por GFAAS foi realizada 2 vezes para a avaliação da repe e da repro do método, considerou-se a média dos resultados das 2 análises para o estudo da exatidão do método. A Tabela X apresenta os resultados das 2 análises realizadas por GFAAS e a média dos 2 resultados e os resultados da análise realizada por ICP-OES.

**Tabela X** – Resultados obtidos por GFAAS e por ICP-OES em  $\mu\text{g.g}^{-1}$

<b>Replicatas</b>	<b>Resultados GFAAS dia 1 - curva 1</b>	<b>Resultados GFAAS dia 2 - curva 2</b>	<b>Média Resultados GFAAS</b>	<b>Resultados ICP-OES</b>
<b>1</b>	0,308	0,299	0,304	0,391
<b>2</b>	0,302	0,308	0,305	0,280
<b>3</b>	0,305	0,313	0,309	0,308
<b>4</b>	0,307	0,318	0,313	0,361
<b>5</b>	0,317	0,328	0,323	0,373
<b>6</b>	0,319	0,301	0,310	0,292
<b>7</b>	0,305	0,333	0,319	0,364

A partir dos dados da Tabela X foi realizado o Teste-t – amostras em par para médias do Excel, que compara duas médias da mesma amostra analisadas por dois métodos diferentes. Para realização do teste considerou-se a média dos resultados obtidos por GFAAS como Intervalo da variável 1 e os resultados obtidos por ICP-OES como Intervalo da variável 2. Padronizou-se a hipótese da diferença de média como sempre igual a zero e estabeleceu-se 95% de confiança no teste ( $\alpha = 0,05$ ). O resultado do teste é apresentado na Tabela XII.

**Tabela XII** – Resultado do Teste-t – amostras em par para médias do Excel

	<b>Variável 1</b>	<b>Variável 2</b>
<b>Média</b>	<b>0,312</b>	<b>0,338</b>
Variância	4,88095E-05	0,001936286
Observações	7	7
Correlação de Pearson	0,3793	
Hipótese da diferença de média	0	
Gl	6	
<b>Stat t</b>	<b>-1,6932</b>	
P(T<=t) uni-caudal	0,0707	
t crítico uni-caudal	1,9432	
P(T<=t) bi-caudal	0,1414	
<b>t crítico bi-caudal</b>	<b>2,4469</b>	

O critério de avaliação e interpretação do Teste-t considera duas hipóteses: Se o valor de Stat t (correspondente ao t calculado) for menor (em módulo) do que o t crítico bi-caudal, é uma evidência de os métodos analisados NÃO possuem diferenças significativas entre seus resultados. Se Stat t (correspondente ao t calculado) for maior (em módulo) do que o t crítico bi-caudal, é uma evidência de que os métodos analisados possuem diferenças significativas entre seus resultados. O resultado do teste é apresentado na Tabela XII.

Analisando a tabela XII e os valores de Stat t e t crítico bi-caudal calculados através do Teste t - amostras em par para médias do Excel, podemos concluir que os métodos não possuem diferenças significativas entre seus resultados, pois o valor de Stat t é menor em módulo do que o valor de t crítico bi-caudal, satisfazendo o critério da hipótese que considera os métodos como semelhantes. Portanto conclui-se que o método de determinação de Ni em tecido vegetal utilizando a técnica analítica de GFAAS apresenta exatidão aceitável.

## 5 CONCLUSÃO

O estudo dos limites de detecção e de quantificação do método revelou que o método é capaz de detectar o teor de Ni acumulado em tecidos vegetais e determinar com confiabilidade analítica sua concentração em plantas acumuladoras de interesse ambiental. O estudo da linearidade da curva de calibração verificou que a resposta analítica do equipamento utilizado para as determinações (espectrofotômetro) tem uma relação linear com a concentração do analito, apresentando sensibilidade constante na faixa de interesse do método. O estudo da repetitividade e da reprodutibilidade do método permitiu avaliar a precisão do método e o sistema de medição do laboratório como satisfatórios. O estudo da exatidão do método evidenciou que os resultados obtidos pelo método a ser validado possuem exatidão aceitável quando comparados aos resultados obtidos por outro método de exatidão conhecida. Dessa forma, os parâmetros analíticos necessários para avaliar a confiabilidade analítica dos resultados e garantir a qualidade do ensaio foram obtidos com sucesso, possibilitando então a confirmação do desempenho do método de determinação de Ni em tecido vegetal por espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite.

## 6 REFERÊNCIAS

1. ELLENBERG, H. et al. **Biological Monitoring**: Signals from the Environment. Braunschweig: Vieweg, 1991.
2. ZURITA, M. L. L. (Org.); TOLFO, A. M. (Org.). **A qualidade do ar em Porto Alegre**. Porto Alegre: Secretaria Municipal do Meio Ambiente, 2000. p. 10-13.
3. DIVAN Jr. et al. *Psidium guajava* as a bioaccumulator of nickel around na oil refinery, southern Brasil. **Ecotoxicology and Environmental Safety** **73**, 2010. 647-654.
4. ARNDT, U.; SCHWEISER, B. The use of bioindicators for environmental monitoring in tropical and subtropical countries. In: ELLENBERG, H. et al. **Biological Monitoring**: Signals from the Environment. Braunschweig: Vieweg, 1991. p. 199-253.
5. RAYA-RODRIGUEZ, M. T. O uso de bioindicadores para avaliação da qualidade do ar em Porto Alegre. In: ZURITA, M. L. L. (Org.); TOLFO, A. M. (Org.). **A qualidade do ar em Porto Alegre**. Porto Alegre: Secretaria Municipal do Meio Ambiente, 2000. p. 68-76.
6. ELLENBERG, H. Bioindicators and Biological Monitoring. In: ELLENBERG, H. et al. **Biological Monitoring**: Signals from the Environment. Braunschweig: Vieweg, 1991.
7. ALLEN, S. E. **Chemical analisys ecological materials** 2. ed. Oxford: Blackwell scientific publications, 1989. p. 213-214.
8. MITCHELL, R.L. **Cobalt and nickel in soils and plants**. Baltimore: Soil science, 1945. v. 60. p. 63-70.
9. ADRIANO, D.C. **Trace elements in the terrestrial environment**. New York: Springer-Verlag, 1986. 533p.
10. PAIVA, H. N. Efeito da aplicação de doses crescentes de níquel sobre o teor e o conteúdo de nutrientes em mudas de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standley) **Scientia Florestalis** n. **63**, 2003. p. 158-166, jun. 2003. Disponível em: <[www.ipef.br/publicacoes/scientia/nr63/cap13.pdf](http://www.ipef.br/publicacoes/scientia/nr63/cap13.pdf)>. Acesso em: 02 nov. 2011.
11. HEWITT, E.J. **Metal interrelationships in plant nutrition**: Effects of some metal toxicities on sugar beet, tomato, oat, potato and arrow stem kale grow in sand culture. Oxford: Journal of Experimental Botany, 1953. v.4. p. 59-64.
12. FRESCHI, G. P. G. et al . Espectrometria de absorção atômica multielementar simultânea com atomização eletrotérmica em forno de grafite - uma revisão da técnica e aplicações. **Eclét. Quím.** São Paulo, 2011 . Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-46702000000100017&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-46702000000100017&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 26 Out. 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-46702000000100017>.
13. ALLEN, S. E. **Chemical analisys ecological materials** 2. ed. Oxford: Blackwell scientific publications, 1989. p. 46-61.

14. RIDDLE, C. **Analysis of geological materials**. Marcel Dekker, Inc., New York, 1993. 463 p.
15. SILVA Jr. A. I. ; BIDART, A. M. F.; CASELLA, R. J. **Absorção atômica**. Disponível em: <[http://www.ifrj.edu.br/webfm\\_send/545](http://www.ifrj.edu.br/webfm_send/545)> Acesso em: 02 Nov. 2010. 17 p.
16. RIBEIRO, C. M. C. M. **Estabelecimento de uma rotina laboratorial para análise química de sedimentos e sua aplicação a sedimentos continentais do Minho (NW Portugal)**: contribuição para a reconstituição paleoambiental da região, 2006. cap. 5. Dissertação (Mestrado em Ciências do Ambiente - Área de Especialização em Qualidade Ambiental) – Universidade do Minho, Portugal, 2006. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1822/7381>> Acessado em: 02 Nov. 2011.
17. BOSS, C. B.; FREDEEN, K.J. **Concepts, instrumentation, and techniques in Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry**. Perkin Elmer, USA, 1989. 104 p
18. ALBANO, F. M.; RAYA-RODRIGUEZ M. T. **Validação e Garantia da Qualidade de Ensaios Laboratoriais** – Guia Prático. Rede Metrológica RS, Porto Alegre, 2009. 136 p.
19. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO/IEC 17025**: Requisitos gerais para competências de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2005.
20. AUTOMOTIVE INDUSTRY ACTION GROUP (AIAG). **Measurement Systems Analysis (MSA)**. 3.ed. Detroit: Chrysler corporation, Ford Motor Company and General Motors Corporation, 2002.