



**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE
MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA TECNOLÓGICA**

**ESTUDO DA VALIDAÇÃO DE MÉTODO
ANALÍTICO APLICADO À DETERMINAÇÃO DE
ÍONS CHUMBO EM ÁGUAS DE DIÁLISE POR
ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA
COM FORNO DE GRAFITE**

Larissa Noemí Silva

**Belo Horizonte-MG
2010**



**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE
MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA TECNOLÓGICA**

**ESTUDO DA VALIDAÇÃO DE MÉTODO
ANALÍTICO APLICADO À DETERMINAÇÃO DE
ÍONS CHUMBO EM ÁGUAS DE DIÁLISE POR
ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA
COM FORNO DE GRAFITE**

Larissa Noemí Silva

Monografia apresentada ao Curso de Química Tecnológica do CEFET-MG como parte das exigências da disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II (TCC II).

Orientador: Prof. Dr. Patterson Patricio de Souza

Co-orientador: Dr. Luiz Carlos Moutinho Pataca

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Patterson Patricio de Souza (orientador)

Prof^a. Msc. Janice Cardoso Pereira

Prof. Dr. Cleverson Fernando Garcia

Monografia aprovada em 08 de julho de 2010.

**Belo Horizonte-MG
2010**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter condicionado cada conquista e guiado meus dias. Aos meus pais e irmãs, por compreenderem minhas ausências. Ao Gustavo, meu namorado, pela paciência e carinho. À Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, pelo fornecimento do material utilizado neste estudo. À Andréa e demais colegas do CETEC, pela disposição em me ajudar. Ao Patterson (orientador) e ao Luiz Carlos (co-orientador) pelo apoio e pelas críticas construtivas. Aos demais amigos e familiares.

LISTA DE ABREVIATURAS

ISO	Padrão Internacional de Organização, do inglês <i>International Standard Organization</i>
AAMI	Associação para o Avanço da Instrumentação Médica, do inglês <i>Association for the Advancement of Medical Instrumentation</i>
HCFA	Administração de Financiamento de Cuidados Médicos, do inglês <i>Health Care Financing Administration</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
EU	Unidades de Endotoxina, do inglês <i>Endotoxin Units</i>
STPF	Forno Plataforma com Temperatura Estabilizada, do inglês <i>Stabilized Temperature Platform Furnace</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
FT	Faixa de Trabalho
AOAC	Associação de Químicos Analíticos Oficiais, do inglês <i>Association of Official Analytical Chemists</i>
MRC	Materiais de Referência Certificados
CV	Coeficiente de Variação
PA	Para análise
ICP	Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês <i>Inductively Coupled Plasma</i>
Abs.	Absorbância
Conc.	Concentração
gl	Graus de liberdade
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia, do inglês <i>National Institute of Standards and Technology</i>
Sr	Desvio padrão de repetitividade

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação gráfica de limites de concentração classe-ISO para classes ISO selecionadas.	15
Figura 2 -	a) Elétron excitado a um estado de maior energia. b) Energia liberada no meio após um intervalo de tempo Δt , e retorno do elétron a seu estado fundamental.	16
Figura 3 -	Representação da etapa de secagem.	17
Figura 4 -	Representação da etapa de pirólise.	17
Figura 5 -	Representação da etapa de atomização.	17
Figura 6 -	Plataforma de L'vov e sua posição no forno de grafite.	19
Figura 7 -	Esquema de um processo de validação de método.	21
Figura 8 -	Respresentação de uma distribuição normal, contendo os valores de Z-scores.	35
Figura 9 -	Gráfico da programação de temperatura do forno de grafite.	37
Figura 10 -	Gráfico comparativo da absorbância versus concentração do analito em matriz de ácido nítrico 0,2% v v ⁻¹ e usando a amostra como matriz.	43
Figura 11 -	Curva analítica de chumbo em matriz HNO ₃ 0,2% v v ⁻¹ .	46
Figura 12 -	Gráfico da resposta relativa versus concentração admitindo diferentes valores de recuperação.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Padrões microbiológicos e de endotoxinas para líquidos de diálise, estabelecidos pela AAMI e adotados pela HCFA.	7
Tabela 2 -	Bactérias comumente encontradas na água de diálise.	7
Tabela 3 -	Características físicas e organolépticas da água potável e frequência de verificação.	11
Tabela 4 -	Padrão de qualidade da água tratada utilizada na preparação de solução para diálise e frequência de análise.	11
Tabela 5 -	Classes selecionadas de limpeza de partículas no ar para salas limpas e áreas limpas.	14
Tabela 6 -	Parâmetros de validação do INMETRO e ANVISA.	22
Tabela 7 -	Recuperação do analito em diferentes concentrações.	31
Tabela 8 -	Precisão como função da concentração do analito.	33
Tabela 9 -	Programação de temperatura do forno de grafite.	36
Tabela 10 -	Preparo de padrões utilizando o recurso de diluição do equipamento.	38
Tabela 11 -	Dados da curva em matriz de HNO ₃ 0,2% v v ⁻¹ .	41
Tabela 12 -	Dados da curva usando a matriz como matriz.	42
Tabela 13 -	Absorbância usando HNO ₃ 0,2% v v ⁻¹ como matriz e usando a amostra, em função das concentrações do analito.	43
Tabela 14 -	Resultado do Teste F_duas matrizes para variâncias.	44
Tabela 15 -	Resultado do Teste t_duas matrizes presumindo variâncias equivalentes.	44
Tabela 16 -	Dados para construção da curva analítica Absorbância versus concentração em matriz HNO ₃ 0,2% v v ⁻¹ .	45
Tabela 17 -	Resumo do teste de recuperação.	46
Tabela 18 -	Absorbância em função da concentração em 7 diferentes curvas e sua média.	47
Tabela 19 -	Absorbância em função da concentração para 7 curvas, sua média e a resposta relativa calculada.	48
Tabela 20 -	Série de cálculos partindo de x=concentração (em µg L ⁻¹) e y=absorbância.	50
Tabela 21 -	Resultados finais baseados nos cálculos da Tabela 20.	50
Tabela 22 -	Absorbância em função da concentração nas leituras de branco em HNO ₃ 0,2% v v ⁻¹ .	51
Tabela 23 -	Valor médio das 10 leituras, desvio padrão absoluto e coeficiente de variação.	52
Tabela 24 -	Absorbância para as diferentes concentrações de Pb ²⁺ e média desses valores.	53
Tabela 25 -	Valores obtidos na equação da reta baseada na curva	53

analítica da Figura 11.

Tabela 26 -	Desvio padrão de repetitividade e limite de repetitividade para um nível de confiança de 95% em função de cada concentração, bem como o coeficiente de variação do desvio padrão de repetitividade.	54
Tabela 27 -	Resultado dos testes de reprodutibilidade segundo MRC.	55
Tabela 28 -	Resultados das medidas de absorvância efetuadas com o padrão NIST 1643d.	56
Tabela 29 -	Concentrações das leituras efetuadas com o padrão NIST 1643d, sua média e desvio padrão absoluto.	56
Tabela 30 -	Resultados nos caçulos efetuados considerando o valor certificado de $(18,15 \pm 0,64) \mu\text{g L}^{-1}$ para avaliação da exatidão do método proposto.	57

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1	A Diálise	4
2.2	Água de diálise	5
2.2.1	Contaminantes da água de diálise	6
2.2.2	Tratamento da água de diálise	12
2.3	Salas limpas e ambientes associados controlados	13
2.4	Espectrometria de absorção atômica	16
2.4.1	Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite	16
2.5	Validação de método analítico	20
2.5.1	Seletividade	23
2.5.1.1	<i>Teste visual</i>	23
2.5.1.2	<i>Teste F e Teste t</i>	24
2.5.1.3	<i>Teste de Recuperação</i>	26
2.5.2	Especificidade	26
2.5.3	Robustez	26
2.5.4	Rugosidade	26
2.5.5	Limite de Detecção (LD ou LoD) e Limite de Quantificação (LQ)	27
2.5.5.1	<i>Relação Matemática I</i>	27
2.5.5.2	<i>Relação Matemática II</i>	27
2.5.5.3	<i>Relação Matemática III</i>	28
2.5.6	Linearidade	28
2.5.6.1	<i>Coeficiente de Linearidade, L</i>	28
2.5.6.2	<i>Resposta Relativa</i>	28
2.5.6.3	<i>Teste F</i>	29

2.5.7	Faixa de Trabalho (FT)	29
2.5.8	Sensibilidade	30
2.5.8.1	<i>Inclinação da Curva Analítica</i>	30
2.5.9	Exatidão	30
2.5.9.1	<i>Teste de Recuperação</i>	31
2.5.9.2	<i>Utilizando Materiais de Referência Certificados</i>	31
2.5.10	Precisão	32
2.5.10.1	<i>Repetitividade</i>	32
2.5.10.1.1	<i>Coeficiente de Variação do Desvio Padrão de Repetitividade</i>	33
2.5.10.2	<i>Reprodutibilidade</i>	34
2.5.10.2.1	<i>Índice Z (Z score)</i>	34
2.5.10.3	<i>Precisão Intermediária</i>	35
2.5.11	Incerteza	35
3	MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1	Aparelhagem e Programações	36
3.2	Reagentes	37
3.3	Soluções e modo de preparo	37
3.4	Especificações	38
3.5	Observações	39
3.6	Parâmetros para validação do método	39
3.6.1	Seletividade	39
3.6.2	Linearidade	39
3.6.3	Sensibilidade	39
3.6.4	Limites de Detecção e de Quantificação	40
3.6.5	Precisão	40
3.6.5.1	<i>Repetitividade</i>	40

3.6.5.2	<i>Reprodutibilidade</i>	40
3.6.6	Exatidão	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	Seletividade	41
4.1.1	Teste visual	41
4.1.2	Teste F e Teste t	43
4.1.3	Teste de Recuperação	45
4.2	Linearidade	47
4.2.1	Coeficiente de Linearidade, L	47
4.2.2	Resposta Relativa	47
4.2.3	Teste F	49
4.3	Sensibilidade	49
4.3.1	Inclinação da Curva Analítica	49
4.4	Limites de Detecção e Quantificação	51
4.4.1	Relação Matemática I	51
4.4.2	Relação Matemática II	52
4.4.3	Relação Matemática III	52
4.5	Precisão	52
4.5.1	Coeficiente de Variação do Desvio Padrão de Repetitividade	52
4.5.2	Índice Z (Z score)	55
4.6	Exatidão	56
4.6.1	Teste de Recuperação	56
4.6.2	Utilizando Materiais de Referência Certificados	56
5	CONCLUSÃO	58
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1 INTRODUÇÃO

A diálise é um processo artificial que substitui as funções dos rins e é utilizado quando o paciente apresenta insuficiência renal grave. De acordo com a Sociedade Brasileira de Nefrologia, o número de pessoas submetidas à terapia com diálise no Brasil vem crescendo e, atualmente, deve ser superior a 90 mil pacientes [1].

É de extrema importância a qualidade da água empregada nos processos de diálise. Até a década de 70, acreditava-se que a água potável servisse para a hemodiálise. Entretanto, o aumento do número de pacientes permitiu um acúmulo de evidências que indicavam problemas associados aos contaminantes da água empregada [2]. Contaminantes de origem orgânica, biológica e mineral são encontrados em águas de superfície na forma de poluentes e micropoluentes [3]. Dentre os contaminantes minerais cita-se o chumbo, cujo íon metálico pode persistir mesmo após o tratamento da água potável rica no mesmo. Os sintomas de intoxicação por chumbo são anemia hipocrômica, síndrome abdominal e síndrome neuromuscular até a encefalopatia saturnina, que se constitui por sintomas de agitação e tremores, podendo evoluir para convulsões, coma e até a morte [4].

O padrão de qualidade da água tratada utilizada na preparação de solução para diálise permite um máximo de íons chumbo de $0,005 \text{ mg L}^{-1}$, parâmetro que deve ser analisado semestralmente, segundo a Resolução RDC nº 154, de 15 de junho de 2004, emitido pela ANVISA [5].

Em nenhum outro procedimento hospitalar a qualidade da água é obrigatoriamente tão pura como em diálise renal. Para isso, aplicam-se sistemas de tratamento de água, como a deionização, que visa retirar íons por via eletroquímica. Ocorre com circulação de água por colunas preenchidas com uma resina trocadora de íons que deve ser substituída quando saturada. É nessa etapa que os íons chumbo devem ser removidos [6]. Para garantir resultados exatos nas análises de metais em água de diálise, salas limpas e ambientes associados controlados devem ser aplicados para controle de contaminação de partículas do ar para níveis

apropriados. Outros parâmetros relevantes, como temperatura, umidade e pressão, são também controlados conforme necessário [7].

O presente trabalho foi realizado com dados fornecidos pela Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais – CETEC de um procedimento já empregado em análises de rotina para determinação de íons chumbo em águas de diálise utilizando-se de forno de grafite. Para tanto, foram utilizados sala limpa classe ISO-7 para todos os ensaios e módulos de fluxo laminar ou capela de fluxo laminar classe ISO-5. O método foi desenvolvido por espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite, técnica capaz de determinar as concentrações esperadas, as quais ocorrem na ordem de microgramas por litro [8,9]. Neste equipamento, uma série programada de eventos de aquecimento ocorre: a secagem, a pirólise e a atomização. Durante a secagem o solvente evapora-se, na pirólise a matéria orgânica é calcinada e convertida em CO₂ e H₂O e, em seguida, tem-se a vaporização e atomização da amostra, o que ocorre em um tubo cilíndrico de grafite no interior de um forno aquecido eletricamente [10,11]. Uma fonte externa de radiação incide sobre o analito atomizado e, sendo de frequência apropriada, poderá ser absorvida pelos átomos do analito e excitá-los. Após alguns nanossegundos, os átomos retornam a seu estado fundamental, transferindo seu excesso de energia para outras espécies do meio. A medição da energia absorvida permite a construção de espectros, os quais podem ser mais ou menos complexos de acordo com a quantidade de elétrons externos que podem ser excitados em cada elemento [10].

A fim de garantir que a metodologia analítica seja exata, reprodutível e flexível sobre uma faixa específica em que uma substância será analisada, garantindo a conformidade com as exigências legais ou fim proposto, o método deve ser validado [12]. Segundo a ISO (International Standard Organization) 17025:2001, a validação pode ser definida como o “Processo pelo qual se estabelece as características de desempenho e limitações de um método, as influências que podem mudar essas características e a extensão dessas mudanças” [13]. Para isso, a maioria dos documentos provenientes de organismos oficiais recomenda que sejam avaliadas características de desempenho analítico, como: especificidade, seletividade, faixa de trabalho, linearidade, limites de detecção e quantificação,

sensibilidade, exatidão, precisão, incerteza de medição e robustez [14]. Não há um procedimento normatizado que estabeleça como executar a validação de métodos instrumentais de separação [15]. Assim, a(s) forma(s) como cada parâmetro será determinado/avaliado dependerá do equipamento, da metodologia e do fim proposto.

O objetivo deste trabalho foi estudar o procedimento de determinação de íons chumbo em águas de diálise por espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite, as particularidades de sua execução, o equipamento empregado e os parâmetros validados desse método analítico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Diálise

A diálise é um processo artificial que substitui as funções dos rins. É utilizado quando o paciente apresenta insuficiência renal grave [1]. A primeira diálise em humanos ocorreu em 1826, na Alemanha [16].

De acordo com a Sociedade Brasileira de Nefrologia em 2008, 87.044 pessoas eram submetidas à terapia com Diálise no Brasil. Atualmente esse número deve ser maior do que 90 mil.

Existem dois tipos de diálise: hemodiálise e diálise peritoneal.

- Hemodiálise: faz-se a remoção do sangue do corpo, filtrando-o em uma máquina. O paciente está ligado por um tubo que leva seu sangue até a máquinas de diálise. A máquina remove o excesso de água e toxinas do organismo e, em seguida, retorna o sangue para o paciente. A Hemodiálise deve ser realizada de 3 a 4 horas, pelo menos, três vezes por semana. É normalmente realizada em um centro de diálise, embora a hemodiálise em casa também seja possível.
- Diálise peritoneal: É um processo que utiliza uma solução líquida de limpeza do sangue chamada "dialisato". Esse líquido é injetado na cavidade peritoneal, região do abdômen que é envolvida pelo peritônio. Na cavidade peritoneal, o dialisato extrai toxinas e excesso de líquido do sangue. Após um período de tempo, a solução é então drenada da cavidade abdominal. A Diálise peritoneal pode ser feita durante o dia ou à noite. O nome dado a este procedimento quando é realizado em intervalos de cinco horas, quatro vezes por dia, é Diálise Peritoneal Ambulatorial Contínua [1].

A diálise peritoneal é o método diálítico mais simples e barato. Entretanto, a impossibilidade de se realizar diálise peritoneal ou hemodiálise convencional em pacientes hipercatabólicos com insuficiência renal aguda e instabilidade hemodinâmica, motivou o desenvolvimento de novos procedimentos de substituição renal extracorpórea, que são os genericamente chamados de Terapia Contínua de Substituição Renal [17].

2.2 Água de diálise

Até a década de 70, acreditava-se que a água potável também servisse para a hemodiálise. Com o aumento do número de pacientes em tratamento dialítico e de sua sobrevivência, acumularam-se evidências que permitiam correlacionar os contaminantes da água com efeitos adversos do procedimento [2]. Um dos primeiros eventos mórbidos relacionados à qualidade da água foi a chamada síndrome da água dura, diretamente associada a grandes quantidades de cálcio e magnésio na água [18]. Em 1980, na cidade de Maryland [19], localizada na região nordeste dos Estados Unidos da América, ocorreu um acidente por excesso de flúor na água, provocando complicações graves em 8 pacientes e óbito em um deles. Oito anos mais tarde, foram descritos 44 casos de hemólise devido à remoção inadequada de cloro da água destinada à diálise, na Filadélfia, cidade do estado americano da Pensilvânia [20]. O uso de sais de alumínio também é um procedimento para melhoria da qualidade da água para consumo, sendo aplicado como agente clarificante. Entretanto, são elementos deletérios para a saúde dos pacientes renais crônicos [21,22]. As complicações decorrentes da intoxicação alumínica foram o grande fator de conscientização mundial quanto à necessidade de um tratamento padronizado da água [23].

No Brasil, um estudo realizado no final dos anos 80 por Misael da Silva [24] analisou amostras de água de 19 centros de diálise da cidade de São Paulo por um ano. Desses, 17 dispunham de tratamento, sendo 15 com deionizadores e 2 com abrandadores, e 2 não tratavam a água. O estudo revelou que, durante todo o período, a água oferecida aos centros apresentava boa potabilidade, mas era inadequada para diálise. Dos elementos analisados, alumínio, cálcio, flúor e zinco, estavam acima dos valores recomendados. Os níveis de zinco normalizavam-se após passagem pelo deionizador, os de cálcio normalizavam em 45% após passar pelo abrandador e alumínio e flúor permaneceram elevados, a despeito dos tratamentos.

Com o reconhecimento do risco potencial que representava a ausência de um tratamento específico, foram criados vários órgãos e comissões em todo o mundo, que estabeleceram critérios para a

composição adequada da água a ser utilizada na preparação dos banhos de diálise. As normas seguidas pela Comunidade Européia e as sugeridas pela Association for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI) nos Estados Unidos da América, ambas estabelecidas em 1982, são as mais conhecidas [23].

2.2.1 Contaminantes da água de diálise

Os contaminantes encontrados nas águas de superfície são materiais orgânicos, biológicos e minerais.

- Poluentes e micropoluentes orgânicos: Compostos derivados do nitrogênio. A água potável para consumo humano tolera a presença de até 2 mg L^{-1} de substâncias orgânicas [3]. Suas conseqüências incluem o odor desagradável, exacerbado pela cloração, e o desenvolvimento de algas, bactérias e fungos, que podem se fixar nas tubulações da rede. A amônia favorece a proliferação bacteriana e os nitratos e nitritos, quando ingeridos causam dor abdominal, vômitos, tonturas, cianose e choque pela formação de metahemaglobina. Os métodos utilizados para diminuição dos materiais orgânicos são a oxidação por ozônio ou a clarificação por carvão ativado. Eles são também eliminados por deionizador ou osmose reversa.
- Poluentes e micropoluentes biológicos: As fontes de água dos centros de hemodiálise, geralmente obtidas do reservatório da comunidade, podem conter altas concentrações de endotoxina e bactéria. O número de bactérias na água reduz com o tratamento convencional, mas, geralmente, não diminui significativamente a concentração de endotoxinas. A qualidade microbiológica da água da diálise e dialisato são extremamente importantes, tendo em vista que sangue e dialisato são separados apenas por uma membrana semipermeável. Os fluídos não precisam ser estéreis, mas o número máximo de microorganismos deve ser controlado. A Tabela 1 resume os padrões estabelecidos pela AAMI e adotados pela Health Care Financing Administration (HCFA) como adequados para diálise.

Tabela 1 - Padrões microbiológicos e de endotoxinas para líquidos de diálise, estabelecidos pela AAMI e adotados pela HCFA.

Tipo de líquido	Contagem microbiológica (UFC mL⁻¹)	Endotoxina (ng mL⁻¹)
Água para preparo do dialisato	< 200	Sem padronização
Dialisato	< 2000	Sem padronização

Fonte: SILVA, A. M. M. da; MARTINS, C. T. B.; FER RABOLI, R.; JORGETTI, V.; JUNIOR, J. E. R. Revisão/Atualização em Diálise: Água para hemodiálise. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 180-188, 1996.

Os principais contaminantes dos líquidos de diálise são bactérias gram-negativas e micobactérias não tuberculosas (Tabela 2).

Tabela 2 - Bactérias comumente encontradas na água de diálise.

Bactérias Gram-negativas	Micobactérias não tuberculosas
<i>Pseudomonas</i>	<i>Micobacterium abscessus</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Micobacterium fortuitum</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Micobacterium gordonae</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Micobacterium scrofulaceum</i>
<i>Xantomonas</i>	
<i>Serratia</i>	

Fonte: SILVA, A. M. M. da; MARTINS, C. T. B.; FER RABOLI, R.; JORGETTI, V.; JUNIOR, J. E. R. Revisão/Atualização em Diálise: Água para hemodiálise. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 180-188, 1996.

Todos os componentes do tratamento de água podem constituir multiplicadores de bactérias e fontes de contaminação por endotoxinas, devendo, portanto, ser substituídos ou desinfetados conforme uma rotina pré estabelecida [23].

- Poluentes e micropoluentes minerais: Incluem flúor, cloro, cobre, bismuto, prata, arsênico, cádmio, zinco, alumínio, mercúrio, potássio, sódio, cálcio, magnésio e chumbo.

- Flúor: Sua presença na água potável varia conforme a fluoração praticada. Quando o dialisato é preparado com água fluorada, o íon atravessa a membrana de diálise facilmente. A presença do flúor em concentrações iguais ou superiores às do alumínio pode levar à formação de complexo de flúor que, em presença de sódio, formaria o mineral conhecido como criolita, difícil de ser retirado do sistema de tratamento. A sobrecarga crônica por fluoretos ocasiona quadros de osteomalacia [25,26].
- Cloro: O cloro livre e seus derivados são adicionados às águas naturais para eliminar microorganismos e/ou oxidar certos íons indesejáveis, como íon ferro e manganês. A cloramina, resultante da combinação de clorina e amônia, quando presente em concentrações elevadas, leva à metahemoglobinemia, hemólise e anemia severa [27,20].
- Cobre: Proveniente da poluição industrial, tratamentos agrícolas, tratamento para algas ou corrosão das canalizações. Foram descritos casos de hemólise severa e lesões hepáticas por contaminação pelo cobre [28,29,30].
- Bismuto: Quando em quantidades superiores a 200 mg L⁻¹, leva a quadro de encefalopatia [31].
- Prata: Provém de dejetos da fabricação de objetos, jóias, filmes para fotografia e radiografias. A intoxicação crônica leva a argirose cutânea, que se caracteriza por pele acinzentada e formação de linha acinzentada gengival [2].
- Arsênio: Origina-se de detergentes à base de fosfatos, produtos sanitários, pigmentos e corantes. Pode ocasionar problemas digestivos, neurológicos e cutâneos (melanomas). Altera o DNA no processo de divisão celular, resultando em efeito cancerígeno [2].
- Cádmiio: Produto de revestimentos metálicos, pinturas e matérias plásticas, o cádmio é um elemento extremamente tóxico, com efeito carcinogênico, lesa túbulos renais, provoca doença óssea (osteomalácia) e hipertensão arterial [4].

- Zinco: Em excesso no banho de diálise, pode levar ao aparecimento de anemia hemolítica, além de náuseas e vômitos. O acúmulo crônico está relacionado a casos de encefalopatia [32].
- Alumínio: Difunde-se através da membrana semipermeável do filtro de diálise através da ligação dos grupos hidroxila e sulfídrica. A contaminação da água, acima dos níveis permitidos, leva ao acúmulo do metal e intoxicação alumínica nos pacientes renais crônicos e pode causar osteomalácia, anemia microcítica e lesão funcional aos hepatócitos, sendo que nos casos mais severos pode evoluir com um quadro de encefalopatia, demência da diálise, catatonía e morte.
- Mercúrio: Provém da contaminação ambiental pelas fábricas de cimento, siderúrgicas e de fungicidas organomercuriais. A grande lipossolubilidade do metal leva ao acúmulo do mesmo no sistema nervoso central causando tremores, paralisias e manifestações psiquiátricas [2].
- Potássio e sódio: Níveis elevados de ambos geralmente provêm de contaminação industrial. Os casos de hipercalemia relacionada com água para hemodiálise são extremamente raros.
- Cálcio: As águas naturais contêm quantidades variáveis de cálcio conforme o solo. A utilização de água com conteúdo superior a 80 mg L⁻¹ de cálcio (água dura) provoca cefaléia, náuseas, vômitos, hiperemia das conjuntivas, hipertensão e convulsões.
- Magnésio: Íon abundante que também confere dureza à água. Quando em excesso na água do dialisato, causa diminuição da sensibilidade da placa motora à acetilcolina e provoca bloqueio da transmissão neuro-muscular [23].
- Chumbo: Se a água potável for rica em chumbo, o metal pode persistir mesmo após o tratamento. Os sintomas de intoxicação por chumbo são anemia hipocrônica, síndrome abdominal (dor abdominal, anorexia: cólica do chumbo), síndrome neuro-muscular (astemia, dores musculares e articulares: gota saturnina) até a encefalopatia saturnina, que se constitui por sintomas de agitação

e tremores, podendo evoluir para convulsões, coma e até a morte [4].

Os poluentes de origem mineral possivelmente presentes nas águas de diálise podem ser divididos em três grupos: constituintes normais da solução de hemodiálise, contaminantes tóxicos para água potável e contaminantes tóxicos na hemodiálise.

- Constituintes normais da solução de hemodiálise: São elementos necessários na composição final do dialisato, geralmente em concentrações relativamente altas. Assim, torna-se seguro aceitar concentrações relativamente consideráveis destas substâncias na água da diálise. Os valores máximos sugeridos para este grupo de elementos estão baseados nas variações clinicamente aceitáveis destas substâncias no dialisato. São eles: sódio, cloreto, potássio, magnésio e cálcio [23].
- Contaminantes tóxicos para água potável: São elementos com toxicidade conhecida e regulamentados pelas normas para água potável. Assim, a água fornecida pela rede pública de abastecimento deve apresentar uma concentração máxima aceitável para estes elementos. Como segurança, as normas da AAMI prevêm um máximo de 10% destes elementos na água de hemodiálise em relação ao sugerido como máximo para a água potável. Os valores máximos detectáveis são observados pelos métodos de dosagem utilizados e pela capacidade de transferência do determinado contaminante através da membrana dialisadora [23].
- Contaminantes tóxicos na hemodiálise: Grupo constituído de substâncias citadas na legislação para água potável, com níveis máximos aceitáveis superiores aos conhecidos como tóxicos para água de hemodiálise. Todos apresentam toxicidade conhecida e documentada para pacientes portadores de insuficiência renal crônica e mantidos em hemodiálise. Os valores máximos aceitáveis comumente são definidos como os menores níveis nos quais a toxicidade do contaminante foi documentada. Os contaminantes químicos apresentam extrema variação mensal, devendo ser verificados mensalmente no início e, quando são usados

deionizadores e osmose reversa, um exame a cada 4-6 meses é suficiente. Quando se adicionam cloraminas à água distribuída pela comunidade, a presença das mesmas deve ser verificada diariamente [23].

As Tabelas 3 e 4 mostram as características físicas e organolépticas da água potável e o padrão de qualidade da água tratada utilizada na preparação de solução para diálise, respectivamente, junto à frequência de análise, segundo a Resolução RDC nº 154, de 15 de junho de 2004, emitido pela ANVISA [5].

Tabela 3 - Características físicas e organolépticas da água potável e frequência de verificação.

Característica	Parâmetro Aceitável	Frequência de verificação
Cor aparente	Incolor	Diária
Turvação	Ausente	Diária
Sabor	Insípido	Diária
Odor	Inodoro	Diária
Cloro residual livre	> 0,5 mg L ⁻¹	Diária
pH	6,0 a 9,5	Diária

Fonte: BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 154, de 15 de junho de 2004 (Versão publicada - 31.05.2006). Estabelece o "REGULAMENTO TÉCNICO PARA O FUNCIONAMENTO DOS SERVIÇOS DE DIÁLISE".

Tabela 4 - Padrão de qualidade da água tratada utilizada na preparação de solução para diálise e frequência de análise.

Componentes	Valor máximo permitido	Frequência de análise
Coliforme total	Ausência em 100 mL	Mensal
Contagem de bactérias heterotróficas	200 UFC mL ⁻¹	Mensal
Endotoxinas	2 EU mL ⁻¹	Mensal
Nitrato (NO ₃)	2 mg L ⁻¹	Semestral
Alumínio	0,01 mg L ⁻¹	Semestral

Componentes	Valor máximo permitido	Frequência de análise
Cloramina	0,1 mg L ⁻¹	Semestral
Cloro	0,5 mg L ⁻¹	Semestral
Cobre	0,1 mg L ⁻¹	Semestral
Fluoreto	0,2 mg L ⁻¹	Semestral
Sódio	70 mg L ⁻¹	Semestral
Cálcio	2 mg L ⁻¹	Semestral
Magnésio	4 mg L ⁻¹	Semestral
Potássio	8 mg L ⁻¹	Semestral
Bário	0,1mg L ⁻¹	Semestral
Zinco	0,1mg L ⁻¹	Semestral
Sulfato	100 mg L ⁻¹	Semestral
Arsênico	0,005 mg L ⁻¹	Semestral
Chumbo	0,005 mg L ⁻¹	Semestral
Prata	0,005 mg L ⁻¹	Semestral
Cádmio	0,001 mg L ⁻¹	Semestral
Cromo	0,014 mg L ⁻¹	Semestral
Selênio	0,09 mg L ⁻¹	Semestral
Mercúrio	0,0002 mg L ⁻¹	Semestral
Berílio	0,0004 mg L ⁻¹	Semestral
Tálio	0,002 mg L ⁻¹	Semestral
Antimônio	0,006 mg L ⁻¹	Semestral

Fonte: BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 154, de 15 de junho de 2004 (Versão publicada - 31.05.2006). Estabelece o "REGULAMENTO TÉCNICO PARA O FUNCIONAMENTO DOS SERVIÇOS DE DIÁLISE".

2.2.2 Tratamento da água de diálise

A qualidade da água tratada para diálise é de responsabilidade do diretor clínico do serviço de diálise ou do responsável técnico contratado para esta finalidade. Em nenhum outro procedimento hospitalar a qualidade da água é obrigatoriamente tão pura como em diálise renal.

Os sistemas de tratamento de água removem os contaminantes através das etapas descritas a seguir.

- Filtração: remove as partículas em suspensão na água, retendo-as em filtros. Estes devem ser periodicamente limpos por retro-lavagem ou substituídos quando começarem a ficar obstruídos por partículas. Normalmente são de areia ou de uma rede de material sintético.
- Adsorção: processo próprio de filtros de carvão ativado que retêm compostos orgânicos de baixo peso molecular. Devem ser substituídos quando apresentarem saturação, a qual é medida pela concentração crescente de cloro na água.
- Deionização: processo que visa retirar íons (cátions e ânions) por processo eletroquímico. A água circula por colunas cheias de uma resina trocadora de íons que, quando saturada, deve ser substituída. Pode ser regenerado no fabricante, que normalmente também esteriliza para eliminar colônias de bactérias.
- Osmose reversa: é o processo mais abrangente disponível atualmente para a produção de água purificada. A água já filtrada e deionizada atravessa a membrana semipermeável criando duas câmaras (antes e depois da membrana). Aplicando-se uma forte pressão mecânica entre elas, a água pura atravessa a membrana deixando para trás todas as substâncias que trazia dissolvidas, revertendo o fluxo osmótico, que leva a água pura a diluir a água saturada. Assim, a água pura fica cada vez mais pura e a saturada cada vez mais saturada [6].
- Esterilização: Embora a esterilidade deva ser encarada como um conceito de probabilidade [33], ela é definida como o processo de destruição de todas as formas de vida microbianas (bactérias nas formas vegetativas e esporuladas, fungos e vírus) mediante aplicação de agentes físicos e químicos [34].

2.3 Salas limpas e ambientes associados controlados

Salas limpas e ambientes associados controlados são aplicados no controle de contaminação de partículas do ar para níveis apropriados ao exercer atividades sensíveis à contaminação. Produtos e processos que se beneficiam desse controle incluem indústrias tais como aeroespacial, microeletrônica, farmacêutica, aparelhos médicos, alimentação e cuidado com a saúde. Definem-se como partículas, objetos sólidos ou líquidos, os

quais, para finalidades de classificação de limpeza do ar, caem em uma distribuição cumulativa baseada em um tamanho limiar (limite inferior) na faixa de 0,1 µm até 5 µm. As salas limpas são construídas e usadas de modo a minimizar a introdução, geração e retenção de partículas em seu interior. Outros parâmetros relevantes, como temperatura, umidade e pressão, são também controlados conforme necessário. Sua classificação é expressa em termos de uma classe ISO N, que representa a concentração máxima permitida para os tamanhos de partícula considerados. A equação 1, a seguir, evidencia o máximo permitido de concentração e partículas para cada tamanho de partícula considerada.

$$C_n = 10^N \times (0,1/D)^{2,08} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: C_n é o máximo permitido de concentração (em partículas por metro cúbico de ar) de partículas no ar que são iguais a ou maiores que o tamanho de partícula considerado. C_n é arredondado para o número inteiro mais próximo, usando não mais que três algarismos significativos.

N é o número de classificação ISO, que não deverá exceder o valor de 9. Números intermediários e classificação ISO podem ser especificados, com 0,1 sendo o menor incremento de N permitido.

D é o tamanho de partícula considerado, em micrômetros.

0,1 é uma constante com uma dimensão em micrômetros.

A Tabela 5 apresenta as classes relacionadas de limpeza de partículas no ar e suas correspondentes concentrações para partículas iguais a e maiores que os tamanhos considerados mostrados.

Tabela 5 - Classes selecionadas de limpeza de partículas no ar para salas limpas e áreas limpas.

Número de classificação ISO	Limites máximos de concentração (partículas por m ³ de ar) para partículas iguais a e maiores que os tamanhos considerados mostrados a baixo (limites de concentração calculados de acordo com a Equação 1)					
	0,1 µm	0,2 µm	0,3 µm	0,5 µm	1 µm	5 µm
Classe ISO 1	10	2				
Classe ISO 2	100	24	10	4		

Número de classificação ISO	Limites máximos de concentração (partículas por m ³ de ar) para partículas iguais a e maiores que os tamanhos considerados mostrados a baixo (limites de concentração calculados de acordo com a Equação 1)					
	0,1 µm	0,2 µm	0,3 µm	0,5 µm	1 µm	5 µm
Classe ISO 3	1000	237	102	35	8	
Classe ISO 4	10000	2370	1020	352	83	
Classe ISO 5	100000	23700	10200	3520	832	29
Classe ISO 6	1000000	237000	102000	35200	8320	293
Classe ISO 7				352000	83200	2930
Classe ISO 8				3520000	832000	29300
Classe ISO 9				35200000	8320000	293000

Obs.: Incertezas relacionadas ao processo de medida requerem que os dados de concentração com não mais que três números significativos sejam usados na determinação do nível de classificação.

Fonte: ISO 14644-1:1999(E) - Salas limpas e ambientes associados controlados - Parte 1:Classificação de limpeza do ar.

A Figura 1 representa as classes de limpeza de ar em forma gráfica. Em caso de disputa, a concentração C_n , da Equação 1, deve servir como valor padrão.

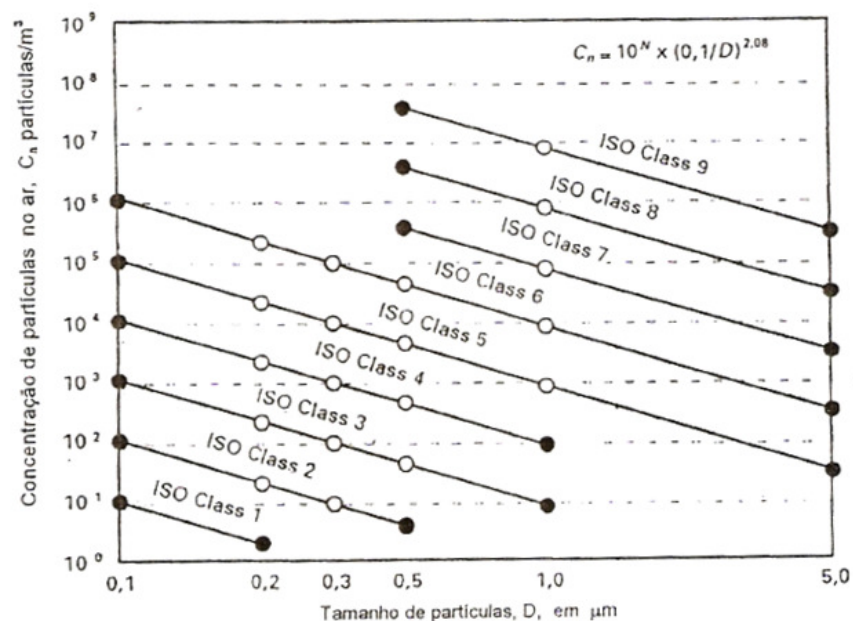


Figura 1 - Representação gráfica de limites de concentração classe-ISO para classes ISO selecionadas [7].

2.4 Espectrometria de absorção atômica

Na absorção atômica, uma fonte externa de radiação incide sobre o vapor do analito. Se a fonte de radiação externa for de frequência apropriada, poderá ser absorvida pelos átomos do analito e promovê-los a estados excitados. Após alguns nanossegundos, os átomos retornam a seu estado fundamental, transferindo seu excesso de energia para outros átomos ou moléculas do meio (Figura 2). Os espectros podem ser mais ou menos complexos de acordo com a quantidade de elétrons externos que podem ser excitados em cada elemento [10].

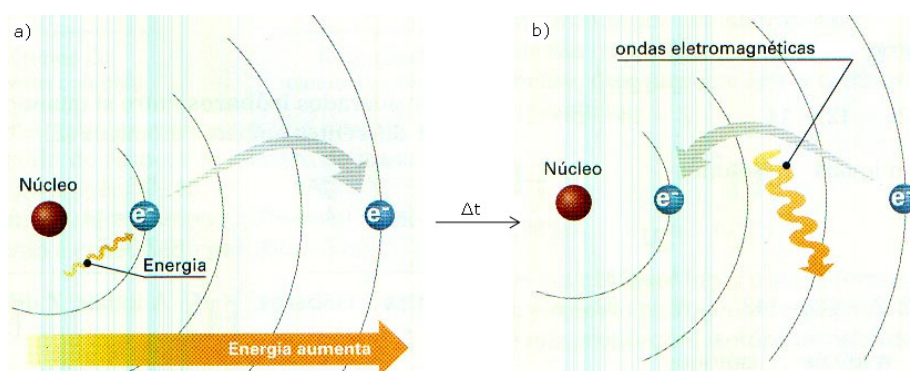


Figura 2 - a) Elétron excitado a um estado de maior energia. b) Energia liberada no meio após um intervalo de tempo Δt , e retorno do elétron a seu estado fundamental.

2.4.1 Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite

Após introdução da amostra, uma série programada de eventos de aquecimento ocorre: a secagem, a pirólise e a atomização propriamente dita. Durante a secagem, o solvente evapora-se a uma temperatura relativamente baixa, normalmente de 110°C (Figura 3). Eleva-se então a temperatura entre 300 e 1200°C e a matéria orgânica é calcinada e convertida em CO₂ e H₂O (Figura 4). Após a pirólise, a temperatura é rapidamente levada até entre 2000 e 3000°C, o que vaporiza e atomiza a amostra (Figura 5); a atomização ocorre em um intervalo de poucos milissegundos a segundos. Neste processo, a amostra é convertida em átomos ou íons no estado gasoso, estando eles muito bem separados uns dos outros. A atomização é uma etapa crítica da espectroscopia atômica, tendo em vista sua grande influência na sensibilidade, precisão e exatidão do método [10]. O analito pode ser atomizado em uma chama, em um

forno aquecido eletricamente ou em um plasma [11] e, uma vez que a amostra tenha sido convertida em átomos ou íons gasosos, diversos tipos de espectroscopia podem ser realizados.

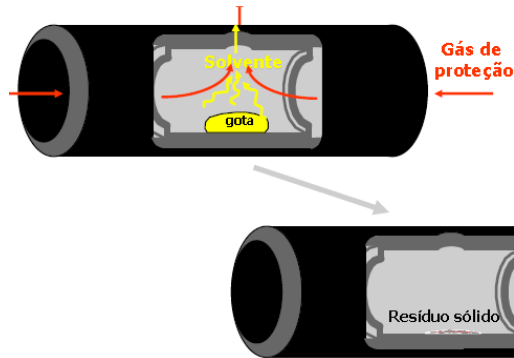


Figura 3 - Representação da etapa de secagem.

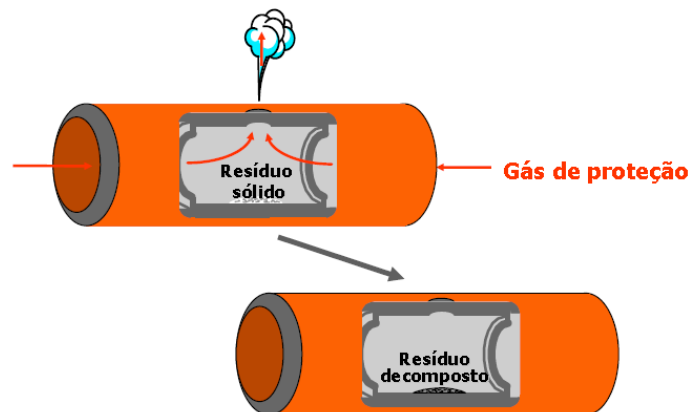


Figura 4 - Representação da etapa de pirólise.

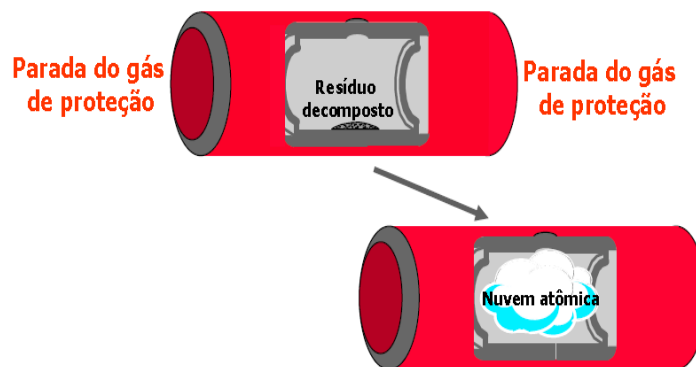


Figura 5 - Representação da etapa de atomização.

Como a concentração dos contaminantes em água ocorre, geralmente, em níveis de traço, é necessária a utilização de técnicas analíticas de alta sensibilidade, como a espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS, do inglês Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry) [8,9], para detectá-los e quantificá-los.

Os atomizadores eletrotérmicos apareceram no mercado por volta de 1970 e fornecem, de modo geral, um aumento de sensibilidade [10], além de necessitar de menos amostra [11]. O tempo de residência da amostra atomizada no caminho ótico por 1 ou mais segundos é um dos parâmetros que leva a essa maior sensibilidade.

Para átomos e íons no estado gasoso, não há estados de energia vibracional ou rotacional, de modo que somente transições eletrônicas ocorrem. Assim, os espectros de emissão, absorção e fluorescência são constituídos por um número limitado de linhas espectrais estreitas.

Também, as amostras são introduzidas em um forno de volume confinado, o que significa que não são diluídas tanto quanto estariam em um plasma ou uma chama. A atomização ocorre em um tubo cilíndrico de grafite aberto em suas duas extremidades e que contém um orifício central para a introdução da amostra. O tubo descartável de grafite adapta-se perfeitamente a um par de contatos elétricos feitos de grafite localizados nas duas extremidades do tubo. Esses contatos são mantidos em um compartimento metálico refrigerado a água. Dois fluxos de gás inerte são providos. O fluxo externo previne a entrada de ar externo e a conseqüente incineração do tubo. A corrente interna flui pelas duas extremidades do tubo e sai pelo orifício central. Essa corrente de gás não só exclui o ar como também carrega para fora os vapores gerados pela matriz da amostra durante os dois estágios iniciais do aquecimento [10]. O fluxo de gás é interrompido durante a atomização para evitar que o analito seja expulso do forno. No desenvolvimento de um método para um novo tipo de amostra, é importante registrar o sinal em função do tempo, pois existem também sinais decorrentes da fumaça, durante a queima, e do brilho avermelhado quente do forno, durante a última etapa da atomização [11]. A Figura 6 mostra a plataforma de L'vov, a qual é freqüentemente empregada em forno de grafite. A plataforma é também feita de grafite e

está localizada abaixo do orifício de introdução da amostra. Esta é evaporada e calcinada sobre essa plataforma, da forma usual. Quando a temperatura do tubo se eleva rapidamente, contudo, atrasa-se a atomização, uma vez que a amostra não se encontra mais em contato direto com a parede do forno. Em consequência, a atomização ocorre em um ambiente no qual a temperatura não está se alterando tão rapidamente e sinais mais reprodutíveis são obtidos [10].

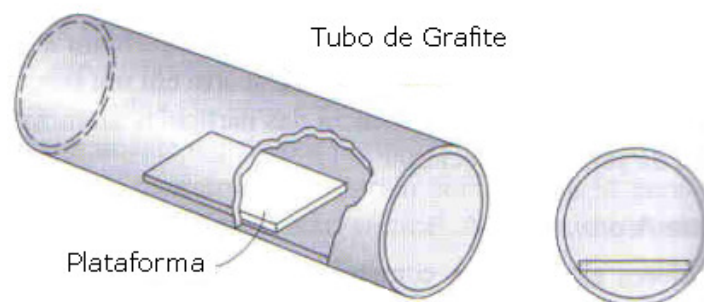


Figura 6 - Plataforma de L'vov e sua posição no forno de grafite [35].

Possíveis interferências de corridas anteriores podem ocorrer e são chamadas de efeito de memória, sendo menores em fornos aquecidos transversalmente. A fim de minimizar ainda mais este efeito, a grafita comum é revestida com uma camada de grafita pirolítica, produzida pela decomposição térmica de um vapor orgânico. O revestimento sela a superfície da grafita, relativamente porosa, de modo a impedir a absorção de átomos pela superfície [11].

As condições ideais para garantir um bom desempenho de análise em GFAAS são:

- Tubo de grafite com plataforma de L'vov.
- Alta taxa de aquecimento ($1500-2000\text{ }^{\circ}\text{C s}^{-1}$).
- Etapa de atomização sem utilização de gás.
- Medida de absorbância integrada.
- Instrumental de leitura rápida, para registro de sinal livre de distorções.
- Utilização de modificador químico.
- Utilização de correção de *background*.

Estas são as chamadas condições STPF – GFAAS [36]. O conceito STPF (Stabilized Temperature Platform Furnace, que significa Forno Plataforma com Temperatura Estabilizada) é um conjunto de condições que devem ser usadas ao mesmo tempo, para garantir determinações livres de interferência no forno de grafite. Entre estas, encontra-se o uso de plataforma, necessária para atrasar a atomização do analito o maior tempo possível, até que as paredes do tubo e a atmosfera gasosa alcancem o equilíbrio térmico [37,8].

Quanto ao modificador químico, também denominado de modificador de matriz, é uma substância adicionada à amostra para tornar a matriz mais volátil ou o analito menos volátil, reduzindo as perdas de analito no processo de queima [11].

Dentre as desvantagens do forno de grafite destacam-se a baixa frequência analítica (tempo de análise de 3 a 5 minutos por amostra), a deterioração do tubo de grafite a cada 500-600 análises e sua baixa repetibilidade e reprodutibilidade quando comparada à técnica de atomização por chama [36].

2.5 Validação de método analítico

Segundo a ISO (International Standard Organization) 17025:2001, a validação pode ser definida como: “Processo pelo qual se estabelece as características de desempenho e limitações de um método, as influências que podem mudar essas características e a extensão dessas mudanças” [13].

A importância da validação de método é garantir que a metodologia analítica seja exata, reprodutível e flexível sobre uma faixa específica em que uma substância será analisada, garantindo a conformidade com as exigências legais ou fim proposto (interesse de terceiros) do método analítico [12]. É essencial que os estudos de validação sejam conduzidos de modo que a variação da faixa de concentração e os tipos de amostras sejam adequados. Um método para um composto majoritário requer um critério de aceitação e uma abordagem diferente de um método desenvolvido para análise de traços. A frequência com que o método será utilizado também influencia o tipo de estudo de validação que é necessário [15]. A Figura 7 mostra um esquema para o desenvolvimento do processo de validação.

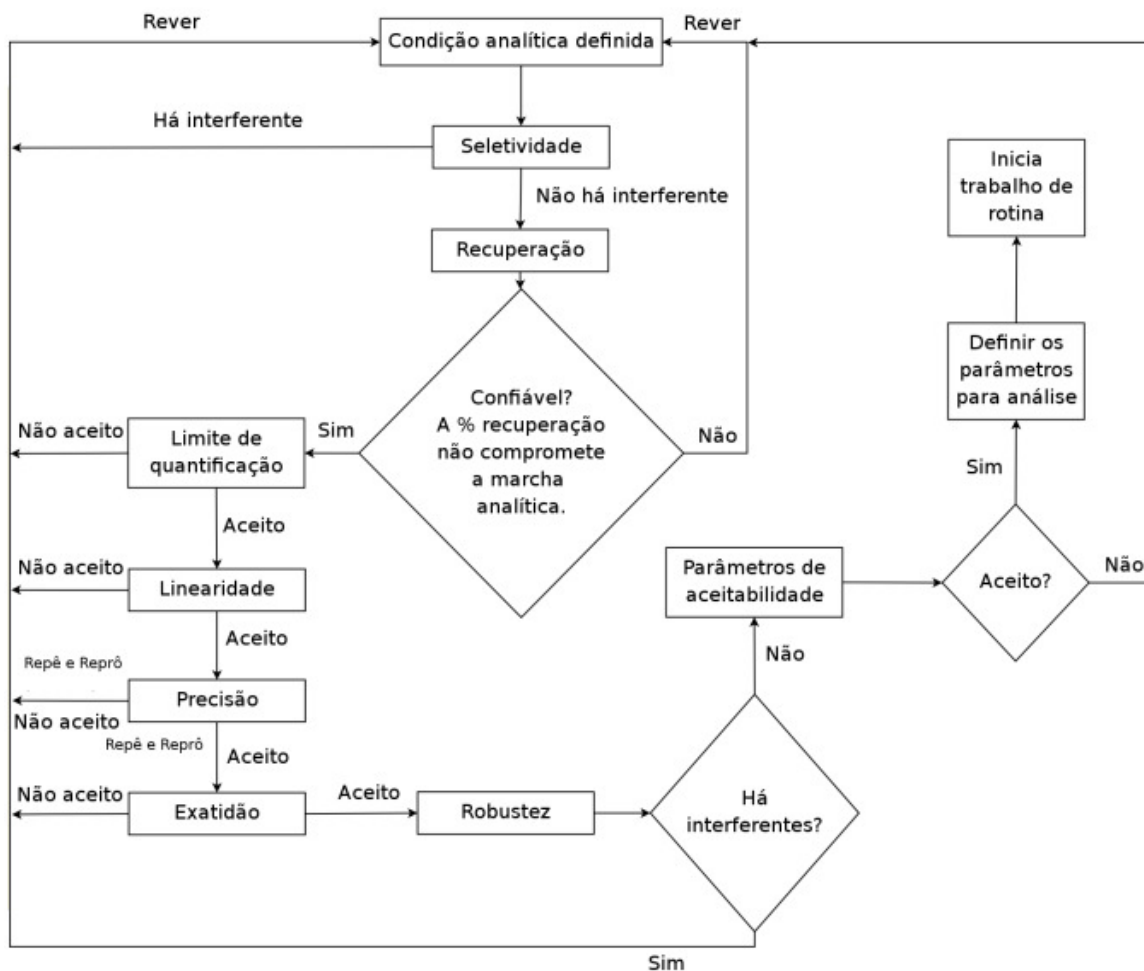


Figura 7 - Esquema de um processo de validação de método [38].

Existem dois tipos de validação: a validação interna e a validação externa.

- Validação interna: é aquela realizada dentro do âmbito de um laboratório, visando à garantia da qualidade do serviço de análise química dentro do contexto do sistema da qualidade da organização.
- Validação interlaboratorial ou externa: é aquela realizada envolvendo os estudos colaborativos interlaboratoriais, visando a avaliar o desempenho do método analítico, que em geral serão utilizados por vários laboratórios ou fabricantes de produtos, ou terá um interesse científico mais amplo ou, em caso mais extremo, será reconhecido oficialmente por um organismo regulador ou classificado como método de referência ou padronizado [39].

No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios: a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, a Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003 [40] e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março/2003 [41]. Suas similaridades e diferenças podem ser melhor visualizadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Parâmetros de validação do INMETRO [41] e ANVISA [42].

INMETRO	ANVISA
Especificidade/Seletividade	Especificidade/Seletividade
Faixa de trabalho e Faixa linear de trabalho	Intervalos da curva de calibração
Linearidade	Linearidade
	Curva de Calibração
Limite de Detecção	Limite de Detecção
Limite de Quantificação	Limite de Quantificação
Sensibilidade (inclinação da curva)	-
Exatidão e Tendência (bias)	Exatidão
Precisão	Precisão
Repetitividade	<i>Repetitividade (precisão intra-corrída)</i>
Precisão Intermediária	<i>Precisão Intermediária (precisão inter-corrída)</i>
Reprodutibilidade	<i>Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial)</i>
Robustez	Robustez
Incerteza de Medição	-

Fonte: THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for singlelaboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). Pure and Applied Chemistry, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002 [14].

Não há um procedimento normatizado que estabeleça como executar a validação de métodos instrumentais de separação. Como muitos organismos são responsáveis por acompanhar e credenciar a competência de laboratórios de ensaios é importante ressaltar que as diferentes terminologias e até algumas características de desempenho do método têm, em sua maior parte, o mesmo significado, porém descrito de uma maneira distinta, para aplicações diferentes [15].

Massart et al. subdivide as figuras de mérito ou parâmetros (características) de desempenho em dois subgrupos:

- Características de desempenho primárias: exatidão, precisão, incerteza e limite de detecção.
- Características de desempenho secundárias: linearidade, faixa de trabalho, seletividade, especificidade, sensibilidade, robustez, rugosidade e limite de quantificação [43].

Embora essa classificação possa ser útil no planejamento de uma validação, não se pode esquecer que elas interagem sinergicamente. Assim, por exemplo, a seletividade e a sensibilidade podem influenciar significativamente na exatidão e precisão do método.

2.5.1 Seletividade

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição pelo detector selecionado, sem causar um sinal visível no teste de especificidade. Os interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito também pode depender da concentração [41]. Dentre os testes que podem ser realizados na determinação da seletividade, destacam-se os descritos a seguir.

2.5.1.1 Teste visual

Um pré-teste pode ser realizado mediante leitura de sete curvas analíticas em cada uma matrizes. Calcula-se a média aritmética das sete medidas em ambos os casos. Plotam-se as 14 curvas em um mesmo gráfico de absorbância *versus* concentração, a fim de comparar os pontos por análise visual.

2.5.1.2 Teste F e Teste t

Segundo INMETRO-DOQ-CGCRE-008/2003 [41], aplica-se o teste F (Snedecor) de homogeneidade de variâncias, o teste t (Student) de comparação de médias e efetua-se a análise dos desvios em relação aos valores de referência, utilizando-se padrões em ambas as matrizes.

Primeiro, faz-se o teste F para verificar se as variâncias das amostras podem ser consideradas iguais, calculando-se:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde s_1^2 e s_2^2 são as variâncias de cada amostra, com a maior variância no numerador.

Ao mesmo tempo, obtém-se o valor de F_{tabelado} , com (n_1-1) graus de liberdade no numerador e (n_2-1) graus de liberdade no denominador; usualmente, adota-se um nível de confiança de 95% (nível adotado no caso em estudo). Têm-se duas possibilidades:

- se o teste F não é significativo, isto é, se F calculado for menor que o F tabelado, a matriz não tem um efeito importante sobre a precisão do método na faixa de concentração em estudo. Neste caso, os desvios-padrão dos grupos de testes podem ser agrupados e a significância das diferenças das médias dos dois conjuntos de amostras pode ser testado com a distribuição t de Student (no Excel, "Teste-T: duas amostras presumindo variâncias equivalentes"). Assim, calculam-se:

\bar{x}_1 e \bar{x}_2 = médias das respostas dos analitos em amostras "com matriz" e "sem matriz" na mesma faixa de concentrações,

s_1 e s_2 = desvios-padrão das respostas dos analitos dos dois grupos de amostras, bem como o valor

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{s^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde $s^2 = \frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}$ (Equação 4) e n_1 e n_2 são os

tamanhos das amostras 1 e 2.

O valor de t_{tabelado} é obtido a partir da tabela da distribuição de Student para $(n_1 + n_2 - 2)$ graus de liberdade e a confiança desejada.

- Se o teste F é significativo, a matriz tem um efeito importante sobre a precisão do método na faixa de concentração em estudo, as variâncias podem ser consideradas desiguais (no Excel, "Teste-T: duas amostras presumindo variâncias diferentes") e o $t_{\text{calculado}}$ é calculado por:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad (\text{Equação 5})$$

Neste caso, para a obtenção do t tabelado, o número de graus de liberdade (ν) é igual a:

$$\nu = \frac{(s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2)^2}{\frac{(s_1^2/n_1)^2}{n_1+1} + \frac{(s_2^2/n_2)^2}{n_2+1}} \quad (\text{Equação 6})$$

No caso de somente uma faixa relativamente estreita de concentrações interessar, ou se o erro analítico devido a uma possível dependência com a concentração for desprezível, o teste t com dados pareados pode ser utilizado para verificar efeitos de matriz (no Excel, "Teste-T: duas amostras em par para médias"). O cálculo neste caso deve ser:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{\bar{x}_d \sqrt{n}}{s_d} \quad (\text{Equação 7})$$

$$\text{Onde } \bar{x}_d = \sum_{i=1}^n \frac{d_{i1} - d_{i2}}{n} \quad \text{e} \quad s_d = \frac{\sum_{i=1}^n [(d_{i1} - d_{i2}) - \bar{x}_d]^2}{n-1} \quad (\text{Equações 8}$$

e 9)

Nas equações, \bar{x}_d é a média das diferenças entre as respostas dos pares de analitos; d_{i1} , d_{i2} = respostas do analito para o par de amostras "com matriz" e "sem matriz"; s_d = desvio padrão das diferenças e n = número de pares. O valor de t tabelado é obtido da distribuição t de Student com $(n-1)$ graus de liberdade e a confiança desejada.

Se o valor de t calculado for menor que o t tabelado, pode-se concluir que a matriz não afeta o ensaio. Se o valor de t for maior que o esperado, pode-se concluir que a matriz tem um efeito estatisticamente significativo sobre o resultado do ensaio.

2.5.1.3 Teste de Recuperação

Segundo RELACRE/2000 – Guia 13 [44], realiza-se teste de recuperação utilizando uma série de amostras com a mesma matriz, variando-se somente a concentração do analito em teores bem conhecidos e ao longo de toda a faixa de trabalho. Analisam-se as amostras em duplicata e em condições de repetitividade, baseados em uma curva analítica em mesma matriz previamente construída. Após a realização dos testes de recuperação, verifica-se se as taxas de recuperação (calculadas pela equação 10) eram próximas de 100%, admitindo-se, entretanto, intervalos de recuperação mais extensos.

$$\text{Recuperação \%} = \frac{\text{Média do valor obtido} \times 100}{\text{Média do valor adicionado}} \quad (\text{Equação 10})$$

2.5.2 Especificidade

Habilidade do método de medir somente aquilo que se deseja medir [39,45].

2.5.3 Robustez

A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Um método diz-se robusto se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando esse está sendo executado [41].

2.5.4 Rugosidade

O teste de rugosidade é um estudo intra-laboratorial para estudar o comportamento de um processo analítico quando pequenas mudanças nas condições ambientais e/ou operacionais são feitas, semelhantes a aquelas prováveis de ocorrer em diferentes ambientes de ensaio. Permite a obtenção de informações dos efeitos de pequenas alterações de uma maneira rápida e sistemática [39,46].

2.5.5 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O Limite de Detecção é a verdadeira concentração líquida ou quantidade de analito no material analisado, que levará, com uma probabilidade determinada, à conclusão de que a concentração do analito no material analisado é maior que a da matriz branca [39,46]. Ou ainda o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método [41]. Já o Limite de Quantificação (LQ) corresponde às características de desempenho que marcam a habilidade de um processo de medição química de quantificar adequadamente um analito [39,47].

Meier & Zünd [48] propõem a obtenção de LD e LQ a partir da curva de calibração e de suas curvas de limite de confiança.

Dentre os testes que podem ser realizados na determinação de LD e LQ, destacam-se os descritos a seguir.

2.5.5.1 Relação Matemática I

GUIDE LINE 1996 [49] sugere as seguintes relações matemáticas:

$$\text{LDE} = 3s \quad (\text{Equação 11})$$

$$\text{LDM} = 3s \quad (\text{Equação 12})$$

$$\text{LQ} = 10s\sqrt{2} \quad (\text{Equação 13})$$

Onde LDE=Limite de Detecção do Equipamento, LDM=Limite de Detecção do Método e LQ=Limite de Quantificação. O fator $\sqrt{2}$ na fórmula de LQ refere-se ao fato de que a concentração ou massa da solução teste deve ser corrigida do branco.

2.5.5.2 Relação Matemática II

Segundo RELACRE/2000 - Guia 13 [44], os valores de LD e LQ devem ser calculados segundo as equações a seguir.

$$\text{LD} = x_0 + 3,3\sigma_0 \quad (\text{Equação 14})$$

$$\text{LQ} = x_0 + 10\sigma_0 \quad (\text{Equação 15})$$

Em que x_0 = média aritmética do teor medido de uma série de brancos ou padrões na menor concentração aceitável (10 ensaios), preparados de forma independente e analisados ao longo de vários dias de

trabalho, reproduzindo o melhor possível a situação de rotina, e σ_0 = desvio padrão associado a x_0 .

2.5.5.3 Relação Matemática III

Segundo EURACHEM [45] e INMETRO [41], LD e LQ devem ser calculados conforme as equações apresentadas abaixo.

$$LD = x_0 + 3s \quad (\text{Equação 16})$$

$$LQ = x_0 + 6s \quad (\text{Equação 17})$$

Onde x_0 é a média dos valores dos brancos e s é o desvio padrão associado a essas medidas.

2.5.6 Linearidade

Define a habilidade do método de obter resultados de ensaios diretamente proporcionais à concentração do analito [39,45]. Dentre os testes que podem ser realizados na determinação da linearidade, destacam-se os descritos a seguir.

2.5.6.1 Coeficiente de Linearidade, L

Segundo GUIDE LINE FORNO 1996 [49], devem-se aplicar os valores médios obtidos da curva analítica na fórmula

$$L = \frac{(A_{1,0} - A_{0,8})}{(A_{0,2} - A_b)} \quad (\text{Equação 18})$$

Onde o coeficiente de linearidade L é baseado na solução de calibração mais alta da faixa de trabalho ($A_{1,0}$) e da solução que corresponde a 80% ($A_{0,8}$) dessa faixa pela diferença de absorbâncias da solução que corresponde a 20% ($A_{0,2}$) e do branco (A_b).

Segundo o documento ISO Guideline GFAAS, a faixa será considerada linear se $L \geq 0,7$.

2.5.6.2 Resposta Relativa

Segundo HUBBER [50], a partir da média de sete curvas analíticas, calcula-se a resposta relativa, que consiste na absorbância associada a cada micrograma por litro. Assim,

$$\text{Resposta relativa} = \frac{\text{Absorbância da concentração}}{\text{Concentração}} \quad (\text{Equação 19})$$

Calcula-se a média aritmética da resposta relativa e, admitindo uma recuperação de $(100 \pm 20)\%$, fazem-se as respostas relativas associadas a 80 e 120%.

Efetua-se a análise gráfica da resposta relativa em função da concentração. Espera-se a horizontalidade das linhas obtidas em toda a faixa da escala. Altas concentrações apresentarão desvios negativos da linearidade. Linhas paralelas devem ser construídas no gráfico, correspondendo aos intervalos para mais e menos. O método é linear até o ponto onde a resposta relativa intercepta a linha correspondente ao 80%.

2.5.6.3 Teste F

Segundo ISO 8466-1 [51], deve-se utilizar a média das absorbâncias medidas em 7 curvas. Calcula-se F pela fórmula:

$$F_{\text{calculado}} = \frac{\text{Var do modelo quadrático}}{(7 \times \text{var do modelo linear}) - (6 \times \text{var do modelo quadrático})} \quad (\text{Equação 20})$$

Onde var = variância, e comparou-se o valor obtido com $F_{\text{crítico}}$ para 95% de confiança. Se $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$, o modelo linear se ajusta melhor e se $F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$, o quadrático apresenta melhor ajuste. A variância σ é igual a s^2 , onde s = desvio padrão. Os valores 7 e 6 do denominador são resultado de $n - gl$ para cada modelo, onde n = número de determinações (número de pontos para construção do gráfico, 9) e gl = graus de liberdade. Para o modelo linear, $gl=2$ (a e b da reta $y = ax + b$), e para o modelo quadrático, $gl=3$ (a, b e c da curva $y = ax^2 + bx + c$).

2.5.7 Faixa de Trabalho (FT)

É um intervalo de concentrações (padrão) no qual os requisitos de precisão de reprodutibilidade e de exatidão são satisfeitos. O limite inferior da FT coincide com LD ou LQ e o limite superior depende dos efeitos dependentes do sistema instrumental de reposta. A faixa de trabalho não precisa ser necessariamente retilínea para o método ser útil, mas a curva tem que ser reprodutível no tempo, isto é, em diferentes dias.

Para verificar e controlar a faixa de trabalho deve-se usar seis ou mais pontos de resposta instrumental versus concentração do analito.

2.5.8 Sensibilidade

Sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito, dependendo, portanto, da técnica de detecção utilizada e da natureza do analito [41]. Sob o ponto de vista prático, a sensibilidade constitui o coeficiente angular do gráfico analítico [52,53] expresso como:

$$S = \frac{dx}{dc} \quad (\text{Equação 21})$$

Onde S = sensibilidade, dx = variação da resposta e dc = variação da concentração [41].

Em métodos sensíveis, uma pequena diferença na concentração do analito causa grande variação no valor do sinal analítico medido. Esse critério expressa a capacidade do procedimento analítico gerar variação no valor da propriedade monitorada ou medida, causada por pequeno incremento na concentração ou quantidade do analito. Entretanto, tornou-se comum o uso errôneo desse termo para designar método com baixo limite de detecção [54]. Dentre os testes que podem ser realizados na determinação da sensibilidade, destaca-se o descrito a seguir.

2.5.8.1 Inclinação da Curva Analítica

Segundo INMETRO – DOQ-CGCRE-008 [41], a inclinação da curva de regressão linear de calibração corresponde ao coeficiente angular da reta. Assim, utilizando a curva média, realizam-se cálculos partindo de x como valores plotados na abscissa (concentração) e y como valores plotados no eixo das ordenadas (absorbância). A inclinação é dada por S_{xy}/S_{xx} , sendo $S_{xy} = \sum(y_i - \bar{y}) \cdot (x_i - \bar{x})$ (Equação 22) e $S_{xx} = \sum(x_i - \bar{x})^2$ (Equação 23). O índice i corresponde a cada concentração.

2.5.9 Exatidão

Exatidão do método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro. A exatidão, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos (tendência). Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros: uso de materiais

de referência, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação [41].

Dentre os testes que podem ser realizados na determinação da exatidão, destacam-se os descritos a seguir.

2.5.9.1 Teste de Recuperação

Segundo AOAC (2002) [55], deve-se realizar um teste de recuperação (conforme descrito em 2.5.1.3). Observam-se os valores da recuperação ao longo da curva e compara-se com os valores do documento publicado pela AOAC (2002), que fornece dados de recuperação como função da concentração do analito, os quais são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Recuperação do analito em diferentes concentrações.

Ingrediente ativo	Razão do analito	Unidade	Recuperação média %
100	1	100%	98-102
≥ 10	10 ⁻¹	10%	98-102
≥ 1	10 ⁻²	1%	97-103
≥ 0,1	10 ⁻³	0,1%	95-105
0,01	10 ⁻⁴	100 µg g ⁻¹	90-107
0,001	10 ⁻⁵	10 µg g ⁻¹	80-110
0,0001	10 ⁻⁶	1 µg g ⁻¹	80-110
0,00001	10 ⁻⁷	100 µg kg ⁻¹	80-110
0,000001	10 ⁻⁸	10 µg kg ⁻¹	60-115
0,0000001	10 ⁻⁹	1 µg kg ⁻¹	40-120

Fonte: AOAC Peer Verified methods Program, Manual on policies and procedures, Arlington, VA, Nov 1993 IN: FAQ, METHOD VALIDATION.

2.5.9.2 Utilizando Materiais de Referência Certificados

Sempre que possível, os Materiais de Referência Certificados (MRC) devem ser utilizados no processo de validação de um método de ensaio. Um MRC possui um valor de concentração, ou outra grandeza, para cada parâmetro e uma incerteza associada. É muito importante, portanto, que o fornecimento desses MRC seja realizado por organismos reconhecidos e

confiáveis. O uso correto dos MRC consiste na sua análise para avaliar o desempenho do laboratório. Quando o valor obtido não estiver dentro do intervalo da incerteza indicado para o valor certificado, o laboratório deve procurar as causas desse desvio e tentar eliminá-las ou aceitá-las, dependendo do rigor definido para os resultados. Na avaliação da exatidão utilizando um material de referência, os valores obtidos pelo laboratório – média e o desvio padrão de uma série de ensaios em replicata – devem ser comparados com os valores certificados do material de referência [41].

Partindo de 5 medidas efetuadas com o padrão de referência certificado, determinam-se as concentrações mediante substituição na equação da reta já obtida.

Sabendo o valor certificado, aplica-se o teste t (conforme descrito em 2.5.1.2). O número de graus de liberdade é $n-1=4$, sendo n =número de leituras realizadas e o 1 subtraído proveniente da média determinada. A aceitabilidade do método proposto em termos de exatidão é dada mediante comparação de $t_{\text{calculado}}$ e t_{tabelado} .

2.5.10 Precisão

Grau de concordância entre resultados independentes obtidos sob condições específicas estipuladas [56].

2.5.10.1 Repetitividade

É o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade. São elas:

- Mesmo procedimento de medição;
- Mesmo observador;
- Mesmo instrumento de medição usado sob as mesmas condições;
- Mesmo local, e
- Repetições em curto espaço de tempo [57].

Dentre os testes que podem ser realizados na determinação da repetitividade, destaca-se o descrito a seguir.

2.5.10.1.1 Coeficiente de Variação do Desvio Padrão de Repetitividade

Segundo INMETRO-DOQ-CGCRE-008 [41], faz-se a leitura de absorbância para 7 curvas e aplicam-se os valores obtidos na equação da reta. A partir das concentrações calculadas, calculam-se Sr (desvio padrão de repetitividade), coeficiente de variação de Sr, sua média, desvio padrão e o limite de repetitividade, r. A fórmula de r vem da dedução de que o desvio padrão entre duas medidas é $\sqrt{2}.Sr$, e para um intervalo de confiança de 95% com expectativa de diferença nula, esse valor é $r = 1,96 \times \sqrt{2}.Sr = 2,8Sr$ (Equação 24). O valor 1,96 corresponde a $z_{\alpha/2}$, onde $\alpha=0,05$ para 95% de confiança ($1,00-0,95=0,05$) [58].

O critério de aceitabilidade para a precisão dependerá da matriz, da concentração do analito e da técnica utilizada. O Manual AOAC Peer Verified Methods Program, 1993 [55], inclui uma tabela com a precisão estimada como função da concentração do analito, cuja tabela resumo é apresentada abaixo (Tabela 8) como uma forma de exemplificação, podendo, entretanto ser utilizados outros critérios de aceitabilidade.

Tabela 8 – Precisão como função da concentração do analito.

Analito %	Razão do analito	Unidade	CV (%)
100	1	100%	1,3
10	10^{-1}	10%	2,8
1	10^{-2}	1%	2,7
0,1	10^{-3}	0,1%	3,3
0,01	10^{-4}	$100 \mu\text{g g}^{-1}$	5,3
0,001	10^{-5}	$10 \mu\text{g g}^{-1}$	7,3
0,0001	10^{-6}	$1 \mu\text{g g}^{-1}$	11
0,00001	10^{-7}	$100 \mu\text{g kg}^{-1}$	15
0,000001	10^{-8}	$10 \mu\text{g kg}^{-1}$	21
0,0000001	10^{-9}	$1 \mu\text{g kg}^{-1}$	30

Fonte: AOAC Peer Verified methods Program, Manual on policies and procedures, Arlington, VA, Nov 1993 IN: FAQ, METHOD VALIDATION.

2.5.10.2 Reprodutibilidade

É o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, efetuadas sob condições variadas de medição. Embora a reprodutibilidade não seja um componente de validação de um método executado por um único laboratório, é considerada importante quando um laboratório busca a verificação do desempenho dos seus métodos em relação aos dados de validação obtidos através de comparação interlaboratorial [59].

Dentre os testes que podem ser realizados na determinação da reprodutibilidade, destaca-se o descrito a seguir.

2.5.10.2.1 Índice Z (Z score)

O índice Z é um modo de avaliar o desempenho do laboratório, utilizando materiais de referência certificados.

$$Z = \frac{(x_{\text{lab}} - x_v)}{s} \quad (\text{Equação 25})$$

Onde:

x_{lab} = valor obtido pelo laboratório

x_v = valor aceito como verdadeiro (valor certificado do MRC)

s = unidade de desvio (incerteza do MRC) [60].

A avaliação pode ser feita de acordo com a seguinte escala de pontuação:

$|Z| \leq 2$ = satisfatório

$2 < |Z| \leq 3$ = questionável

$|Z| > 3$ = insatisfatório [41].

A Figura 8, a seguir mostra os valores de z associados aos valores mais prováveis considerando uma distribuição normal.

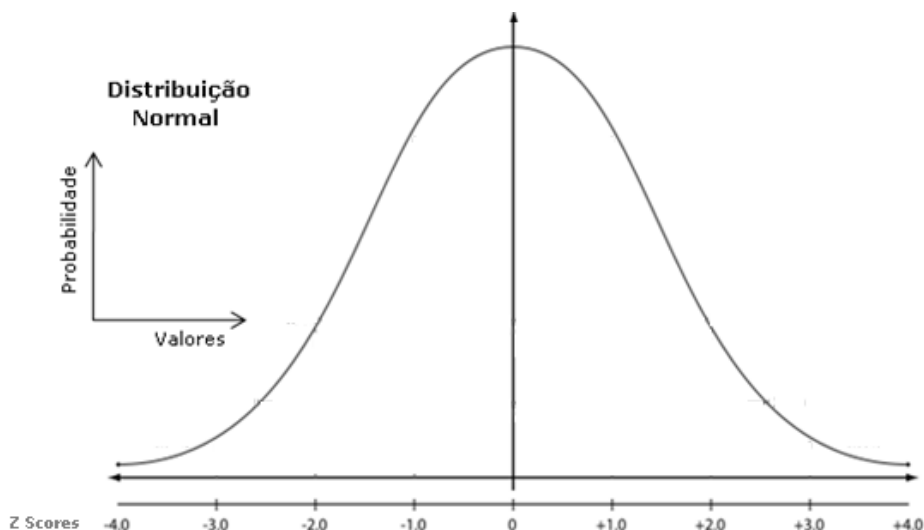


Figura 8 - Representação de uma distribuição normal, contendo os valores de Z-scores.

2.5.10.3 Precisão Intermediária

A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como: diferentes analistas, diferentes equipamentos e diferentes tempos.

Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um laboratório e, como tal, mais aconselhável de usar. Para determinar a precisão intermediária de um método, efetuam-se "n" medições em replicata, ou em ensaio único, sobre a amostra, nas condições pré-definidas, pois existem vários métodos de estudar este tipo de precisão. Quando aplicável este procedimento é repetido sobre outras amostras, abrangendo outros níveis de concentração [41].

2.5.11 Incerteza

Parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser fundamentalmente atribuídos a um mensurando [61].

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aparelhagem e Programações

- Purificador de ácidos por sub-ebulição (técnica caracterizada pela evaporação quiescente do líquido a ser destilado. Sua eficiência está no fato de que, não havendo ebulição, não há formação de bolhas, as quais poderiam, durante a ruptura, arrastar partículas na corrente de vapor, acarretando na contaminação do destilado) [62].
- Sistema de purificação de água
- Balança analítica
- Sistema de controle de contaminantes do ar – Sala Limpa Classificada
- Espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite
 - Equipamento - P. Elmer, modelo 5100, acoplado a um HGA 600, com amostrador automático
 - Comprimento de onda - 283,3 nm
 - Largura de fenda - 0,7 nm
 - Volume de amostra: 20 µL
 - Medição de resposta - Integração da área do sinal do Pb²⁺.
 - Gás de proteção: Argônio – pureza mínima 99,99%.
 - Programação de temperatura: A Tabela 9 e a Figura 9 mostram a programação de temperatura.

Tabela 9 - Programação de temperatura do forno de grafite.

Temperatura (°C)	Tempo (min.)	
	Rampa	Constante
100	2	5
120	10	20
700	20	20
20	1	5
1900	1	7
1800	2	3
20	1	5

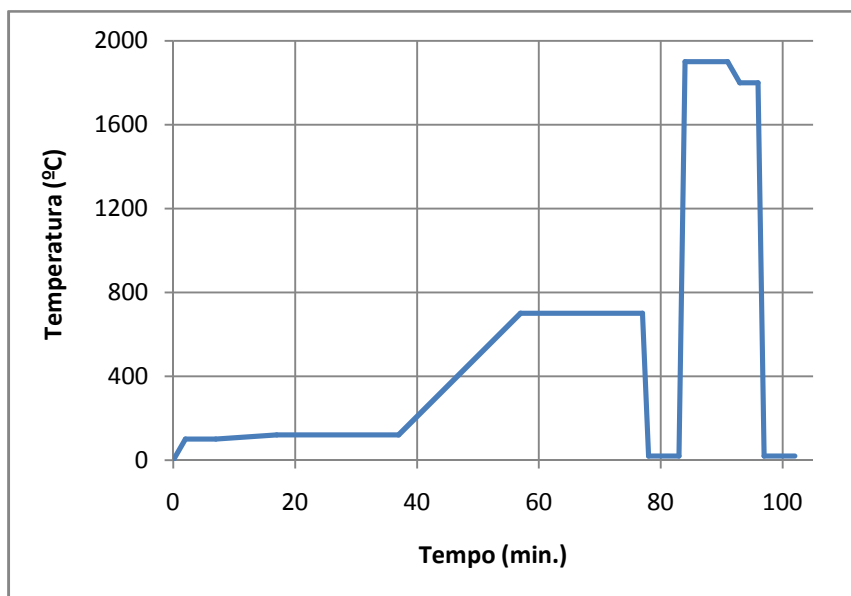


Figura 9 - Gráfico da programação de temperatura do forno de grafite.

3.2 Reagentes

- Ácido nítrico PA
- Água purificada tipo I
- Nitrato de magnésio hexa hidratado PA
- ICP Solução padrão multielementos IV - Teor de Pb $990 \pm 10 \text{ mg L}^{-1}$ em ácido nítrico 1 mol L^{-1}

3.3 Soluções e modo de preparo

- Ácido nítrico Merck, 65% purificado
 - Preparo: Sub-ebulição do ácido nítrico PA, realizada lentamente a uma temperatura 10°C menor que a temperatura de ebulição da substância. A primeira fração ebulida deve ser dispensada a fim de garantir total limpeza das partes internas do purificador.
- Branco - Solução de ácido nítrico purificado $0,2\% \text{ v v}^{-1}$
 - Preparo: Coletou-se volume apropriado de ácido nítrico purificado e completou-se o volume do balão com água purificada.
- Solução de nitrato de magnésio hexa hidratado
 - Preparo: Mediu-se cerca de $0,43 \text{ g}$ de nitrato de magnésio PA e dissolveu-se em um béquer.

- Transferiu-se para balão de 25,00 mL, adicionou-se 50 µL de ácido nítrico purificado e completou-se com água purificada.
- Solução estoque - 10000 µg L⁻¹
 - Preparo: Coletou-se 100 µL da solução de referência de Pb (1000 µg mL⁻¹) e transferiu-se para balão de 10,00 mL, completando o volume com ácido nítrico purificado 0,2% v v⁻¹.
- Soluções estoque intermediárias – 50,0 µg L⁻¹ e 100,0 µg L⁻¹
 - Preparo: Para as soluções 50,0 e 100,00 µg L⁻¹, coletou-se respectivamente 50 e 100 µL da solução estoque (10000 µg L⁻¹) e transferiu-se para balões individuais de 10,00 mL, completando o volume com ácido nítrico purificado 0,2% v v⁻¹.
- Soluções padrão
 - Preparo: As soluções foram feitas conforme mostra a Tabela 10, sendo todas preparadas ao uso.

Tabela 10 - Preparo de padrões utilizando o recurso de diluição do equipamento.

Conc. Final (µg L ⁻¹)	Volume coletado da Solução Estoque (µL)	
	Estoque 50,0 µg L ⁻¹	Estoque 100,0 µg L ⁻¹
100,0	-	20
80,0	-	16
60,0	-	12
50,0	20	-
40,0	16	-
25,0	10	-
10,0	4	-
5,0	2	-

Nota: Os volumes inferiores a 20 µL foram completados com o volume apropriado de ácido nítrico purificado e água, até atingir a proporção 0,2% v v⁻¹.

3.4 Especificações

- Elemento ensaiado: Íon chumbo (Pb²⁺)

- Matriz: Águas de diálise (armazenada à temperatura ambiente)
- Conservante: Ácido nítrico 0,5% v v⁻¹, segundo especificação Standard methods for the examination of water and wastewater-1998 [44].
- Modificador químico: Nitrato de magnésio

3.5 Observações

- Todos os ensaios foram conduzidos no interior de uma sala limpa classe ISO-7 com a finalidade de minimizar possíveis fontes de contaminação.
- O manuseio das amostras e padrões foi efetuado sob os módulos de fluxo laminar classe ISO-5 ou dentro de capela de fluxo laminar classe ISO-5.

3.6 Parâmetros para validação do método

3.6.1 Seletividade

Prepararam-se os padrões 100,0; 80,0; 60,0; 50,0; 40,0; 25,0; 10,0 e 5,0 µg L⁻¹, avolumando com solução de HNO₃ 0,2% v v⁻¹ e com solução amostral, havendo preparo dos mesmos padrões em matrizes distintas.

Realizaram-se o Teste Visual (conforme item 2.5.1.1), o procedimento descrito por INMETRO-DOQ-CGCRE-008/2003 [41] (conforme item 2.5.1.2) e por RELACRE/2000 - Guia 13 [44] (conforme item 2.5.1.3), sendo o último método realizado com matriz de HNO₃ 0,2% v v⁻¹.

3.6.2 Linearidade

Realizaram-se os procedimentos descritos por GUIDE LINE FORNO 1996 [49] (conforme item 2.5.6.1), por HUBBER [50] (conforme item 2.5.6.2), o qual foi baseado em curvas com matriz de HNO₃ 0,2% v v⁻¹, e o procedimento descrito pela ISO 8466-1 [51] (conforme item 2.5.6.3), em cujas curvas havia os pontos 0, 5, 10, 20, 40, 50, 60, 80 e 100 µg L⁻¹.

3.6.3 Sensibilidade

Realizou-se o procedimento descrito por INMETRO – DOQ-CGCRE-008 [41] (conforme item 2.5.8.1), utilizando a curva média feita em HNO₃ 0,2%

v v⁻¹. O índice i variou de 1 a 9, tendo em vista as 9 concentrações diferentes.

3.6.4 Limites de Detecção e de Quantificação

Realizaram-se os procedimentos descritos por GUIDE LINE 1996 [49] (conforme item 2.5.5.1), por RELACRE/2000 - Guia 13 [44] (conforme item 2.5.5.2) e por EURACHEM [45] e INMETRO [41] (conforme item 2.5.5.3). Em todos consideraram-se os resultados provenientes da curva construída em matriz de HNO₃ 0,02% v v⁻¹.

3.6.5 Precisão

3.6.5.1 Repetitividade

A Repetitividade foi determinada segundo INMETRO-DOQ-CGCRE-008 [41] (conforme item 2.5.10.1.1) e, baseando-se no Manual AOAC Peer Verified Methods Program, 1993 [55], o critério de aceitabilidade é para CV de 21% ao longo da curva.

3.6.5.2 Reprodutibilidade

A Reprodutibilidade foi determinada pelo Índice Z (Z score) (conforme item 2.5.10.2.1).

3.6.6 Exatidão

A exatidão foi determinada segundo AOAC (2002) [55] (conforme item 2.5.9.1) empregando o teste de recuperação já efetuado. A faixa de recuperação média considerada foi de 60 a 115%. Tal parâmetro foi ainda determinado utilizando MRC (conforme item 2.5.9.2). Neste caso, o padrão utilizado foi NIST 1643d, cujo valor certificado é (18,15±0,64) µg L⁻¹, e determinou-se as concentrações mediante substituição na equação da reta já obtida para matriz de HNO₃ 0,2% v v⁻¹.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seletividade

4.1.1 Teste visual

Os valores de absorvância relacionados às diferentes concentrações na curva com HNO₃ 0,2% v v⁻¹ são mostrados na Tabela 11.

Tabela 11 – Dados da curva em matriz de HNO₃ 0,2% v v⁻¹.

Conc. (µg L ⁻¹)	Abs _ HNO ₃ 0,2% v v ⁻¹							Média
	1	2	3	4	5	6	7	
0	0	0	0	0	0	0	0	0,000
5	0,050	0,068	0,045	0,052	0,052	0,050	0,054	0,053
10	0,081	0,092	0,082	0,092	0,081	0,083	0,090	0,086
20	0,163	0,141	0,142	0,157	0,145	0,151	0,149	0,150
40	0,288	0,281	0,278	0,276	0,279	0,286	0,272	0,280
50	0,357	0,357	0,355	0,338	0,336	0,344	0,339	0,346
60	0,443	0,417	0,401	0,426	0,402	0,406	0,414	0,415
80	0,593	0,519	0,525	0,533	0,526	0,515	0,526	0,534
100	0,717	0,645	0,640	0,628	0,652	0,622	0,623	0,647

Os valores de absorvância relacionados às diferentes concentrações na curva feita com matriz amostral são mostrados na Tabela 12.

Tabela 12 - Dados da curva usando a amostra como matriz.

Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Abs _ Amostra							Média
	1	2	3	4	5	6	7	
0	0,000	0,016	0,027	0,000	0,009	0,000	0,003	0,008
5	0,055	0,059	0,068	0,060	0,047	0,049	0,056	0,056
10	0,083	0,098	0,100	0,086	0,079	0,093	0,109	0,093
20	0,148	0,163	0,189	0,155	0,143	0,169	0,172	0,163
40	0,269	0,274	0,282	0,280	0,272	0,287	0,298	0,280
50	0,347	0,342	0,348	0,336	0,331	0,350	0,353	0,344
60	0,389	0,393	0,429	0,428	0,398	0,431	0,431	0,414
80	0,513	0,489	0,528	0,523	0,517	0,520	0,544	0,519
100	0,569	0,603	0,625	0,626	0,628	0,636	0,661	0,621

Um gráfico comparativo entre as duas matrizes é mostrado na Figura 10.

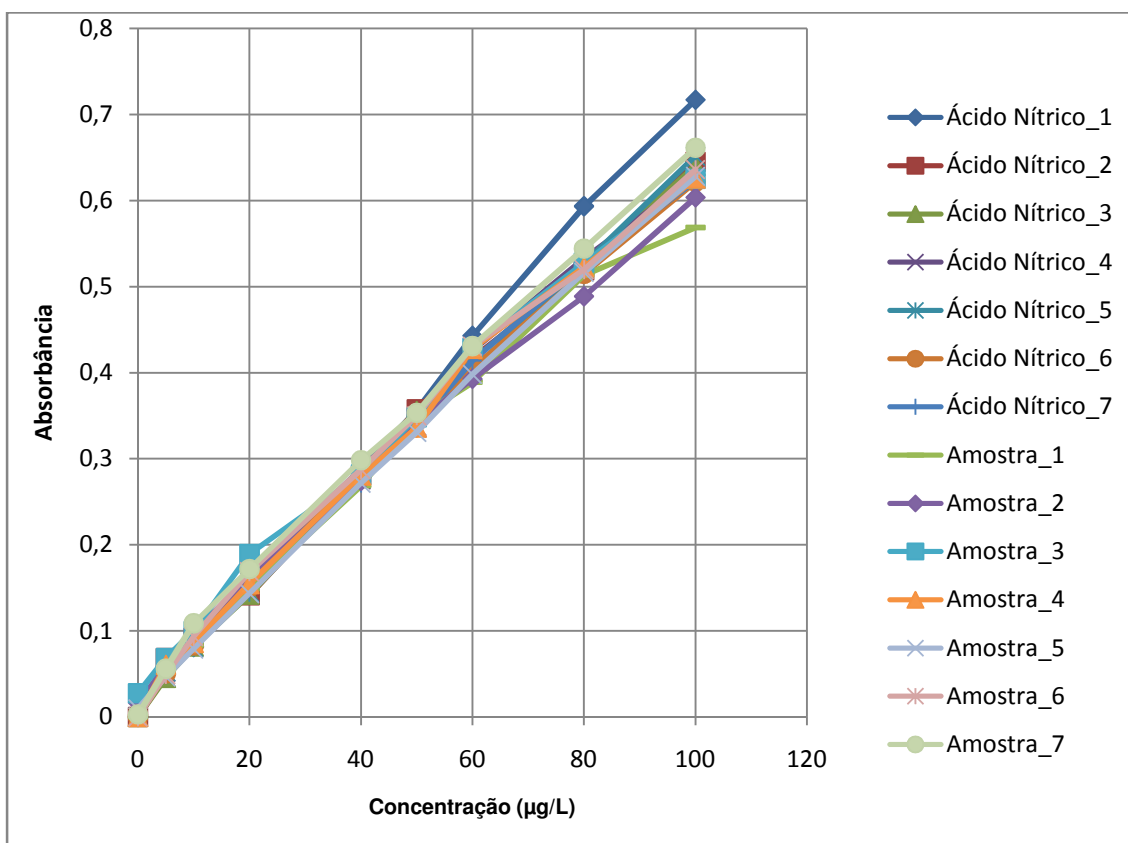


Figura 10 - Gráfico comparativo da absorvância versus concentração do analito em matriz de ácido nítrico 0,2% v v⁻¹ e usando a amostra como matriz.

Logo, a aproximação entre os pontos das curvas indicam que o método proposto deve ser seletivo.

4.1.2 Teste F e Teste t

Os dados empregados são mostrados na Tabela 13, a seguir.

Tabela 13 - Absorvância usando HNO₃ 0,2% v v⁻¹ como matriz e usando a amostra, em função das concentrações do analito.

Conc. (µg L ⁻¹)	Abs	
	HNO ₃ 0,2% v v ⁻¹	Amostra
0	0,000	0,008
5	0,053	0,056
10	0,086	0,093
20	0,150	0,163

Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Abs	
	HNO₃ 0,2% v v⁻¹	Amostra
40	0,280	0,280
50	0,346	0,344
60	0,415	0,414
80	0,534	0,519
100	0,647	0,621

Os resultados obtidos por aplicação dos testes F e t são mostrados nas Tabela 14 e 15, respectivamente.

Tabela 14 - Resultado do Teste F_duas matrizes para variâncias.

Parâmetros	HNO₃ 0,2% v v⁻¹	Amostra
Média	0,279	0,278
Variância	0,051	0,046
Observações	9	9
gl	8	8
F	1,103	
P(F<=f) uni-caudal	0,447	
F crítico uni-caudal	3,438	

Como $P > 0,05$, não existe diferença estatisticamente significativa entre as duas matrizes para a análise segundo o método proposto. Além disso, sendo $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$, pode-se afirmar que não há diferença na média entre os grupos.

Tabela 15 - Resultado do Teste t_duas matrizes presumindo variâncias equivalentes

Parâmetros	HNO₃ 0,2% v v⁻¹	Amostra
Média	0,279	0,278
Variância	0,051	0,046
Observações	9	9

Parâmetros	HNO₃ 0,2% v v⁻¹	Amostra
Variância agrupada	0,048	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	16	
Stat t	0,014	
P(T<=t) uni-caudal	0,495	
t crítico uni-caudal	1,746	
P(T<=t) bi-caudal	0,989	
t crítico bi-caudal	2,120	

Como $P > 0,05$, não existe diferença estatisticamente significativa entre as duas matrizes para a análise segundo o método proposto. Além disso, como $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$, pode-se afirmar que não há diferença média significativa.

4.1.3 Teste de Recuperação

A curva média foi feita em HNO₃ 0,2% v v⁻¹, tendo sido verificado sua não interferência nas análises segundo o método proposto (Tabela 16).

Tabela 16 - Dados para construção da curva analítica Absorbância versus concentração em matriz HNO₃ 0,2% v v⁻¹.

Conc. (µg L⁻¹)	Abs Média
0	0,000
5	0,053
10	0,086
20	0,150
40	0,280
50	0,346
60	0,415
80	0,534
100	0,647

A curva analítica referente aos valores da Tabela 16 é mostrada na Figura 11.

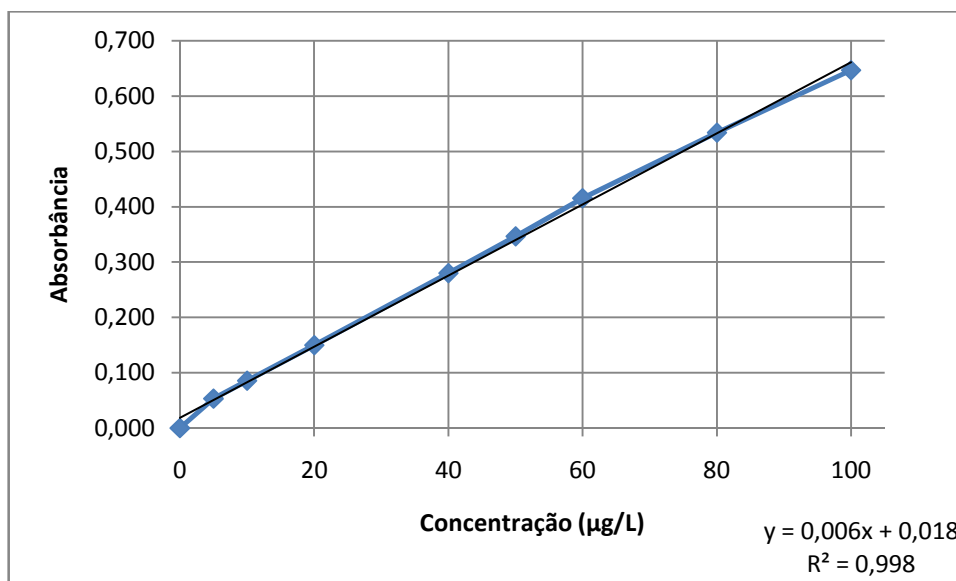


Figura 11 - Curva analítica de chumbo em matriz HNO₃ 0,2% v v⁻¹.

A Tabela 17, a seguir, resume o teste de recuperação aplicado.

Tabela 17 - Resumo do teste de recuperação.

Adicionado (µg de Pb)	Abs. Média	Conc. segundo a curva (µg L⁻¹)	Recuperação %
0	0,008	0,00	-
5	0,056	5,89	117,8
10	0,093	11,54	115,4
20	0,163	22,45	112,2
40	0,280	40,75	101,9
50	0,344	50,67	101,3
60	0,414	61,56	102,6
80	0,519	77,91	97,4
100	0,621	93,81	93,8

4.2 Linearidade

4.2.1 Coeficiente de Linearidade, L

Os dados de absorvância em função da concentração em 7 diferentes curvas, bem como sua média, são mostrados na Tabela 18.

Tabela 18 - Absorbância em função da concentração em 7 diferentes curvas e sua média.

Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Abs							Média
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Curva 7	
0	0	0	0	0	0	0	0	0,000
20	0,163	0,141	0,142	0,157	0,145	0,151	0,149	0,150
80	0,593	0,519	0,525	0,533	0,526	0,515	0,526	0,534
100	0,717	0,645	0,640	0,628	0,652	0,622	0,6231	0,647

Utilizando a fórmula geral da Equação 18, obtém-se $L=0,75$. Segundo a ISO Guideline GFAAS, a faixa será considerada linear se $L \geq 0,7$. Assim, a faixa testada pode ser considerada linear.

4.2.2 Resposta Relativa

A partir da média das sete curvas construídas e conhecendo a concentração correspondente, calculou-se a resposta relativa, que consiste na absorvância associada a cada $\mu\text{g L}^{-1}$ a partir da Equação 19.

A Tabela 19 resume o procedimento realizado.

Tabela 19 - Absorbância em função da concentração para 7 curvas, sua média e a resposta relativa calculada.

Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Abs								Resposta Relativa
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Curva 7	Curva Média	
0	0	0	0	0	0	0	0	0,000	
5	0,050		0,045	0,052	0,052	0,050		0,050	0,010
10	0,081	0,092	0,082	0,092	0,081	0,083	0,090	0,086	0,009
20	0,163	0,141	0,142	0,157	0,145	0,151	0,149	0,150	0,008
40	0,288	0,281	0,278	0,276	0,279	0,286	0,272	0,280	0,007
50	0,357	0,357	0,355	0,338	0,336	0,344	0,339	0,346	0,007
60	0,443	0,417	0,401	0,426	0,402	0,406	0,414	0,415	0,007
80	0,593	0,519	0,525	0,533	0,526	0,515	0,526	0,534	0,007
100	0,717	0,645	0,640	0,628	0,652	0,623	0,623	0,647	0,007

A média aritmética da resposta relativa é 0,008. Admitindo uma recuperação de $(100 \pm 20)\%$, têm-se as seguintes respostas relativas associadas:

$$\text{Para } 80\% - 0,008 \times 0,80 = 0,006$$

$$\text{Para } 120\% - 0,008 \times 1,20 = 0,010.$$

O gráfico obtido para estes valores é mostrado na Figura 12, a seguir.

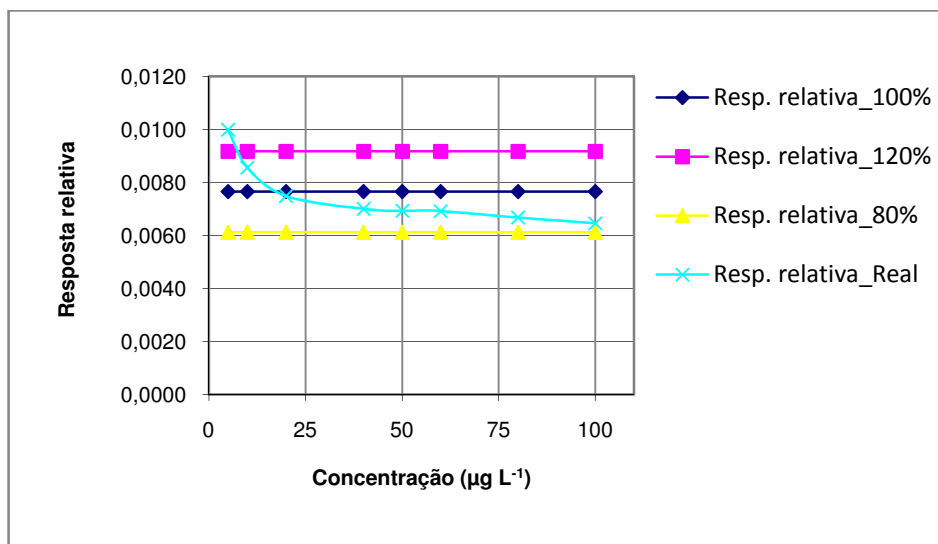


Figura 12 - Gráfico da resposta relativa versus concentração admitindo diferentes valores de recuperação.

Logo, segundo o critério adotado por Hubber, a faixa não pode ser considerada linear de 5 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ pelo fato da resposta relativa não estar restrita ao intervalo estabelecido de mais ou menos 20%.

4.2.3 Teste F

Utilizando os dados da Tabela 19, calculou-se F pela Equação 13 e comparou-se o valor obtido com $F_{\text{crítico}}$, que para 95% de confiança vale 4,21. Resolvendo o cálculo obtém-se $F_{\text{calculado}} = 0,005$. Logo, o modelo pode ser considerado linear.

4.3 Sensibilidade

4.3.1 Inclinação da Curva Analítica

A inclinação da curva de regressão linear de calibração corresponde ao coeficiente angular da reta. Assim, utilizando a curva média feita em HNO_3 0,2% v v⁻¹, realizaram-se os cálculos mostrados na Tabela 20, partindo de x como valores plotados na abscissa (concentração) e y como valores plotados no eixo das ordenadas (absorbância).

Tabela 20 - Série de cálculos partindo de x=concentração (em $\mu\text{g L}^{-1}$) e y=absorbância.

x	y	\bar{x}	\bar{y}	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$	$y_i - \bar{y}$	$(y_i - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})$
0	0	40,560	0,279	40,556	1644,753	0,279	0,078	11,314
5	0,053			35,556	1264,198	0,226	0,051	8,028
10	0,086			30,556	933,642	0,193	0,037	5,907
20	0,150			20,556	422,531	0,129	0,017	2,657
40	0,280			0,5556	0,309	0,001	0,000	0,001
50	0,346			9,4444	89,198	0,067	0,005	0,637
60	0,415			19,444	378,086	0,136	0,019	2,653
80	0,534			39,4444	1555,864	0,255	0,065	10,052
100	0,647			59,444	3533,642	0,368	0,135	21,852

A partir daí tem-se os resultados finais mostrados na Tabela 21.

Tabela 21 - Resultados finais baseados nos cálculos da Tabela 20.

Parâmetro	Resultado
Σx	365
Σy	2,512
Σxy	164,923
Σx^2	24625
Σy^2	1,107
$S_{xx} = \Sigma(x_i - \bar{x})^2$	9822
$S_{yy} = \Sigma(y_i - \bar{y})^2$	0,406
$S_{xy} = \Sigma(y_i - \bar{y})(x_i - \bar{x})$	63,099
Inclinação = S_{xy}/S_{xx}	0,006

Logo, a inclinação da reta, que representa a sensibilidade do método, é 0,006.

4.4 Limites de Detecção e Quantificação

4.4.1 Relação Matemática I

O resultado das leituras do branco em matriz de HNO₃ 0,2% v v⁻¹ é mostrado na Tabela 22, a seguir.

Tabela 22 - Absorbância em função da concentração nas leituras de branco em HNO₃ 0,2% v/v.

Número do Ensaio	Abs.	Conc. (µg L⁻¹)
1	0,011	-1,191
2	0,011	-1,182
3	0,009	-1,533
4	0,007	-1,779
5	0,006	-1,871
6	0,007	-1,751
7	0,009	-1,477
8	0,013	-0,899
9	0,013	-0,786
10	0,015	-0,502

A concentração mostrada na tabela anterior é baseada na equação da curva analítica, $y = 0,006x + 0,018$ (Figura 11). Na Tabela 23, tem-se a média entre as 10 leituras, desvio padrão absoluto e coeficiente de variação.

Tabela 23 - Valor médio das 10 leituras, desvio padrão absoluto e coeficiente de variação.

Branco HNO₃ 0,2% v v⁻¹	Média	Desvio Padrão	CV (%)
Abs.	0,010	0,003	29,349
Conc. (µg L ⁻¹)	-1,297	0,463	-35,708

Com estes dados podemos calcular LDE (Limite de Detecção do Equipamento), LDM (Limite de Detecção do Método) e LQ (Limite de Quantificação), segundo GUIDE LINE 1996, pelas Equações 11, 12 e 13, respectivamente. Os resultados são: LDE=1,389 µg L⁻¹; LDM=1,389 µg L⁻¹ e LQ=6,550 µg L⁻¹.

4.4.2 Relação Matemática II

Sendo $X_0 = -1,297 \mu\text{g L}^{-1}$ e $\sigma_0 = 0,463 \mu\text{g L}^{-1}$, tem-se LD=0,231 µg L⁻¹ e LQ=3,334 µg L⁻¹, baseado nas Equações 14 e 15.

4.4.3 Relação Matemática III

A partir das Equações 16 e 17, calculou-se LD e LQ. Os resultados são: LD=0,092 µg L⁻¹ e LQ=1,480 µg L⁻¹.

4.5 Precisão

4.5.1 Coeficiente de Variação do Desvio Padrão de Repetitividade

O resultado das 7 curvas de absorvância versus concentração, bem como a média desses valores é mostrado na Tabela 24.

Tabela 24 - Absorbância para as diferentes concentrações de Pb^{2+} e média desses valores.

Conc. ($\mu g L^{-1}$)	Absorbância							Média
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Curva 7	
0,00	0	0,016	0,027	0	0,009	0	0,003	0,008
5,00	0,055	0,059	0,068	0,060	0,047	0,049	0,056	0,056
10,00	0,083	0,098	0,100	0,086	0,079	0,093	0,109	0,093
20,00	0,148	0,163	0,189	0,155	0,143	0,169	0,172	0,163
40,00	0,269	0,274	0,282	0,280	0,272	0,287	0,298	0,280
50,00	0,347	0,342	0,348	0,336	0,331	0,350	0,353	0,344
60,00	0,389	0,393	0,429	0,428	0,398	0,431	0,431	0,414
80,00	0,513	0,489	0,528	0,523	0,517	0,520	0,544	0,519
100,00	0,569	0,603	0,625	0,626	0,628	0,636	0,661	0,621

Aplicando os valores obtidos na equação da reta, baseada na curva da Figura 11, têm-se os resultados apresentados na Tabela 25 a seguir.

Tabela 25 - Valores obtidos na equação da reta baseada na curva analítica da Figura 11.

Conc. ($\mu g L^{-1}$)	Conc. a partir da equação $y = 0,006x + 0,018$ ($\mu g L^{-1}$)							Média
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Curva 7	
0,00	-2,871	-0,334	1,400	-2,871	-1,413	-2,871	-2,435	-1,628
5,00	5,697	6,298	7,751	6,524	4,384	4,779	5,803	5,891
10,00	10,113	12,420	12,628	10,506	9,437	11,636	14,034	11,123
20,00	20,214	22,476	26,588	21,187	19,451	23,364	23,858	22,448

Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Conc. a partir da equação $y = 0,006x + 0,018$ ($\mu\text{g L}^{-1}$)							Média
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Curva 7	
40,00	38,922	39,772	40,978	40,782	39,402	41,848	43,540	40,749
50,00	51,185	50,417	51,296	49,461	48,598	51,594	52,115	50,667
60,00	57,651	58,260	63,854	63,724	59,063	64,176	64,175	61,558
80,00	77,047	73,180	79,298	78,512	77,542	78,025	81,798	77,915
100,00	85,650	91,055	94,447	94,507	94,896	96,107	100,030	93,813

A partir destes valores calcularam-se S_r , que corresponde ao desvio padrão de repetitividade, e r , que é o limite de repetitividade dado por $r=2,8 S_r$, para um nível de confiança de 95%, conforme detalhado em 2.5.10.1.1 (Tabela 26).

Tabela 26 - Desvio padrão de repetitividade e limite de repetitividade para um nível de confiança de 95% em função de cada concentração, bem como o coeficiente de variação do desvio padrão de repetitividade.

Conc ($\mu\text{g L}^{-1}$)	S_r ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r	CV de S_r %
0,00	1,642	4,593	100,860
5,00	1,124	3,147	19,100
10,00	1,300	3,641	11,700
20,00	2,433	6,814	10,800
40,00	1,590	4,451	3,900
50,00	1,253	3,509	2,470
60,00	3,056	8,557	4,960
80,00	2,604	7,290	3,340
100,00	4,476	12,533	4,770

A média de CV vale 7,63%, seu desvio padrão é 5,76% e seu limite de repetitividade r é igual a $2,8 \times 5,76$ ou 16,12. Média e desvio padrão são obtidos excluindo a medida referente ao branco.

Como CV ao longo da curva apresentou valores entre 2,47 a 19,08%, este está dentro do critério de aceitabilidade de 21%.

4.5.2 Índice Z (Z score)

Os resultados obtidos e os cálculos realizados são mostrados na Tabela 27.

Tabela 27 - Resultado dos testes de reprodutibilidade segundo MRC.

Amostra	Resultados das Replicatas			Média das replicatas	Valor Designado
PEP - Programa de Ensaios de Proficiência - Metais em matriz Água - PEP 001/2004 - maio de 2004					
G1A001-04	0,418	0,398	0,391	0,402	0,3602
G1B001-04	0,305	0,304	0,336	0,315	0,2500
PEP - Programa de Ensaios de Proficiência - Metais em matriz Água - PEP 003/2004 - outubro de 2004					
G1A001-04	0,308	0,273	0,282	0,288	0,2882
G1B001-04	0,444	0,444	0,459	0,449	0,4522
Ensaio de Proficiência de Laboratórios Ambientais - Rede Metrológica RS - Segunda Rodada 2004					
Amostra X	0,325	0,287	0,382	0,331	0,290
Amostra Y	0,557	0,596	0,640	0,597	0,589
Ensaio de Proficiência de Laboratórios Ambientais - Rede Metrológica RS - Quarta Rodada 2004					
Amostra X	0,344	0,358	0,368	0,356	0,418
Amostra Y	1,047	0,978	1,049	1,025	0,990

Logo, obteve-se reprodutibilidade satisfatória em todos os casos.

4.6 Exatidão

4.6.1 Teste de Recuperação

Considerando a recuperação já mostrada na Tabela 17, tem-se que a recuperação ao longo da curva apresentou valores entre 93 a 118 %. Como a faixa de recuperação média considerada varia de 60 a 115%, pode-se considerar o resultado com exatidão satisfatória para o método proposto, tendo em vista a baixa concentração do metal sob análise (na ordem de partes por bilhão) e o pequeno desvio associado à recuperação média ideal estipulada e à obtida ($118\% - 115\% = 3\%$).

4.6.2 Utilizando Materiais de Referência Certificados

Partindo de 5 medidas efetuadas com o padrão NIST 1643d, cujos resultados são mostrados na Tabela 28, determinou-se as concentrações mediante substituição na equação da reta $y = 0,006x + 0,018$ (gráfico da Figura 11). A Tabela 29 mostra as concentrações obtidas, bem como sua média e desvio padrão.

Tabela 28 - Resultados das medidas de absorvância efetuadas com o padrão NIST 1643d.

Padrão	Abs				
	1	2	3	4	5
NIST 1643d	0,148	0,124	0,137	0,136	0,140

Tabela 29 - Concentrações das leituras efetuadas com o padrão NIST 1643d, sua média e desvio padrão absoluto.

Padrão	Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$)					Média	Desvio padrão ($\mu\text{g L}^{-1}$)
	1	2	3	4	5		
NIST 1643d	20,096	16,470	18,455	18,300	18,922	18,449	1,311

Sabendo que o valor certificado é de $(18,15 \pm 0,64) \mu\text{g L}^{-1}$, aplicou-se o teste t. Os resultados são mostrados na tabela a seguir. O número de

graus de liberdade é $n-1=4$, sendo n =número de leituras realizadas e o 1 subtraído proveniente da média determinada. Os resultados dos cálculos são mostrados na Tabela 30.

Tabela 30 - Resultados nos caçulos efetuados considerando o valor certificado de $(18,15 \pm 0,64) \mu\text{g L}^{-1}$ para avaliação da exatidão do método proposto.

Conc. Medidas ($\mu\text{g L}^{-1}$)	\bar{x} ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Variância	CV (%)	$t_{\text{calculado}}$	t_{tabelado}	$\bar{x} - \text{esperado}$	Desvio da média (%)
20,10	18,450	1,719	7,106	0,509	2,777	0,299	1,645
16,47							
18,46							
18,30							
18,92							

Como $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$, o resultado é aceitável e o método proposto pode ser considerado exato.

5 CONCLUSÃO

A técnica de absorção atômica com forno de grafite mostrou-se adequada para a quantificação do íon metálico, que aparece em níveis de traço nas amostras analisadas. A validação analítica é de extrema importância diante do emprego de um procedimento e pode ser realizada segundo diversas propostas disponíveis na literatura, cujos resultados tornam-se mais confiáveis quanto maior for o número de análises efetuadas. Diferentes procedimentos com resultados concordantes entre si, também aumentam a confiabilidade nos resultados obtidos para cada parâmetro. Através da validação do método proposto neste trabalho, pode-se afirmar que a metodologia analítica mostrou-se satisfatória em todas as características de desempenho analisadas, principalmente quando se leva em consideração que as concentrações do íon metálico ocorrem na ordem de partes por bilhão. Assim, o procedimento pode ser empregado seguramente para tais determinações.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SONESP - SOCIEDADE DE NEFROLOGIA DO ESTADO DE SÃO PAULO.
Disponível em:
<http://www.sonesp.org.br/FAQ/index.php?action=artikel&cat=1&id=8&artlang=pt-br> . Acesso em: 11 de mai. 2010.
2. DA SILVA, A. M. M.; MARTINS, C. T. B.; FERRABOLI, R.; JORGETTI, V.; JUNIOR, J. E. R. Revisão/Atualização em Diálise: Água para hemodiálise. *Jornal Brasileiro de Nefrologia, São Paulo*, v. 18, n. 2, p. 180-188, 1996.
3. Portaria de 36 de 19.01.90. Ministério da Saúde - D.O.U. Executivo. 16.03.90, p. 1051. Legislação de Água para Consumo Humano.
4. Becker A, Becker A, Guelfi MC, Petiot J, Farinoti R, Lebas M, Pradean D. L'eau pour Hemodialyse - Paris, A.P.H.I. 1982, p. 123-124.
5. BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 154, de 15 de junho de 2004 (Versão publicada - 31.05.2006). Estabelece o "REGULAMENTO TÉCNICO PARA O FUNCIONAMENTO DOS SERVIÇOS DE DIÁLISE".
6. MINISTÉRIO DA SAÚDE - SECRETARIA DE GESTÃO DE INVESTIMENTOS EM SAÚDE. Projeto REFORSUS - Equipamentos médico-hospitalares e o gerenciamento da manutenção. Brasília, 2002.
Disponível em:
www.deb.fee.unicamp.br/por/.../file/Aula%20de%20Diálise%20Renal.pdf. Acesso em: 04 de fev. 2010.
7. ISO 14644-1:1999(E) - Salas limpas e ambientes associados controlados - Parte 1:Classificação de limpeza do ar.
8. WELZ, B.; SPERLING, M. Atomic Absorption Spectrometry. 3rd ed., Completely Revised Edition, Wiley - VCH; Weinheim, 1999.
9. WELZ, B.; SCHELEMMER, G.; MUDAKAVI, J. R. J. Anal. At. Spectrom., 1257, 1992.
10. SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J; CROUCH, S. R. Fundamentos de química analítica. 8. ed. São Paulo: Thomson, 2006. 999 p.

11. HARRIS, D. C. (2003). Análise química quantitativa. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. 876 p.
12. Tópicos em Validação de Métodos, Dr. Oscar Bahia Filho. 2003.
13. NBR ISO/IEC 17025:2001, "Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração", ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. Rio de Janeiro, jan 2001.
14. THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for singlelaboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). Pure and Applied Chemistry, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.
15. RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H. ; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Química Nova, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
16. NASCIMENTO, T. A. D.; E SILVA, R. C. O.; DE ALMEIDA, J. A.; BEZ, L. G. Laparoscopia no implante do caráter de diálise peritoneal ambulatoria (CAPD). Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões, Belo Horizonte, v. 26, n. 3, p. 157-160, 1999.
17. YU, L.; GALVÃO, P. C. A.; BURDMANN, E. A. Revisão/Atualização em Insuficiência Renal Aguda: Terapia contínua de substituição renal em insuficiência renal aguda definições nomenclatura e indicações. Jornal Brasileiro de Nefrologia, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 51-55, 1996.
18. FREEMAN, R. M.; HAWTON, R.; CHAMBERLAIN, M. A. Hard water syndrome. The New England Journal of Medicine, v. 276, n. 20, p. 1113-1117, 1987.
19. GANZI, G.; TICE, J. E. Water treatment for home dialysis. Part J. Dial. Transpl., v. 13, n. 223, 1984.
20. EATON, J. W., KALPIN, C. F., SWAFFORD, H. S., KJELLSTRAND, C. M., JACOB, H. S. Chlorinated urban water: a cause of dialysis-induced hemolytic anemia, Science, v. 181, p. 463-464, 1973.
21. CORDY, P. E., GAGNON, R., TAVES, D. R., KAY, M. Bone disease in hemodialysis patients with particular reference to the effect of fluoride. Transactions - American Society for Artificial Internal Organs, v. 20, p. 197-202, 1974.

22. SCRIVNER, R. E., FAVERO, M., CALPIN, J. A., ULCHEK, D. Issues in water treatment. *Dialysis & Transplantation*, v. 16, n. 11, p. 592-594, 1987.
23. SILVA, A. M. M. da; MARTINS, C. T. B.; FER RABOLI, R.; JORGETTI, V.; JUNIOR, J. E. R. Revisão/Atualização em Diálise: Água para hemodiálise. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 180-188, 1996.
24. MISAEL SILVA, A. M. Avaliação da qualidade da água usada na hemodiálise na cidade de São Paulo. 1990. Tese (Mestrado de Medicina) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1990.
25. JOHNSON, W., TAVES, R. Exposure to excessive fluoride during hemodialysis. *Kidney International*, v. 5, p. 451-454, 1974.
26. SIDDIQUI, J. Y.; SIMPSON, S. W. et al. Fluoride and bone disease in patients on regular hemodialysis. *Proceedings of the European Dialysis and Transplant Association*, v. 8, n. 149, 1971.
27. KJELLSTRAND, C. M., EATON, J. W., YAMATA, Y., KOLPIN, C. F., BUSELMEIR, T. J., Hemolysis in dialysed patients caused by chloramines. *Nephron*, v. 13, n. 427, 1974.
28. KNIJNIK, R., GRILLO, M. F., BIERNAT, J. C., KUWER, B. Variações do cobre plasmático após osmose reversa em pacientes em hemodiálise. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v. 4, n. 1, p. 5-8, 1982.
29. LYLE, W. H. Chronic dialysis and copper poisoning. *The New England Journal of Medicine*, v. 276, n. 21, p. 1209-1210, 1967.
30. ZIEMKLEY, H., BERTRAM, H. P., LYSON, A., LOSSE, H. Aluminum, zinc and copper concentration in plasma in chronic renal insufficiency. *Cl Nephrol.*, v. 12, n. 1, p. 18-21, 1979.
31. BECKER, A., BECKER, A., GUELFY, M. C., PETIOT, J., FARINOTI, R., LEBAS, M., PRADEAN, D. L'eau pour hemodialyse – Paris. A.P.H.I., 1982.
32. GALLERY, E. A. M., BLOMFIELD, J. D., DIXON, S. R. Acute zinc toxicity in hemodialysis, *British Medical Journal*, v. 4, p. 331-333, 1972.

33. GUILHERME, D.A. Cinética da esterilização. Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação (SBCC).
34. Ministério da Saúde, gabinete do ministro. PORTARIA N.º 930, DE 27 DE AGOSTO DE 1992.
35. SLAVIN, W. Anal. Chem., 1982, v. 54, 689^a. Copyright 1982 da American Chemical Society.
36. SHIMADZU BRASIL. AAS: Princípios e instrumentação. Disponível em: http://www.shimadzu.com.br/analitica/noticias/seminarios/seminario_de_quimica-cc_e_ctgas/AAS-Fundamentos_e_Instrumentacao.pdf . Acesso em: 10 de fev. 2010.
37. LAJUNEN, L. H. J. Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission; UK: The Royal Society of Chemistry, 1992.
38. LEITE, F. Validação em análise química. 4 ed. São Paulo: Átomo, 2002.
39. FPAM: A33.2; A26; 25.2; A10; A11; A12. EURACHEM, The Fitness of Purpose of Analytical Methods – Eurachem Guide, “The Fitness of Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics”, first internet version, December 1998.
40. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução RE nº 899, de 29/05/2003.
41. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.
42. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução RE nº 899, de 29/05/2003.
43. MASSART, D. L.; VANDEGINSTE, B. G. M.; BUYDENS, L. M. C.; DE JONG, S.; LEWI, P. J. & Smeyers-Verbeke, J. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics – Part A, Elsevier, Amsterdam, 1997.
44. ASSOCIAÇÃO DE LABORATÓRIOS ACREDITADOS PORTUGAL. RELACRE Guia Relacre 13 - 2000. Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química, Portugal.
45. EURACHEM. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 1 ed. 1998.

46. ISO/DIS 11843-1:1997 - Capability of detection - Part 1: Terms and definitions.
47. IUPAC, "Orange Book," H. Freiser and G. H. Nancollas, Ed., Compendium of Analytical Nomenclature, 2nd edition, Blackwell Scientific Publ., Oxford (1987); 1st edition (1978).
48. MEIER, P. C.; ZUND, R. E.; Statistical Methods in Analytical Chemistry. Nova York: John Wiley & Sons, 1993. 321 p. (Chemical Analysis, v. 123).
49. ISO/CD 13812-1&2 - General guidelines for atomic absorption spectrometry - Graphite furnace analysis.
50. HUBER, L. Validation and Qualification in Analytical Laboratories. Interpharm Press. 1999. M
51. ISO 8466-1 - Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics - Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function.
52. CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. Journal of Chromatography B, v. 689, p. 175-180, 1997.
53. CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). Analytica Chimica Acta, v. 391, p. 105-126, 1999.
54. AMARANTE Jr., O. P. de; CALDAS, E. P. A.; BRITO, N. M.; SANTOS, T. C. R. dos; VALE, M. L. B. F. Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. Cad. Pesq., v. 12, p. 116-131, 2001.
55. AOAC Peer Verified methods Program, Manual on policies and procedures, Arlington, VA, Nov 1993 IN: FAQ, METHOD VALIDATION.
56. ISO 3534-1:1993 - Statistics - Vocabulary and Symbols - Part 1: Probability and general statistical terms.
57. INMETRO/ABNT. Guia para a Expressão da Incerteza de Medição, 1998, 2ª Ed. Brasileira do "ISO Guide to the Expression of Uncertainty in Measurements".

58. HIBBERT, D. B.; GOODING, J. J. Data Analysis for Chemistry: An Introductory Guide for Students and Laboratory Scientists. New York: Oxford University Press, 2006. 175 p.
59. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2007.
60. ABNT ISO/IEC Guia 43-1:1999 - Ensaio de Proficiência por Comparações Interlaboratoriais - Parte 1: Desenvolvimento e Operação de Programas de Ensaio de Proficiência.
61. Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia - (VIM); Portaria Inmetro 029 de 1995. 4ª edição (REVISADA) 2007.
62. KUEHNER, E. C.; ALVAREZ, R.; PAULSEN, P. J.; MURPHY, T. J. Production and analysis of special high-purity acids purified by subboiling distillation. Analytical Chemistry, Washington, v. 44, n. 12, p. 2050-2056, 1972.