

Avaliação da confiabilidade analítica das determinações de carbono orgânico total (COT)

*J. C. L. Fonseca, M. R. A. Silva, I. R. Bautitz, R. F. P. Nogueira, M. R. R. Marchi**

Instituto de Química – UNESP – Araraquara – SP

**mssqam@iq.unesp.br*

Resumo: Observando a literatura pode ser verificado um crescente número de trabalhos que determinam potenciais contaminantes presentes em matrizes de interesse ambiental. É importante ressaltar que quando se estuda o ambiente, os dados analíticos são uma das ferramentas usadas para se avaliar a extensão dos problemas observados que conseqüentemente influenciam as tomadas de decisão. Assim a confiabilidade desses dados é de extrema importância. Neste contexto, este trabalho visa avaliar a confiabilidade analítica das determinações de Carbono Orgânico Total (COT), ferramenta empregada no monitoramento da matéria orgânica em diversos estudos ambientais. Para essa avaliação foram analisados alguns parâmetros de desempenho como limite de detecção e quantificação, repetibilidade e linearidade.

Palavras-chave: validação; COT; linearidade; repetibilidade.

Introdução

Os problemas causados pela crescente contaminação ambiental vêm despertando o interesse de pesquisadores, das autoridades e da população em geral, uma vez que seus efeitos estão cada vez mais presentes no cotidiano. Os prejuízos causados ao ambiente e aos seres vivos justificam esse interesse e impulsionam a rigidez dos órgãos controladores tanto no exterior quanto no Brasil, como Agência Norteamericana de Proteção Ambiental (Environmental Protection Agency - EPA), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Companhia de Tecnologia de Saneamento Básico (CETESB), entre outros. No Brasil este controle teve início com a necessidade de regulamentações para fins de registro ou intercâmbio internacional de produtos, por exemplo, para a exportação de produtos agrícolas. Dentre estas iniciativas, a do Instituto Brasileiro do Meio

Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) destaca-se ao exigir que os laboratórios destinados à verificação de impacto ambiental devam adequar-se aos critérios estabelecidos pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), os quais são baseados em procedimentos de reconhecimento internacional [1].

Um desses procedimentos é conhecido na literatura como Controle Estatístico da Qualidade, o qual sofreu modificações com o passar do tempo. Com base nestas modificações, Garvin [2] apresenta quatro conceitos que se baseiam: no produto, no cliente, na fabricação e no valor (preço). Porém estes não garantem que o procedimento utilizado seja o mais adequado aos objetivos do ensaio e, muito menos, que o laboratório disponha da competência técnica necessária para que o resultado obtido esteja isento de erros ou que estes possam ser detectados e

corrigidos. Então foi necessário acrescentar aos conceitos de Garvin a confiabilidade do resultado analítico. Diferente dos outros conceitos, esse não está baseado na relação mercadológica e seu fundamento não é competitivo nem sua implementação é opcional. Não se pode mensurar a qualidade do resultado analítico, ou ele é confiável e tem qualidade ou não.

Assim para monitorar o ambiente e garantir a confiabilidade analítica dos resultados obtidos é preciso que as técnicas empregadas sejam validadas. Algumas das análises, normalmente, utilizadas com este propósito são Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), Demanda Química de Oxigênio (DQO), óleos e graxas, fenóis, sólidos sedimentáveis, etc. Uma técnica, frequentemente, utilizada para monitorar matéria orgânica é a determinação de carbono orgânico total (COT), também empregada para avaliar a eficiência de métodos de degradação de compostos orgânicos tóxicos [3, 4], bem como de tratamento de efluentes industriais [5, 6] Dados analíticos provenientes de métodos confiáveis são requisitos em todos os órgãos nacionais e internacionais de regulamentação [7]. Para garantir a qualidade dos dados e do método, algumas verificações necessitam ser feitas, as quais compreendem a validação. De acordo com a AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA “A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados”. Os parâmetros usualmente avaliados durante a validação são: seletividade e especificidade, faixa de medição, calibração e rastreabilidade, tendência (ou recuperação), linearidade, limite de detecção e quantificação, robustez e precisão [8]. Deve-se ter em mente que a validação se aplica a um protocolo definido para a determinação de um analito específico e de uma faixa de concentração em uma dada matriz.

Em geral, a validação é classificada em dois tipos completa e intralaboratorial. A validação completa (“full validation”) abrange todos os parâmetros de desempenho e um estudo de colaboração entre laboratórios (reprodutibilidade) [9]. Já a validação no laboratório também conhecida por validação intralaboratorial (“in house validation”) compreende a avaliação de uma metodologia nova ou a verificação da boa aplicação

de um método. Essa validação é feita em um único laboratório e pode preceder a validação completa.

Neste trabalho foi aplicada a validação intralaboratorial pela verificação de alguns parâmetros de desempenho como limite de detecção e de quantificação, linearidade e repetibilidade, com o objetivo de avaliar a confiabilidade analítica dos dados obtidos nas determinações de COT.

Material e métodos

As soluções foram preparadas em balões de 25 mL, utilizando água ultrapura (Milli-Q) e reagentes analíticos Shimadzu. Para o preparo dos padrões de Carbono Total (CT) foi utilizado ftalato ácido de potássio sem tratamento prévio. Os padrões de Carbono Inorgânico (CI) foram obtidos pela mistura de hidrogeno carbonato de sódio (44,25%) e carbonato de sódio (55,75%). Este último foi seco por 1h à temperatura de 285° C.

As determinações de carbono orgânico total foram feitas em um Analisador de Carbono TOC 5000A – Shimadzu com catalisador de sensibilidade normal. Este equipamento mede a quantidade de CT e CI da amostra. O COT é dado pela subtração de CT e CI. Para a determinação de carbono total, a amostra injetada é carregada para um tubo de combustão a 680°C contendo platina suportada em alumina e sofre oxidação catalítica a CO₂. Para a determinação de carbono inorgânico a amostra injetada reage com o ácido fosfórico 25%, sendo que todo carbono inorgânico é convertido a CO₂. O CO₂ produzido, tanto na oxidação catalítica como proveniente de carbono inorgânico, é quantificado por absorção no infravermelho não dispersivo. A concentração de CT e CI é obtida por interpolação utilizando curvas analíticas (área do pico x concentração) feitas previamente por injeção de padrões.

Análise dos parâmetros de desempenho

A linearidade foi avaliada pela capacidade do sistema em obter resultados proporcionais à concentração dos padrões de CT e CI em uma determinada faixa de aplicação. As curvas analíticas foram feitas com soluções padrão de CT e CI em concentrações na faixa de 1 a 25 e 25 a 200 mg L⁻¹ e o fator de resposta (Fr), que

corresponde à relação entre o sinal (área) e a concentração (massa) do analito, foi determinado. Se a variação do fator de resposta é menor ou igual que 2%, pode-se considerar a relação linear, caso contrário deve-se utilizar a regressão linear ou assumir um risco calculado de até 5% [10].

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do analito que pode ser detectada, utilizando um determinado procedimento experimental. Já o limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração do analito que pode ser medida. Os limites de detecção e quantificação foram determinados matematicamente pela relação entre o desvio padrão da curva de calibração (s) e sua inclinação (S) através das equações 1 e 2 [9]:

$$LD = 3,3 \times (s/S) \quad (1)$$

$$LQ = 10 \times (s/S) \quad (2)$$

A avaliação da repetibilidade foi feita injetando uma solução de 10 mg L^{-1} , em dias diferentes e por analistas diferentes e foi expressa por meio da estimativa do coeficiente de variação (CV).

Resultados e discussão

Carbono Total (CT)

A avaliação dos parâmetros de desempenho foi realizada pela análise da exatidão da determinação de CT em soluções padrão de 10 mg L^{-1} preparadas a partir da diluição direta de uma solução mãe de 1000 mg L^{-1} quando se verificou grande dispersão entre os valores determinados (Figura 1A). Uma maneira de mensurar esta dispersão é a amplitude, dada pela diferença entre o maior e o menor valor [11]. O conjunto de dados (Figura 1A) apresentou uma amplitude de 8,2 pois os valores oscilaram entre 9,45 a 17,6. Essa grande amplitude pode ser atribuída a erros sistemáticos que estão relacionados a erros instrumentais, de operação, de pessoal e de métodos. A minimização desses erros foi alcançada com medidas simples como: a manutenção do coeficiente de variação entre as medidas em até 2%, o mesmo analista e o uso de balões volumétricos recentemente aferidos. Adotando essas medidas simples foi possível diminuir a amplitude de 8,15 para 0,95 (Figuras 1A e B).

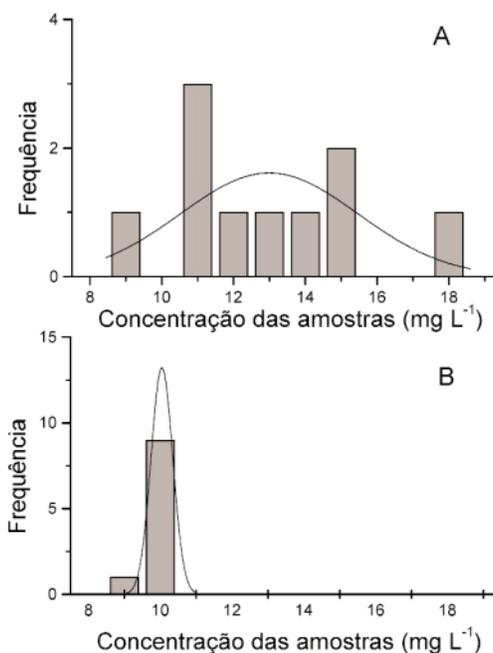


Figura 1. Distribuição normal das concentrações obtidas: (A) inicialmente; (B) após medidas adotadas.

Com o intuito de avaliar se as medidas adotadas para a minimização do erro sistemático foram eficientes, alguns parâmetros de desempenho foram estudados. Dentre eles a repetibilidade, definida por Cienfuegos [11] como sendo a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições. Um fator que pode influenciar a repetibilidade é o preparo da amostra. Estas soluções de 10 mg L^{-1} foram preparadas a partir de uma solução mãe e este fator de diluição pode exercer influência sobre os resultados. Foram feitos dois conjuntos de medidas um partindo de diluição direta de uma solução mãe de 1000 mg L^{-1} e outra partindo de diluições sucessivas ($1000 \rightarrow 100 \rightarrow 10 \text{ mg L}^{-1}$).

Normalmente é recomendado que as soluções sejam preparadas a partir de diluição direta para não haver a propagação de erros. Porém se a concentração da solução em questão for muito baixa, deve-se utilizar diluições sucessivas [9]. Neste caso as duas diluições foram testadas e tanto a diluição direta como a sucessiva apresentaram

resultados com coeficiente de variação menor que 2% no nível de 95% confiança (Tabela 1).

Foi também estudada a repetibilidade em dias e analistas diferentes, os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 2. Como pode ser constatado, os parâmetros avaliados como analista e o dia, não apresentaram influência no resultado, já que o coeficiente de variação foi inferior a 2%.

Uma das ferramentas utilizadas para comparação entre conjuntos de dados é a distribuição normal ou distribuição gaussiana. Geralmente, são aceitos valores que apresentem uma dispersão de até $\pm 2\sigma$ (95,4% das observações)

[11]. Este critério foi aqui aplicado em todos os conjuntos de dados avaliados e 100% das observações estavam dentro do intervalo assumido.

Os limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD) calculados por meio dos dados da curva analítica empregando as equações (1) e (2) são 0,35 e 0,12 mg L⁻¹, respectivamente.

A linearidade corresponde à região da curva de resposta onde existe uma relação direta entre o sinal e a concentração do analito [11]. Na Tabela 3 podemos verificar que existe linearidade na faixa estudada, pois a variação dos fatores de resposta está dentro do limite aceitável (5%).

Tabela 1. Avaliação dos erros e desvios das determinações de CT relacionados ao preparo das soluções padrão

Preparo da solução 10 mg L ⁻¹	Concentração determinada (mg L ⁻¹)*	Erro Absoluto	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)
Direta	9,8	0,2	0,05	0,5
Sucessiva	10,0	0,0	0,06	0,6

* média de 10 replicatas

Tabela 2. Avaliação dos erros e desvios das determinações de CT relacionados ao preparo das soluções padrão

Analista	A		B
Dia	1	2	3
Média*	10,1	10,1	10,7
Desvio Padrão	0,24	0,16	0,25
Coeficiente de Variação (%)	2	2	2

* média de 10 replicatas

Carbono Inorgânico (CI)

As medidas adotadas para minimização do erro para determinações de CT foram mantidas para as determinações de CI. A repetibilidade foi avaliada com injeções sucessivas de padrões preparados sob as mesmas condições descritas no preparo de CT. Assim como apresentado anteriormente para CT, as diluições direta e sucessiva, foram testadas e apresentaram resultados com coeficiente de variação menor que 2% e limite de confiança de 95%, como mostrado na Tabela 4.

Os limites de quantificação e de detecção foram calculados também para CI. Os cálculos

foram feitos conforme descrito por Ribani [9] e também estão apresentados na Tabela 3.

Conclusões

Os dados obtidos no presente trabalho indicam a necessidade de utilização de balões com volume aferido para o preparo de soluções padrão. Também pode-se averiguar que na obtenção de soluções padrão as diluições sucessivas ou a partir de uma só solução padrão estoque, apresentam as mesmas precisão e exatidão. Quanto à resposta do

Tabela 3. LD, LQ e linearidade calculados para CT e CI

	CT	CI
Limite detecção	0,12 mg L ⁻¹	0,44 mg L ⁻¹
Limite quantificação	0,35 mg L ⁻¹	1,33 mg L ⁻¹
Linearidade 1-25 mg L ⁻¹	Fr(A/m) = 5,5x10 ⁷	Fr(A/m) = 5,7x10 ⁷
	s = 2,4x10 ⁶	s = 2,8x10 ⁶
	CV = 4 %	CV = 5 %
Linearidade 25-200 mg L ⁻¹	Fr(A/m) = 1,2x10 ⁷	Fr(A/m) = 1,1x10 ⁷
	s = 4,6x10 ⁵	s = 2,0x10 ⁵
	CV = 3 %	CV = 2 %

Tabela 4. Efeito da diluição, exatidão e repetibilidade na determinação de CI

Solução padrão mãe (mg L ⁻¹)	Média*	Erro Absoluto	Desvio Padrão	Coefficiente de variação(%)
100,0	9,7	0,3	0,1	1,0
1000	10,1	0,1	0,1	1,0

* média de 10 replicatas

sistema analítico, apresenta duas faixas lineares no intervalo de 1 a 200 mg. L⁻¹. Estes resultados apontam para a necessidade da construção e utilização de duas curvas analíticas neste intervalo,

para maior confiabilidade nos resultados obtidos.

Recebido em: 17/05/06

Aceito em: 14/08/06

Abstract: Observing the literature an increasing number of works can be verified that determine potential contaminants that can be present in matrices of environmental interest. It is important to stand out that when studying the environment, the analytical data are one of the tools used to evaluate the extension of the observed problems that consequently influence a decision. Thus the reliability of these data is of extreme importance. In this context, this work aims to evaluate the analytical reliability of the Total organic Carbon (TOC) determination, a tool used in the monitoring of organic substances in diverse ambient studies. For this evaluation some parameters of performance had been analyzed as limit of detection and quantification, repeatability and linearity.

Keywords: validation; TOC; linearity; repeatability.

Referências

- [1] F. J. Rosenberg, A. B. M. Silva, Sistemas de qualidade em laboratório de ensaios: Guia prático para interpretação e implementação da ABNT ISO/IEC guia 25, Qualitymark, Rio de Janeiro, 1999.
- [2] D. A. Garvin, Maneaging Quality: The estrategics and competitive edge, The Free Press, USA, 1988.
- [3] R. F. P. Nogueira, M. R. A. Silva, A. G. Trovó, Sol. Energy 79 (2005) 384.
- [4] R. Aplin, A. J. Feitz, T. D. Waite, Wat. Sci. Technol. 44 (2001) 23.
- [5] M. R. A. Silva, M. C. Oliveira, R. F. P. Nogueira Eclét. Quím. 29 (2) (2004) 19.
- [6] C. Pulgarin, M. Invernizzi, S. Parra, R. Polania, P. Peringer, Catal. Today, 54 (1999) 341.
- [7] M. Thompson, S. L. R. Ellison, R. Wood, Pure Appl. Chem. 74(5) (2002) 835.
- [8] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para qualidade em Química Analítica: Uma assistência a Acreditação, Núcleo de assessoramento em comunicação social e institucional, Brasília, 2004.
- [9] M. Ribani, C. B. G. Bottoli, C. H. Collins, I. C. S. F. Jardim, L. F. C. Melo, Quím. Nova, 27(2) (2004) 771.
- [10] F. Leite, Validação em análise química, Átomo, Campinas, 4^o ed., 2002.
- [11] F. Cinfuegos, Estatística aplicada ao laboratório, Interciência, Rio de Janeiro, 2005.