



VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO: DETERMINAÇÃO DE CÁLCIO EM ÁGUAS – MÉTODO TITULOMÉTRICO DO EDTA – COMPLEXOMETRIA

Diego Manica¹, Erlise Loraine Dullius²

CORSAN, Porto Alegre, Brasil, diego.manica@corsan.com.br
CORSAN, Porto Alegre, Brasil, erlise.dullius@corsan.com.br

RESUMO: A NBR ISO/IEC 17025[1] exige que qualquer alteração em métodos normalizados seja validada. Logo, validar um método normalizado garante confiabilidade analítica. Este trabalho apresenta os testes realizados a fim de validar as alterações realizadas no método titulométrico para o ensaio de Cálcio em Águas.

Palavras Chave: Validação de Método Analítico, Determinação de Cálcio em Águas

1. INTRODUÇÃO:

A preocupação com a qualidade dos ensaios/resultados apresentados pelos laboratórios analíticos é eminente, devido às exigências de mercado e/ou para garantir confiabilidade nos resultados. Este contexto promove aumento de instituições que almejam serem “reconhecidas” através da implantação de normas internacionais de qualidade, como a NBR ISO/IEC 17025. A Figura 1 mostra a evolução de laboratórios gaúchos reconhecidos junto a Rede Metrológica do Rio Grande do Sul.



Figura 1: Evolução do Número de Laboratórios Reconhecidos junto a Rede Metrológica do Rio Grande do Sul (RMRS)[2].

Um dos procedimentos que promove a garantia da qualidade dos serviços prestados por laboratórios analíticos é a validação de métodos, ou seja, “a confirmação por exames e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos” (NBR ISO/IEC 17025, 2005[1]).

Recentemente o órgão acreditador brasileiro (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – INMETRO) sugere aos laboratórios acreditados na norma NBR ISO/IEC17025 a necessidade de validar métodos analíticos reconhecidos internacionalmente, por exemplo: métodos publicados pela US Environmental

Protection Agency (EPA) e bibliografias como o Standard Methods, visto que se evidencia pequenas alterações de metodologia ou para confirmar o comportamento de um processo. Assim, “com o objetivo de confirmar que os métodos são apropriados para o uso pretendido, o laboratório deve validar (...) métodos normalizados usados fora dos seus escopos para os quais foram concebidas, ampliações e modificações de métodos normalizados” (NBR ISO/IEC 17025, 2005[1]).

Segundo a sugestão do INMETRO, o Departamento de Ensaios e Apoio Laboratorial (DEAL) da Companhia Riograndense de Saneamento (CORSAN) iniciou a validação dos métodos analíticos do seu escopo de acreditação. A primeira metodologia validada pelo laboratório foi o procedimento interno denominado “FQ 009 – Determinação de Cálcio – Método Titulométrico do EDTA – Complexometria” baseado no método número 3500 Ca B do livro “Standard Methods: for the examination of water and wastewater, 21th ed.”, publicado em 2005[3].

2. OBJETIVO:

Este trabalho tem por objetivo, por meio do rigor metrológico, a validação da metodologia para a Determinação de Cálcio em Águas (Standard Methods 3500 Ca B), com a seguinte alteração no método original:

- Uso de solução padrão de EDTA 0,0050 mol L⁻¹.

3. MÉTODOS:

Segundo Albano e Raya-Rodriguez[4], e confirmado por INMETRO (2010)[5] os passos necessários para a Validação de Métodos Laboratoriais incluem o estudo dos seguintes parâmetros, requeridos como evidência objetiva deste processo:

- Seletividade;
- Linearidade;
- Sensibilidade (Limites de Detecção e Quantificação);
- Precisão (Repetitividade e Reprodutibilidade);
- Exatidão (Percentual de Recuperação, Z-score Intralaboratorial e Z-score Interlaboratorial);

- Estabilidade (Cartas de Controle para: Valores Individuais, Amplitude Móvel, Médias e Desvio Padrão;
- Robustez;
- Incerteza de Medição.

Cada avaliação prevê diversos testes, através de titulações de padrões e/ou amostras reais fortificadas com padrões com valores conhecidos.

3.1 Seletividade: A seletividade de um método analítico é a capacidade do mesmo ser indiferente à presença de interferentes na amostra que possam vir a mascarar a determinação do analito em estudo.

Uma das maneiras de avaliar a seletividade é através de adição-padrão. Este método é utilizado quando não é possível obter a matriz isenta da substância de interesse. Neste caso é feita uma curva analítica com adição da substância de interesse na matriz e comparada com uma curva analítica sem a presença da matriz.

A seletividade foi avaliada segundo Albano e Raya-Rodriguez[4] para as três matrizes de trabalho do laboratório (água bruta, água tratada e água subterrânea – poço) no intervalo de 1 a 80 mg Ca²⁺ L⁻¹. O ensaio foi conduzido para toda a faixa¹ sendo analisadas 05 (cinco) alíquotas de 50 mL do padrão, para cada concentração da faixa a ser utilizada.

3.2 Linearidade: A linearidade do procedimento analítico é a capacidade de produzir resultados que sejam diretamente proporcionais a concentração do analisado na amostra, em uma faixa de concentração. A faixa linear é definida como a faixa de concentrações na qual a sensibilidade pode ser considerada constante e é, normalmente, expressa nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico.

A linearidade foi avaliada segundo Albano e Raya-Rodriguez[4] no intervalo de 1 a 100 mg Ca²⁺ L⁻¹.

3.3 Sensibilidade: A Sensibilidade de um método pode ser avaliada através das seguintes ferramentas: Cálculo do Limite de Detecção do Método (LDM) e Cálculo do Limite de Quantificação do Método (LQM).

O Limite de Detecção do Método (LDM) é a concentração do constituinte que, quando submetida a uma determinada metodologia, produz uma resposta que com 99% de probabilidade dista do branco, ou seja, representa a mais baixa concentração do analito em ensaio que pode ser detectada com uma dada confiabilidade. Enquanto, o Limite de Quantificação do Método (LQM) é a concentração de constituinte que produz uma resposta com o mínimo de precisão e exatidão para a reprodução de uma metodologia.

¹ A faixa de concentração apresentada foi escolhida, pois é a que melhor representa a realidade de amostras analisadas em nosso laboratório.

Os cálculos do LDM e LQM foram realizados conforme metodologia interna do laboratório através do ensaio de uma solução padrão de 0,10 mg Ca²⁺ L⁻¹. Os resultados devem ser tabulados e se realiza os cálculos da média (\bar{x}) e do desvio padrão (s). Os dados de média e desvio padrão são utilizados nas fórmulas (1) e (2).

$$\text{LDM} = \bar{x} + (3,14 * s) \quad (1)$$

$$\text{LQM} = \bar{x} + (10 * s) \quad (2)$$

3.4 Precisão: A precisão expressa o grau de dispersão entre as medições independentes a partir de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões sobre condições definidas. A precisão contempla dois níveis: a Repetitividade e a Reprodutibilidade.

A Repetitividade é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando efetuada sob as mesmas condições de medição, ou seja, mesmo procedimento, mesmo observador (técnico), mesmo instrumento (equipamento), mesmo local e repetições em curto período de tempo. Enquanto que a Reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados de medições de um mesmo mensurando efetuada sob condições variadas, que podem incluir condições alteradas de analista, equipamento, local, tempo (dia da análise), marca dos padrões.

A repetitividade e a reprodutibilidade foram avaliadas, segundo Albano e Raya-Rodriguez[4], (Repetitividade – Decisão 657; Reprodutibilidade Intralaboratorial – Diretiva 657) através de fortificações de 1,0; 2,0 e 3,0 mg Ca²⁺ L⁻¹ nas três matrizes de trabalho do laboratório. As variações das características ocorridas no teste de reprodutibilidade foram: variação de analista e variação de equipamento (titulador automático).

3.5 Exatidão: É o grau de concordância entre o resultado de uma medição e um valor verdadeiro do mensurando.

A exatidão pode ser avaliada pelos seguintes testes: Percentual de Recuperação, Z-score Interlaboratorial e Z-score Intralaboratorial.

O Percentual de recuperação foi avaliado através do preparo de soluções padrão de cálcio, material de referência (MR), em um total de 03 (três) soluções, com concentrações crescentes do MR, no intervalo de 1 a 100 mg Ca²⁺ L⁻¹. Foi analisado um total de 03 (três) alíquotas de 50 mL do padrão, para cada concentração.

Avaliação do Z-score Interlaboratorial: Caso ocorra alguma oportunidade de participação em um Programa de Proficiência de Ensaio durante a execução dos testes de validação a avaliação de desempenho do Z-score poderá ser incluída.

A Avaliação do Z-score Intralaboratorial foi realizada segundo Albano e Raya-Rodriguez[4], considerando que

não existe valor de referência conhecido. Três analistas analisaram 06 (seis) alíquotas de 50 mL de uma solução intermediária com aproximadamente $10 \text{ mg Ca}^{2+} \text{ L}^{-1}$.

3.6 Estabilidade: É o quanto um determinado analito varia ao longo de um determinado período de tempo. É possível também avaliar a estabilidade de equipamentos de medição.

A estabilidade poderá ser avaliada através dos seguintes tipos de Carta de Controle: Carta de Controle para Valores Individuais, Carta de Controle para Amplitude Móvel, Carta de Controle para Médias, Carta de Controle para Desvio Padrão.

Os quatro modelos de Carta de Controle foram construídas segundo Albano e Raya-Rodriguez[4] para soluções padrão de cálcio com concentrações de 5,0 e 50,0 $\text{mg Ca}^{2+} \text{ L}^{-1}$.

3.7 Robustez: Robustez é a susceptibilidade de um método analítico em responder a pequenas alterações das condições experimentais as quais podem ser: condições de armazenamento, ambientais, preparo de amostra ou outra pequena alteração.

A robustez será avaliada segundo Albano e Raya-Rodriguez[4] na qual se sugere duas alterações em dois níveis. Neste caso, ocorreu a variação da marca e/ou lote do padrão e a variação do instrumento para a medida da amostra (pipeta volumétrica e proveta, ambas calibradas e de 50 mL).

3.8 Incerteza de Medição: O cálculo para estimativa da incerteza de medição foi realizado segundo procedimento interno do laboratório seguindo critérios dispostos no Standard Methods[3], INMETRO (2003)[6] e no Guia Eurachem[7].

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

4.1 Seletividade: Na seletividade deve-se avaliar se o $F_{\text{cal}} < F_{\text{tab}}$ e se as curvas de calibração possuem R^2 (Coeficiente de Determinação) maior que 0,99. Na Tabela 1 são apresentados os resultados para os diferentes tipos de matrizes em estudo, sabendo que o F_{tab} para 05 (cinco) vias na construção da curva de calibração é igual a 6,388[4]:

Tabela 1: Resultados obtidos para o teste de Seletividade.

Matriz	F calculado	R^2
Água Deionizada	-	0,9999
Água Bruta	1,1740	0,9999
Água Tratada	1,4614	0,9980
Água Subterrânea – Poço	1,2019	0,9999

Assim, estes resultados demonstram que o método é seletivo.

4.2 Linearidade: Na linearidade deve-se avaliar se o R^2 (Coeficiente de Determinação) é maior que 0,99 e se gráfico de “Perfil dos Resíduos” possui uma ordem aleatória na distribuição dos resíduos de regressão. As Figuras 2 e 3, respectivamente, apresentam a curva de calibração e o gráfico dos resíduos de regressão:

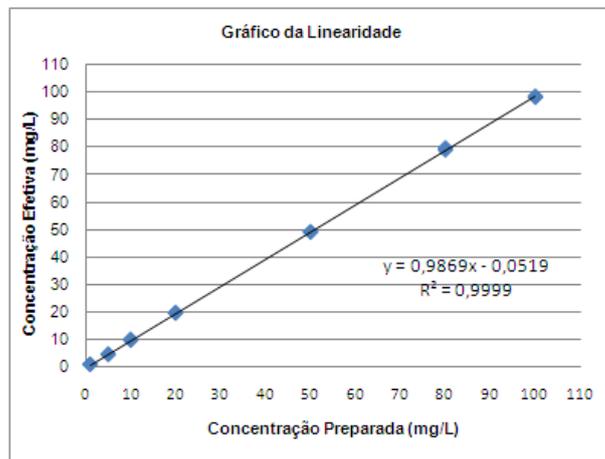


Figura 2: Gráfico da Linearidade (Curva de Calibração), que demonstra um $R^2 = 0,9999$.

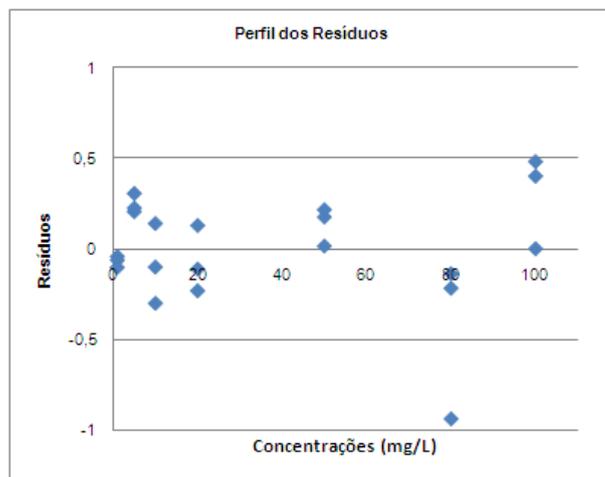


Figura 3: Gráfico do Perfil dos Resíduos de Regressão.

Assim, estes resultados demonstram que o método é linear para a faixa de trabalho estudada.

4.3 Sensibilidade: Com a utilização da solução padrão de $0,10 \text{ mg Ca}^{2+} \text{ L}^{-1}$ obteve-se os seguintes valores para LDM e LQM:

- LDM = $0,14 \text{ mg Ca}^{2+} \text{ L}^{-1}$ e
- LQM = $0,21 \text{ mg Ca}^{2+} \text{ L}^{-1}$.

4.4 Precisão: Na precisão se avaliou os testes de repetitividade e de reprodutibilidade.

O critério de aceitação para a repetitividade é $CV < CV_H$, onde CV é o Coeficiente de Variação e CV_H é o Coeficiente de Variação de Horwitz. A Tabela 2 apresenta

os resultados obtidos para CV e CV_H nas três matrizes estudadas:

Tabela 2: Resultados obtidos para o teste de Repetitividade.

Matriz	Faixa de Concentração (mg Ca ²⁺ L ⁻¹)	CV (%)	CV _H (%)
Água Bruta	6,862	0,69	4,23
	7,993	0,58	4,14
	8,807	0,65	4,08
Água Tratada	23,184	0,11	3,52
	23,984	0,39	3,51
	24,709	0,13	3,49
Água Subterrânea – Poço	26,009	0,06	3,46
	26,804	0,10	3,45
	28,004	0,27	3,43

Assim, estes resultados demonstram que a repetitividade do método é satisfatória.

O critério de aceitação do estudo de reprodutibilidade é a obtenção de um CV < que 10 %. A Tabela 3 apresenta os resultados para CV nas três matrizes estudadas:

Tabela 3: Resultados obtidos para o teste de Reprodutibilidade.

Matriz	V.V.C. utilizado na Fortificação (mg Ca ²⁺ L ⁻¹)	Conjunto	CV (%)
Água Bruta	1,00	“An 1” / “Eq A”	1,76
	2,00		2,32
	3,00		1,39
	1,00	“An 1” / “Eq B”	1,00
	2,00		1,34
	3,00		1,37
	1,00	“An 2” / “Eq A”	1,20
	2,00		1,53
	3,00		0,70
	1,00	“An 2” / “Eq B”	1,09
	2,00		1,27
	3,00		0,58
Água Tratada	1,00	“An 1” / “Eq A”	0,49
	2,00		0,20
	3,00		0,35
	1,00	“An 1” / “Eq B”	0,53
	2,00		0,38
	3,00		0,16
	1,00	“An 2” / “Eq A”	0,60
	2,00		0,44
	3,00		0,50
	1,00	“An 2” / “Eq B”	0,86
	2,00		0,55
	3,00		0,54
Água Subterrânea – Poço	1,00	“An 1” / “Eq A”	0,15
	2,00		0,12
	3,00		0,12
	1,00	“An 1” / “Eq B”	0,18
	2,00		0,08
	3,00		0,17
	1,00	“An 2” / “Eq A”	0,34
	2,00		0,35
	3,00		0,41
	1,00	“An 2” / “Eq B”	0,67
	2,00		0,63
	3,00		0,20

Onde: V.V.C. = Valor Verdadeiro Convencional; An. = Analista; Eq. = Equipamento.

Assim, estes resultados demonstram que a reprodutibilidade do método é satisfatória. E, também, que o método é preciso.

4.5 Exatidão: Na exatidão se avaliou os testes de Percentual de Recuperação, Z-score Interlaboratorial e Z-score Intralaboratorial.

O critério de aceitação para o teste de percentual de recuperação (%R) foi: $90 \leq \%R \leq 107$. A Figura 4 apresenta os resultados obtidos:

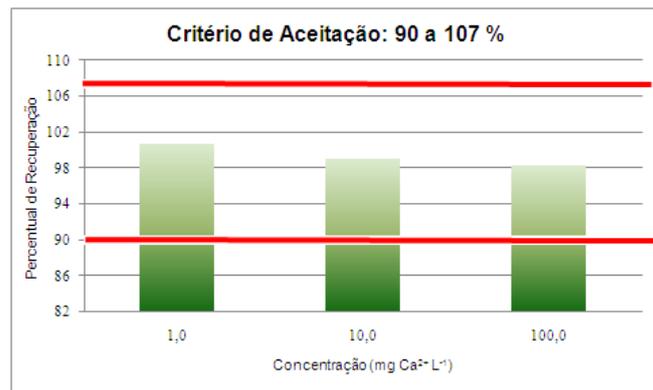


Figura 4: Resultado do teste de Percentual de Recuperação.

Para o teste de Z-score Interlaboratorial se avaliou as participações nas duas rodadas do Programa de Ensaio de Proficiência em Análises Ambientais promovido pela RMRS ao longo do ano de 2010, onde o parâmetro cálcio foi avaliado em Efluentes[8]. A Tabela 4 apresenta os resultados de Z-score obtidos pelo nosso laboratório e também os critérios de avaliação utilizados pelo provedor.

Tabela 4: Resultados obtidos para o teste de Z-score Interlaboratorial.

Rodada	Z-Score
Primeira	0,647
Terceira	-0,146
Critério: $z \leq 2,00 $ – Resultado Satisfatório	
$ 2,00 < z \leq 3,00 $ – Resultado Questionável	
$ 3,00 < z$ – Resultado Insatisfatório	

Para o teste de Z-score Intralaboratorial o critério de aceitação foi o mesmo utilizado pelo provedor de programas de proficiência RMRS, apresentado no teste de Z-score Interlaboratorial. A Figura 5 apresenta os resultados obtidos para o teste de Z-score Intralaboratorial.

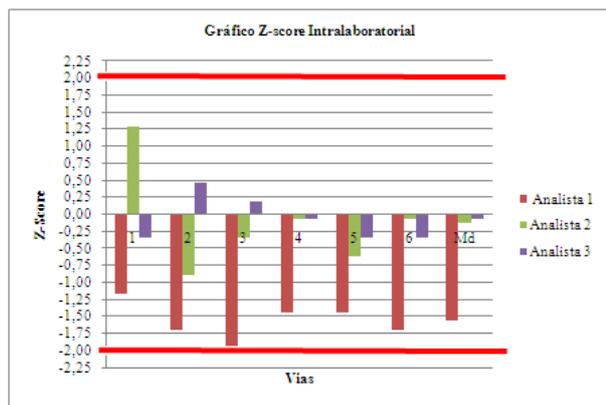


Figura 5: Resultados obtidos para o teste de Z-score Intralaboratorial.

Como os resultados para os testes de percentual de recuperação, z-score Intralaboratorial e Interlaboratorial foram satisfatórios pode-se afirmar que o método é exato.

4.6 Estabilidade: A estabilidade foi avaliada através da visualização das Cartas de Controle do Método aplicadas nas concentrações 5,0 e 50,0 mg Ca²⁺ L⁻¹ em um período aproximado de 4 meses, com um total de 20 medições, divididas entre quatro analistas treinados no ensaio.

O critério de aceitação para os testes de estabilidade foram que nenhuma característica abaixo citada possa ocorrer:

- Pontos fora dos Limites Superiores de Controle (LSC);
- Pontos fora dos Limites Inferiores de Controle (LIC);
- 7 (sete) pontos ascendentes;
- 7 (sete) pontos descendentes;
- 7 (sete) pontos acima ou abaixo da linha central (linha média).

As Figuras 6 a 9 apresentam, respectivamente, as Cartas de Controle para Valores Individuais, para Amplitude Móvel, para Médias e para Desvio Padrão do padrão de 50,0 mg Ca²⁺ L⁻¹.

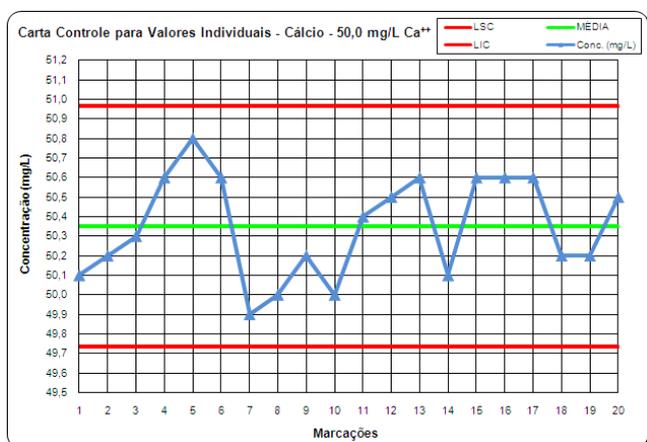


Figura 6: Carta de Controle para Valores Individuais – Padrão 50,0 mg Ca²⁺ L⁻¹.

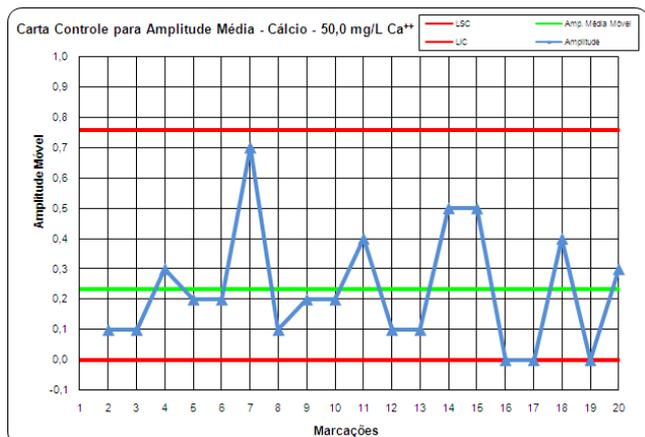


Figura 7: Carta de Controle para Amplitude Média – Padrão 50,0 mg Ca²⁺ L⁻¹.

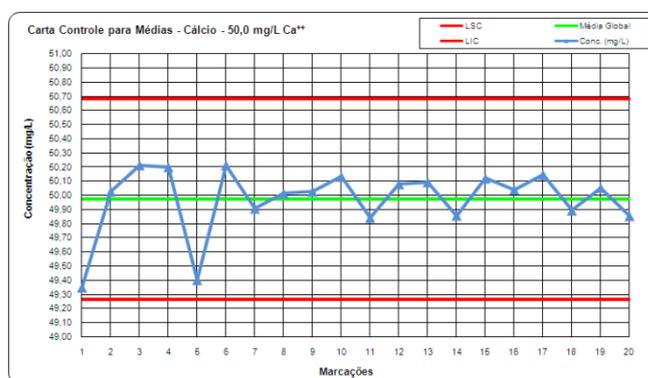


Figura 8: Carta de Controle para Médias – Padrão 50,0 mg Ca²⁺ L⁻¹.

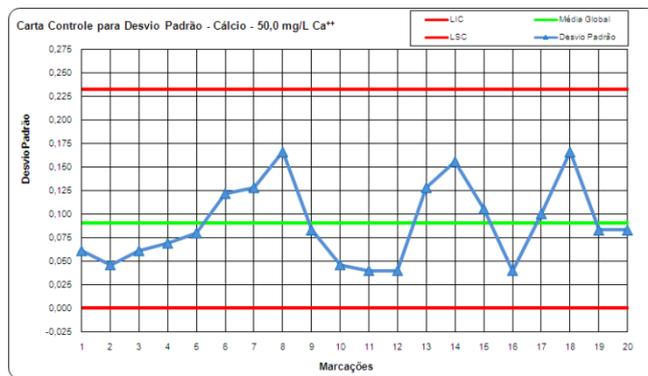


Figura 9: Carta de Controle para Desvio Padrão – Padrão 50,0 mg Ca²⁺ L⁻¹.

Como os quatro modelos de carta de controle apresentados atendem os critérios estabelecidos, pode-se afirmar que o método é estável.

4.7 Robustez: Para se avaliar a Robustez do método se fez necessário comparar o resultado do Desvio da Robustez (Sr) com o Desvio da Reprodutibilidade (σ_m), obtido anteriormente. Assim, o critério de aceitação para o teste de robustez é $Sr < (\sigma_m)$. A Tabela 5 apresenta estes resultados comparativos.

Tabela 5: Resultados obtidos para o teste de Robustez.

Tipo de Desvio	Resultado
Sr	0,1933
$(\bar{\sigma}_m)$ – Água Bruta	0,1120
$(\bar{\sigma}_m)$ – Água Tratada	0,4043
$(\bar{\sigma}_m)$ – Água Subterrânea – Poço	0,1951

Considerando o Desvio da Reprodutibilidade em Água Tratada e Água de Poço como os piores casos, pode-se afirmar que o método é Robusto.

4.8 Incerteza de Medição: Após levantamento das fontes de incerteza para o ensaio titulométrico de cálcio em águas, pode-se estimar os valores da incerteza expandida do ensaio, para um nível de confiança de 95%. A Tabela 6 apresenta os valores de incerteza de medição para diversas concentrações de cálcio em amostras reais.

Tabela 6: Valores obtidos para a Estimativa da Incerteza de Medição do ensaio Titulométrico de Cálcio em Águas.

Concentração (mg Ca ²⁺ L ⁻¹)	Incerteza de Medição
1,00	0,39
5,00	0,78
10,00	1,03
20,00	1,70
50,00	3,96
80,00	6,43
100,00	7,97

5. CONCLUSÕES:

O método encontra-se validado, apresentando precisão e exatidão satisfatórias. Os resultados obtidos para os parâmetros considerados para a validação foram:

- Seletividade: o método se mostrou seletivo para as três matrizes em estudo;
- Linearidade: o método mostra-se linear para toda a faixa estudada, com $R^2 = 0,9999$;
- Sensibilidade: o método apresentou limites de detecção e quantificação iguais a 0,14 e 0,21 mg Ca²⁺ L⁻¹, respectivamente;
- Precisão: o método apresentou repetitividade e reprodutibilidade satisfatórias;
- Exatidão: o método apresentou percentual de recuperação de $98,35 \leq \%R \leq 100,67$; Z-score Interlaboratorial e Intralaboratorial $\leq |2,00|$;
- Estabilidade: os quatro modelos de carta de controle do método não apresentaram tendências nem pontos fora dos limites de controle;
- Robustez: o método apresentou um desvio de robustez (Sr) de 0,1933, o qual é inferior aos desvios de reprodutibilidade $(\bar{\sigma}_m)$ para água de poço e tratada;
- Incerteza de Medição: o método apresenta contribuições próximas a 10% do valor verdadeiro quando está próxima dos limites de quantificação e tem seu impacto reduzido

quando comparada a altas concentrações do analito.

Assim, pode-se concluir que a alteração na metodologia normalizada do livro Standard Methods não gerou resultados inválidos na determinação de cálcio em águas pelo método titulométrico do EDTA.

6. REFERÊNCIAS:

- [1] ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR ISO/IEC 17025: Requisitos Gerais para Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração**. Rio de Janeiro: ABNT, INMETRO, 2005
- [2] REDE DE METROLOGIA E ENSAIOS DO RIO GRANDE DO SUL (RMRS). Arquivo particular.
- [3] A. D. Eaton, et al. (ed.). Método 3500 Ca B. In: _____. *Standard Methods: for the examination of water and wastewater*, 21 th ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2005.
- [4] F. M. Albano, M. T. Raya-Rodriguez, *Validação e Garantia da Qualidade de Ensaio Laboratoriais – Guia Prático*. Porto Alegre, Rede Metrológica RS, 2009.
- [5] INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **DOQ-CGCRE-008: Orientação sobre Validade de Métodos Analíticos. Revisão 03 – FEV/2010**. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf>. Acesso em 13 abr. 2011.
- [6] ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **Guia para a Expressão da Incerteza de Medição (GUM)**. 3. ed. Rio de Janeiro: ABNT, INMETRO, 2003.
- [7] COOPERATION ON INTERNATIONAL TRACEABILITY IN ANALYTICAL CHEMISTRY; EURACHEM. **Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement**. 2 ed., 2000.
- [8] REDE DE METROLOGIA E ENSAIOS DO RIO GRANDE DO SUL (RMRS) – **Relatório de 2010 – Programa de Ensaio de Proficiência em Análises Ambientais**. Porto Alegre, 2010.