

Bruno Miguel Lopes Borges  
Verificação de conformidade  
Validação de um método analítico



Bruno Miguel Lopes Borges

# Verificação de conformidade Validação de um método analítico

Mestrado em Química

Departamento de Química

FCTUC

Julho 2014



2014

• C •

• U •



Bruno Miguel Lopes Borges

# **VERIFICAÇÃO DE CONFORMIDADE**

## **VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO**

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química, Área de especialização em  
Controle de Qualidade e Ambiente

Professor Doutor Jorge Luís Gabriel Ferreira da Silva Costa Pereira

Mestre Ricardo Campante

**Julho 2014**

**Universidade de Coimbra**



Bruno Miguel Lopes Borges

# Verificação de conformidade validação de um método analítico

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química, área  
de especialização em Controlo Químico da Qualidade e Ambiente

Professor Doutor Jorge Costa Pereira

Mestre Ricardo Campante

Julho 2014

Universidade de Coimbra

## Agradecimentos

Ao longo do nosso percurso académico, são muitas as pessoas que nos marcam quer pelos conhecimentos que nos transmitem, quer pelas amizades que construímos ou até mesmo pelas lições de vida adquiridas, e é a estas pessoas que quero agradecer agora no fim do meu percurso académico.

É com enorme prazer que vou agradecer a todas as pessoas que tornaram possível o desenvolvimento e conclusão da minha tese de Mestrado, porque sem elas não teria conseguido desenvolver este projecto que foi fruto da colaboração e empenho de pessoas do Departamento de Química e da empresa Laboratórios Basi.

Em primeiro lugar quero agradecer ao Professor Doutor Jorge L.G.F.S. Costa Pereira pela oportunidade de realizar este trabalho, por todos os conhecimentos e orientação científica, pela sua disponibilidade, pela opinião e revisão crítica.

Em segundo, ao Mestre Ricardo Campante e Verónica Oliveira pela amabilidade com que me receberam na empresa Laboratórios Basi e pela orientação que me deram ao longo deste estágio.

A todos os colegas de trabalho dos Laboratórios Basi gostaria de agradecer o apoio, a ajuda laboratorial, a compreensão, o companheirismo e a boa disposição que demonstraram, proporcionando um bom ambiente de trabalho, um especial obrigado ao Paulo Teixeira e Ângelo Gomes.

Deixo um voto de agradecimento a todos os meus amigos, em especial à Ana Cancela, Ana Raquel Freitas, Cátia Fernandes, Catarina Jesus, Carmo Bota, Damien Gonçalves, Diogo Silva e Rui Apóstolo, pela ajuda e partilha de vivências.

Quero deixar um agradecimento muito especial à Diana Domingues pelo tempo em que estive sempre ao meu lado, porque acreditou sempre em mim, pela força e conselhos que me deu.

E por último, um grande obrigado a toda a minha família, em especial à minha mãe, Maria Celeste, por todos os sacrifícios para me proporcionar esta realização pessoal.

## Objectivos

O tema de partida do projeto laboratorial desenvolvido na empresa Laboratórios Basi, para a realização da tese de Mestrado teve como objectivo, desenvolver e validar um método interno de quantificação de um conservante num novo produto farmacêutico através de titulação complexométrica. O laboratório físico-químico necessitava de desenvolver e validar o método analítico para satisfazer um dos parâmetros de análise deste novo produto farmacêutico.

## Resumo

Neste trabalho pretende-se mostrar a necessidade e importância do Controlo e Qualidade na área da Indústria Farmacêutica para garantir a qualidade dos seus produtos. Este trabalho é desenvolvido nas instalações dos Laboratórios Basi e, indo ao encontro das necessidades do Laboratório, nomeadamente na necessidade de encontrar um método analítico específico, para o fim pretendido, consistiu na validação desse método para satisfazer um dos requisitos de análise para um novo produto farmacêutico.

Um dos parâmetros de análise do novo produto é o doseamento do ácido 1,1',2,2'-(Etano-1,2-dinitrilo)tetraacético ou ácido etilenodiaminatetraacético, doravante EDTA, que tem como função remover possíveis metais pesados do produto que possam interferir com a sua estabilidade.

Deste modo, para a validação do método foram avaliados os seguintes parâmetros: especificidade, gama de trabalho, sensibilidade, limites analíticos, precisão, exactidão e robustez. Obteve-se, em todos os parâmetros submetidos em avaliação, resultados credíveis que evoluíram no sentido da validação do método analítico e posterior implementação.

## Palavras chave

Validação, acreditação, certificação, controlo da qualidade, teste de conformidade, EDTA.

## Abstract

In this work intended to show the need and importance of Quality Control and Pharmaceutical Industry in the area to ensure the quality of their products. This work is developed in installations of Basi labs and meeting the needs of the laboratory, including the need to find a specific analytical method for the intended purpose, consisted in the validation of this method to satisfy one of the requirements analysis for a new pharmaceutical product. One of the parameters of the new product analysis is the determination of 2,2',2,2'-(ethane-1,2-dinitrile) tetraacetic acid, or ethylenediaminetetraacetic acid, from now EDTA, which is designed to remove any heavy metals commodity that may interfere with its stability. Thus, for method validation evaluated the following parameters: specificity, working range, sensitivity analytical limits, precision, accuracy and robustness. Obtained in all rating parameters submitted in credible results evolved towards the validation of the analytical method and subsequent implementation.

## Keywords

Validation, accreditation, certification, quality control, conformity assessment, EDTA:

# Nomenclatura

$[A]$	- concentração analítica da espécie $A$
$\%RE$	- erro relativo percentual; estimativa adimensional do desvio em termos percentuais ( $\%RE = 100\Delta/\mu$ )
$\%RI$	- taxa de recuperação; avaliação da capacidade do método analítico para obter um resultado correspondente ao teor que foi adicionado à amostra (ou branco); ( $\%RI = 100 \times \frac{x_f - x_i}{x - a}$ )
$\alpha$	- nível de significância ou de diferença significativa (traduz a probabilidade de erro tipo I - rejeição abusiva)
$\alpha_0$	- fracção molar da forma ácida não desprotonada
$\alpha_i$	- fracção molar da forma ácida contendo (n-i) protões
$\alpha_n$	- fracção molar da forma ácida totalmente desprotonada
$\bar{x}$	- média aritmética dos valores de $x$ ( $\sum_{i=1}^N x_i$ )
$\bar{x}_C$	- valor da abcissa do centróide da curva de calibração
$\bar{Y}_A$	- valor médio obtido para o sinal instrumental referente à amostra com $M$ réplicas de amostra
$\bar{y}_C$	- valor da ordenada do centróide da curva de calibração
$\beta$	- potência do teste (traduz a probabilidade de erro tipo II - aceitação abusiva)
$\beta_m$	- constante de formação global do complexo $ML_m$
$\Delta SS$	- variação na soma de quadrados ( $\Delta SS = SS_1 - SS_2$ )
$\Delta$	- erro ou desvio; diferença em relação ao valor exacto (ex: no caso de estimativas paramétricas de posição, $\Delta = \bar{x} - \tau$ )
$\Delta\nu$	- variação no número de graus de liberdade ( $\Delta\nu = \nu_1 - \nu_2$ )
$\Delta\sigma^2$	- alteração na varância (diferença incremental ponderada)
$\gamma_A$	- coeficiente de actividade da espécie $A$
$\hat{x}$	- mediana, percentil 50%



$(A)$	- actividade da espécie $A$
$\mu$	- estimativa posicional da distribuição (define o valor mais provável)
$\sigma(X_A)$	- erro padrão do teor da amostra
$\sigma^2$	- variância (diferença quadrática média)
$\sigma_0^2$	- variância interna (contribuição puramente aleatória)
$\sigma_A^2$	- variância externa (contribuição devida ao factor)
$\sigma_0$	- dispersão puramente aleatória
$\sigma_{fit}$	- desvio padrão do ajuste (estimativa do erro aveatório inerente ao ajuste do modelo aos valores experimentais)
$\sigma_{pe}$	- estimativa da dispersão puramente aleatória
$\tau$	- valor exacto (valor real, de referência ou considerado como real)
$\tilde{x}$	- moda, valor experimental mais frequente
$a_3$	- estimador de simetria ( $a_3 = \sum(z_i)^3/N$ )
$a_4$	- estimador de curtose ( $a_4 = \sum(z_i)^4/N$ )
$b_0$	- ordenada na origem (termo constante do modelo)
$b_1$	- declive do modelo P01 (traduz a dependência do sinal com a concentração)
$b_2$	- parâmetro de segunda ordem de P012 (traduz a dependência do sinal com a concentração ao quadrado)
$b_j$	- parâmetros do modelo; $j \in \{0, 1, 2, \dots\}$
$e_i$	- erro do modelo ou erro do ajuste
$f(x_i; b_j)$	- função de resposta instrumental
$H_0$	- hipótese nula (assumida por defeito)
$H_1$	- hipótese alternativa (válida quando se rejeita a hipótese nula, $H_0$ )
$K_a$	- contante de acidez; quociente de actividades que traduzem o equilíbrio de ionização de um determinado ácido $HA$ na respectiva base conjugada $A$ ( $K_a = \frac{(H)(A)}{(HA)}$ )
$K_{f(Pb/M)}$	- constante de formação para a substituição de $MY$ por $PbY$
$K_{fi}$	- constante de formação parcial do complexo $ML_i$ a partir da espécie $ML_{i-1}$
$K_{sp}$	- produto de solubilidade; constante de equilíbrio que expressa a dissolução do soluto
$M$	- número de réplicas de amostra

$N$	- tamanho da amostra (número de pontos da curva de calibração)
$p[H_0]$	- valor de prova; traduz a probabilidade de aceitação da hipótese nula ( $H_0$ )
$p$	- número de parâmetros do modelo
$P_{012}$	- polinómio de segundo grau ( $f(x_i; b_0, b_1, b_2) = b_0 + b_1 \cdot x_i + b_2 \cdot x_i^2$ )
$P_{01}$	- polinómio de primeiro grau ( $f(x_i; b_0, b_1) = b_0 + b_1 \cdot x_i$ )
$pK_a$	- contante de acidez expressa sob a forma logaritmizada ( $pK_a = -\log_{10}(K_a)$ )
$pK_{sp}$	- produto de solubilidade expresso sob a forma logaritmizada ( $pK_{sp} = -\log_{10}(K_{sp})$ )
$RE$	- erro relativo; estimativa adimensional do desvio ( $RE = \Delta/\mu$ )
$Rec$	- Recuperação (do Inglês, Recovery)
$RSU$	- Incerteza padrão relativa (do Inglês, Relative Standard Uncertainty)
$s_I$	- precisão intermédia; estimativa paramétrica da dispersão que não corresponde á repetibilidade ( $s_r$ ) nem à reprodutibilidade ( $s_R$ )
$s_R$	- reprodutibilidade; estimativa paramétrica da dispersão de valores obtida através da comparação de resultados de um estudo interlaboratorial de validação de método analítico
$s_r$	- repetibilidade; estimativa paramétrica da dispersão de valores devida exclusivamente ao erro aleatório experimental
$s_x$	- desvio padrão; estimativa da dispersão da distribuição de $x$ ( $s_x = \sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 / (N - 1)}$ )
$s_{\bar{x}}$	- estimativa da dispersão da média de $x$ ( $s_{\bar{x}} = s_x / \sqrt{N}$ )
$s_{pe}$	- estimativa da dispersão puramente aleatória
$SS$	- soma de quadrados (somatório da diferença quadrática em torno do valor estimado)
$SS_T$	- soma total de quadrados (dispersão total em torno da média global)
$SS_0$	- soma de quadrados interna (estimativa da aleatoriedade interna)
$SS_A$	- soma de quadrados devida ao factor em estudo
$TV$	- valor de teste calculado (do Inglês, Test Value)
$U$	- Incerteza expandida; traduz o intervalo de confiança para a mensuranda considerando as contribuições totais de incertezas
$u$	- Incerteza padrão (erro padrão ou incerteza da estimativa)

$u_c$	- Incerteza padrão combinada; traduz a incerteza resultante de diferentes contribuições
$X_A$	- concentração estimada para o analito
$x_i$	- valores experimentais (variável independente)
$X_\alpha$	- percentil; traduz o valor obtido a uma determinada probabilidade de ocorrência
$X_{LD}$	- limite de detecção; traduz a quantidade mínima de analito que um método analítico, em certas condições, consegue distinguir como sendo superior ao valor obtido com o branco
$X_{LQ}$	- limite de quantificação; traduz a quantidade mínima de analito detectado que o método analítico, em certas condições, consegue quantificar com todo o rigor analítico
$Y$	- representação esquemática simplificada do EDTA
$y_i$	- valores experimentais obtidos (variável dependente)
$Y_{LD}$	- valor do sinal correspondente ao limite de detecção
$Y_{LQ}$	- valor do sinal correspondente ao limite de quantificação
ANOVA	- Análise de Variância (do Inglês, ANalysis Of VAriance)
EDTA	- ácido etilenodiaminatetraacético ( Do Inglês, Ethylenediamine tetraacetic acid)
EP	- Farmacopeia Europeia (do Inglês, European Pharmacopoeia)
GMP	- boas práticas de fabrico (do Inglês, Good Manufacturing Practices)
HPLC	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; (do Inglês High Performance/Pressure Liquide Chromatography)
ICH	- Conferência Internacional sobre Harmonização (do Inglês, International Conference on Harmonisation)
ISO	- Organização Internacional para Padronização, do Inglês International Organization for Standardization
IUPAC	- União Internacional de Química Pura e Aplicada (do Inglês, International Union of Pure and Applied Chemistry)
SI	- Sistema Internacional de Unidades
USP	- Farmacopeia dos Estados Unidos da América (do Inglês, United States Pharmacopeia)
UV-Vis	- Ultravioleta-Vísivel

# Conteúdo

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>3</b>
1.1	A Indústria Farmacêutica . . . . .	4
1.2	Diagnóstico da qualidade . . . . .	5
1.3	Relevância de alguns excipientes . . . . .	8
<b>2</b>	<b>Fundamentação</b>	<b>10</b>
2.1	Equilíbrio químico . . . . .	10
2.1.1	O meio aquoso . . . . .	11
2.1.2	Reacções ácido-base . . . . .	12
2.1.3	Solubilidade . . . . .	15
2.1.4	Formação de complexos . . . . .	16
2.1.5	Composição do sistema . . . . .	19
2.1.5.1	Hexametilnotetramina . . . . .	19
2.1.5.2	Indicador . . . . .	19
2.2	Tratamento de resultados . . . . .	20
2.2.1	Testes estatísticos . . . . .	20
2.2.1.1	Nível de confiança e nível de significância . . . . .	20
2.2.1.2	Procedimento . . . . .	21
2.2.1.3	Testes baseados nas distribuições estatísticas . . . . .	22
2.2.1.4	Outros testes . . . . .	24
2.2.2	Calibração e quantificação . . . . .	26
2.2.2.1	Curva de calibração . . . . .	28
2.3	Validação de métodos . . . . .	30
2.3.1	Definições . . . . .	30
2.3.2	Parâmetros de desempenho . . . . .	34
2.3.2.1	Identificação . . . . .	35
2.3.2.2	Especificidade e selectividade . . . . .	35
2.3.2.3	Sensibilidade . . . . .	35
2.3.2.4	Limiares analíticos . . . . .	35
2.3.2.5	Linearidade e gama analítica . . . . .	37
2.3.2.6	Precisão . . . . .	38
2.3.2.7	Exactidão . . . . .	39
2.3.2.8	Robustez . . . . .	40
2.3.2.9	Coerência . . . . .	40
2.4	Quantificação da incerteza . . . . .	41
2.4.1	Nomenclatura . . . . .	41
2.4.2	Pressupostos . . . . .	41
2.4.3	Estimativa da incerteza . . . . .	42

2.4.3.1	Abordagem Bottom-up . . . . .	42
2.4.3.2	Correcções . . . . .	45
2.4.3.3	Simulação Monte-Carlo . . . . .	46
<b>3</b>	<b>Parte experimental</b>	<b>47</b>
3.1	Condições de trabalho . . . . .	47
3.2	Procedimentos . . . . .	48
3.2.1	Preparação de soluções . . . . .	48
3.2.1.1	Solução Mãe de Nitrato de Chumbo 0.1M . . . . .	48
3.2.1.2	Solução de Nitrato de Chumbo 0.001M . . . . .	48
3.2.1.3	Solução Mãe de EDTA 10,00 mg/mL . . . . .	48
3.2.1.4	Solução de Ácido Clorídrico Diluído R . . . . .	48
3.2.1.5	Solução do Branco . . . . .	48
3.2.1.6	Solução Placebo . . . . .	48
3.2.1.7	Mistura de Alaranjado de Xilenol (Indicador) . . . . .	49
3.2.2	Determinações . . . . .	49
3.2.2.1	Aferição da solução mãe de Nitrato de Chumbo 0.1M . . . . .	49
3.2.2.2	Selectividade do método . . . . .	49
3.2.2.3	Linearidade . . . . .	49
3.2.2.4	Repetibilidade do método . . . . .	50
3.2.2.5	Precisão intermédia . . . . .	50
3.2.2.6	Exactidão . . . . .	50
3.2.2.7	Robustez . . . . .	50
3.2.3	Procedimento Geral . . . . .	51
3.2.3.1	Método proposto pela Farmacopeia Europeia . . . . .	51
3.2.3.2	Estratégia de validação método analítico . . . . .	51
<b>4</b>	<b>Resultados e discussão</b>	<b>53</b>
4.1	Fundamento químico . . . . .	53
4.2	Verificações . . . . .	56
4.2.1	Exactidão da bureta . . . . .	56
4.2.2	Titulações em meio simples . . . . .	59
4.2.3	Titulações na presença da matriz . . . . .	61
4.3	Validação . . . . .	64
4.3.1	Identificação . . . . .	64
4.3.2	Selectividade . . . . .	65
4.3.3	Sensibilidade . . . . .	66
4.3.4	Limiares analíticos . . . . .	68
4.3.5	Linearidade e gama analítica . . . . .	68
4.3.6	Precisão . . . . .	69
4.3.7	Exactidão . . . . .	70
4.3.8	Robustez . . . . .	71
4.3.9	Coerência . . . . .	71
4.4	Incerteza global . . . . .	72
4.4.1	Abordagem bottom-up . . . . .	73
4.4.1.1	Preparação da solução mãe . . . . .	73
4.4.1.2	Diluição da solução . . . . .	76
4.4.1.3	Titulação . . . . .	77
4.4.1.4	Correcções . . . . .	79

<i>CONTEÚDO</i>	xii
4.4.1.5 Incerteza combinada . . . . .	79
4.4.1.6 Incerteza total . . . . .	81
4.4.2 Simulação MC . . . . .	81
<b>5 Conclusões</b>	<b>83</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>86</b>
<b>A Tabelas</b>	<b>88</b>

# Preâmbulo

O presente trabalho encontra-se desenvolvido sob a forma de cinco capítulos.

No primeiro capítulo procurou-se transmitir e resumir, sob a forma de uma perspectiva global o tema do trabalho e o objectivo do mesmo.

No segundo capítulo pretendeu-se abordar os fundamentos teóricos essenciais para a execução do mesmo enquanto no terceiro capítulo apresenta-se a secção experimental onde se descreve os métodos e materiais necessários.

No quarto capítulo apresenta-se os resultados obtidos no decorrer do trabalho, bem como o seu tratamento estatístico e discussão dos mesmos. No último capítulo apresenta-se as conclusões finais do trabalho realizado.

## Simplificações de notação

No sentido de simplificar a notação simbólica de fórmulas químicas nas respectivas equações optou-se por, quando não for relevante, suprimir a carga das espécies presentes em solução bem como os respectivos estados físico-químicos - deste modo o leitor recebe a informação mais relevante de um modo muito mais legível e esquemático.

Em termos de expressões relacionadas com o equilíbrio químico,  $(A)$  representa a actividade enquanto que  $[A]$  representa a concentração analítica da espécie  $A$ . Estas expressões estão relacionadas através do respectivo coeficiente de actividade ( $\gamma_A = (A) / [A]$ ).

## Simplificações de representação

Também no sentido de mais facilmente transferir a informação entre os programas de cálculo e o processador de texto utilizado (L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X, versão 2.1) foi adoptada a notação Europeia, isto é, prescindiu-se da utilização da vírgula, como separador decimal dos números reais, tendo recorrido, para este efeito, ao ponto decimal. Esta substituição permitiu transportar, de uma forma expedita, toda a informação numérica, computacional e gráfica para o texto.

Para facilitar a transferência e permitir manter a coerência dessa informação entre os programas de cálculo utilizados (ex: Excel e Octave) e o processador de texto (L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X), optou-se por representar os números reais sob a forma exponencial com a notação utilizada nos programas de cálculo onde, por exemplo,  $1.201E - 05$  representa o valor  $1.201 \times 10^{-5}$  escrito correctamente no formato

científico.

Sempre que possível e adequado, os valores estimados estão representados com a sua incerteza associada, respectivo erro padrão, indicada entre parêntesis, seguida das respectivas unidades, de forma a conferir maior significado estatístico aos resultados obtidos.



# Capítulo 1

## Introdução

O aumento da qualidade e da esperança de vida dos cidadãos está intimamente ligada aos progressos da ciência e, em particular, aos da indústria farmacêutica. A Indústria Farmacêutica é uma das indústrias com maior impacto a nível mundial, contribuindo não só para a melhoria dos níveis de saúde e respectiva qualidade de vida da população, como para o seu bem-estar e conseqüente desenvolvimento económico [1]. Este tipo de indústria assenta principalmente em dar resposta às expectativas dos doentes, gerando várias possibilidades de tratamento e melhores cuidados de saúde para um conjunto de necessidades que não se encontram de todo satisfeitas, gerando criação de valor para a Economia e sistemas de saúde associados apostando na inovação e gerando emprego qualificado.

Na Indústria Farmacêutica, a química analítica é a área da química que faz a análise qualitativa e quantitativa das amostras. Esta tem desempenhado um papel importante nas mudanças que a indústria farmacêutica tem vindo a enfrentar. Esta área da análise tornou-se um parceiro importante no processo de desenvolvimento de medicamentos e no controlo de qualidade, utilizando técnicas de análise desde as mais clássicas até às mais complexas, como por exemplo os métodos gravimétricos, que determinam a massa do analito ou de algum composto quimicamente relacionado; os métodos volumétricos, para os quais se mede o volume de titulante que reage em quantidade suficiente com todo analito presente; os métodos eletroanalíticos, que envolvem a medição de uma propriedade eléctrica, como o potencial, corrente, resistência e quantidade de carga eléctrica; os métodos espectroscópicos, que se baseiam na medida da interação entre a radiação eletromagnética e os átomos ou as moléculas do analito, ou ainda a produção de radiação pelo analito.

Na parte de controlo e qualidade visa procurar uma melhoria constante das técnicas já existentes ou desenvolver novas técnicas com melhores características, conciliando com o tempo e recursos, que são factores de extrema importância para a indústria. Trabalhando sob condições limitadas de amostras e em plena conformidade das boas práticas de fabrico atuais (GMPs), os analistas são chamados a gerar dados exactos e precisos. A ciência e a tecnologia utilizada hoje, juntamente com os novos regulamentos, fizeram da análise farmacêutica muito mais complicada em comparação com o que era há menos de dez anos atrás [2].

E é com base nestas técnicas e conhecimentos nesta área que o Controlo e Qualidade exhibe um papel crucial na indústria, realizando as análises químicas

necessárias para assegurar que as matérias-primas utilizadas satisfazem determinadas especificações, e também para controlar a qualidade do produto final. As análises das matérias-primas são realizadas para assegurar que não existem substâncias involgares presentes, que poderiam condicionar o processo de fabrico ou aparecem como uma impureza prejudicial no produto final. O produto final fabricado é também ele sujeito ao controle de qualidade para garantir não só que os seus componentes essenciais estejam presentes dentro do intervalo pré-determinado como também as impurezas não excedam os limites especificados [3].

Para que todo este esforço e todos os resultados gerados sejam fiáveis, é necessário passar por um processo de validação. Nesta fase existe um conjunto de passos a seguir que permite demonstrar que o método analítico é adequado para a quantificação de um determinado analito numa determinada matriz a um certo nível de concentração, só assim se pode garantir confiança nos resultados e poder reportá-los, sem correr o risco de ter que rejeitar ou tirar do mercado producto que está fora de especificação. É neste contexto que este trabalho se insere, pretendendo assim, demonstrar a necessidade da validação de métodos analíticos neste tipo de indústrias.

## 1.1 A Indústria Farmacêutica

Os Laboratórios Basi iniciaram a sua atividade em 1956. Em 2007, foram integrados num grupo alargado de empresas ligadas à Indústria Farmacêutica, tais como FHC (Farmacêutica), Phagecon (Consultoria e Serviços Farmacêuticos), Pharmaportugal e Overpharma (Produtos Médicos e Farmacêuticos Lda.), criando assim condições de cooperativismo. O forte investimento do grupo na criação de um bloco industrial sólido, levou à construção do Laboratório de Controlo de Qualidade e de uma nova unidade fabril de excelência, definindo uma nova orientação estratégica e promovendo uma profunda reestruturação organizativa, que levou os laboratórios Basi para um referência internacional. O objetivo da aquisição dos laboratórios Basi foi conferir ao grupo uma garantia de competitividade, de autonomia e de aprovisionamento.

Os Laboratórios Basi desenvolvem e fabricam um leque de produtos, já com um portfólio alargado, que se apresentam nas seguintes formas farmacêuticas: soluções e suspensões orais, xaropes, produtos para aplicação cutânea tais como gel, cremes, pomadas e supositórios.

O Controlo de Qualidade dos Laboratórios Basi está dotado de todos os recursos necessários para realizar qualquer tipo de análise, a qualquer tipo de produto, material ou forma farmacêutica.

No laboratório físico-químico o tipo de análise pode ser desde a análise por HPLC, à Cromatografia gasosa com headspace acoplado, a ensaios de desagregação e dissolução, com coletor de frações e espectrofotómetro associado, à potenciometria e espectroscopia de UV-VIS e infravermelho.

Já o laboratório de microbiologia, está dotado dos equipamentos e recursos necessários para fazer qualquer tipo de ensaio a formas farmacêuticas estéreis e não estéreis, incluindo ensaio de esterilidade, ensaio de endotoxinas, contagem de microorganismos aeróbios viáveis totais, contagem de fungos e leveduras, pesquisa de microorganismos específicos e testes de eficácia de conservantes.

A forte aposta na internacionalização exige uma escolha criteriosa no de-

envolvimento do portfólio, bem como uma grande capacidade de adaptação às características específicas de cada mercado.

A empresa garante um desenvolvimento eficiente de produtos desde a formulação inicial em laboratório até à produção em grande escala. Os processos de desenvolvimento e produção são totalmente integrados. O departamento de desenvolvimento farmacêutico actua activamente nas áreas das novas formulações e desenvolvimento de produtos, no desenvolvimento de técnicas para a melhoria dos processos de fabrico e na transferência de tecnologia e aumento de escala de produção.

A missão dos Laboratórios Basi é a de fornecer às pessoas soluções terapêuticas ajustadas às suas necessidades, ao melhor preço possível, com a garantia de excelência de décadas de actividade. Para tal, têm implementado um sistema de gestão de qualidade conforme as normas ISO 9001, que permite uma melhoria contínua de processos, garantia de bons serviços e resposta às exigências da população. Este sistema de gestão de qualidade é diariamente acompanhado pelo Responsável de Gestão da Qualidade do Departamento de Garantia da Qualidade.

## 1.2 Diagnóstico da qualidade

A análise de medicamentos é realizada com frequência na rotina dos laboratórios das indústrias, pois é um ponto crucial para a garantia da qualidade do produto e para uma maior segurança da população que irá consumir este medicamento.

Esta preocupação com a qualidade dos produtos farmacêuticos teve origem em diversos acontecimentos, como, medicamentos falsificados, adulterados e alterados. O que também pode acontecer é uma falha durante o processo, ou uma má conservação que poderá danificar o medicamento e, com isso, deixar de exercer seu papel fundamental na saúde.

Como é um problema de âmbito mundial, o controle de qualidade na indústria farmacêutica tornou-se parte do processo industrial, podendo, inclusive, ser considerado a etapa mais importante do processo.

O fabricante deve assegurar que os medicamentos fabricados são adequados para o fim que lhes é destinado, que cumprem as exigências da autorização de comercialização e que os doentes que os utilizarem não correm riscos devido a uma segurança, qualidade ou eficácia duvidosas.

O cumprimento deste objectivo de qualidade é da responsabilidade da administração e exige não só a participação mas também o total empenho do pessoal, em muitos dos departamentos, a todos os níveis, dos fornecedores e dos distribuidores da empresa.

Para que se alcance a fiabilidade do objectivo da qualidade, deve ser implementado um sistema credível de garantia de qualidade que inclua as práticas de um bom fabrico, GMPs e, conseqüentemente, um controlo da qualidade. O sistema tem de ser amplamente documentado e a sua eficácia comprovada, para isso o pessoal nesta área deve ser competente e em número suficiente, as instalações devem ser adequadas e suficientes, assim como o equipamento e os serviços de apoio.

Por outro lado, existem responsabilidades/regras por parte do detentor da autorização de fabrico e dos colaboradores qualificados envolvidos que têm de

ser cumpridas. Estas responsabilidades e regras são descritas de modo a evidenciarem a sua importância na produção e controlo dos medicamentos, a três níveis: (1) garantia de qualidade, (2) boas práticas de fabrico e (3) controlo de qualidade.

#### 1. Garantia de Qualidade:

Um sistema de garantia de qualidade adequado para o fabrico de medicamentos deve assegurar que:

- os medicamentos sejam concebidos e preparados tendo em conta as exigências das boas práticas de fabrico e das boas práticas de laboratório;
- as operações de produção e controlo estejam perfeitamente especificadas e que sejam cumpridas;
- as responsabilidades das chefias estejam perfeitamente definidas;
- estejam obtidas as condições de fabrico, de fornecimento e de utilização de matérias-primas correctas e materiais de embalagem adequados;
- todo o controlo a fazer nos produtos intermédios, os ensaios em processo e as validações sejam executados;
- o produto final seja correctamente processado e verificado, de acordo com procedimentos definidos;
- nenhum medicamento seja vendido ou fornecido sem que uma pessoa qualificada tenha certificado que cada lote produzido é controlado de acordo com as exigências da autorização de comercialização ou outros regulamentos relevantes para a produção, controlo e aprovação de medicamentos;
- existam condições adequadas para que os medicamentos sejam armazenados, distribuídos e manuseados, de modo que a qualidade seja mantida durante o seu prazo de validade;
- exista um procedimento para que haja auto-inspecções e auditorias de qualidade, periódicas, que comprovem a eficácia e a aplicação do sistema da garantia de qualidade.

#### 2. Boas Práticas de Fabrico para medicamentos:

As boas práticas de fabrico dizem respeito não só à produção mas também ao controlo de qualidade, devendo obedecer às seguintes exigências:

- todos os processos de fabrico são rigorosamente definidos, sistematicamente verificados e capazes de produzirem medicamentos consistentes, com uma qualidade requerida e com o cumprimento das especificações estipuladas;
- os passos do processo de fabrico considerados críticos e as mudanças significativas feitas no processo devem ser validados;
- para que as boas práticas de fabrico sejam exequíveis, é necessário que:
  - a) o pessoal esteja adequadamente qualificado e treinado;

- b) as instalações sejam adequadas e haja espaço;
- c) os serviços e o equipamento sejam convenientes;
- d) os materiais, os contentores e os rótulos sejam correctos;
- e) haja procedimentos e instruções adequados;
- f) haja armazenagem e transportes convenientes;
- as instruções e os procedimentos devem ser escritos de uma forma pedagógica, clara, sem ambiguidades, referindo, especificamente, um assunto;
- os operadores devem ser treinados a seguir correctamente os procedimentos;
- todos os registos a fazer durante o processo de fabrico devem ser feitos manualmente ou por equipamento com registadores ou por ambas as modalidades. Durante o fabrico deve ficar demonstrado que todos os passos exigidos por instruções ou procedimentos foram, de facto, executados e que as quantidades adicionadas e a qualidade de produtos são, na realidade, as que se esperava. Qualquer desvio significativo deve ser sempre detalhadamente registado e investigado;
- todos os registos de fabrico de um lote e os registos da sua distribuição têm de ser cuidadosamente arquivados, de uma maneira organizada e de fácil acesso, de modo a que se constitua uma história completa do lote;
- os pontos de distribuição e armazenagem devem minimizar os riscos de alteração da qualidade;
- deve haver um sistema que permita a recolha de qualquer lote de um produto nos pontos de venda e distribuição;
- todas as reclamações recebidas do mercado devem ser cuidadosamente investigadas. Devem ser tomadas medidas apropriadas quanto aos produtos defeituosos e prevenir a repetição dos factos ocorridos.

### 3. Controlo de qualidade:

O controlo de qualidade é a parte das boas práticas de fabrico que trata da amostragem, especificações e ensaios. Trata também da organização, documentação e procedimentos que asseguram que nenhum dos materiais a utilizar no fabrico ou os medicamentos aprovados para venda ou distribuição sejam libertados, até que a sua qualidade seja comprovada.

As exigências básicas do controlo de qualidade são as seguintes:

- ter instalações adequadas, pessoal treinado, procedimentos aprovados e adequados para inspecção, amostragem, ensaio de matérias-primas, materiais de embalagem, produtos intermédios, produto a granel e produto acabado.
- ter procedimentos para controlar o meio ambiente, de acordo com as exigências das boas práticas de fabrico;
- as amostras de matérias-primas, materiais de embalagem, produtos intermédios, produto a granel e produto acabado são colhidas por pessoal e métodos aprovados pelo controlo de qualidade;

- os métodos de análise devem ser validados;
- tem de haver registos manuais e ou registos instrumentais que demonstrem que toda a inspecção, amostragem e ensaios executados foram, na realidade, feitos. Qualquer desvio tem de ser registado e rigorosamente investigado;
- o produto acabado tem de conter todas as matérias-primas activas, de acordo com a composição quantitativa e qualitativa, expressa na autorização de comercialização, e em conformidade com a pureza exigida. O produto acabado tem de estar contido num recipiente apropriado e correctamente rotulado;
- tem de haver registos dos resultados de inspecção e dos ensaios executados nas matérias-primas, material de embalagem, produto intermédio, produto a granel e produto final, garantindo que foram efectuados segundo as especificações estabelecidas. Igualmente, tem de haver uma verificação da documentação relevante da produção e de qualquer desvio aos procedimentos expressos;
- nenhum lote de produção é aprovado para venda ou distribuição sem que haja uma certificação por pessoa qualificada, indicando que está de acordo com as exigências da autorização de comercialização;
- tem de haver amostras de referência, em quantidade suficiente, das matérias-primas e do produto contido na sua embalagem final, para posteriores exames, se forem necessários.

Desta maneira e com estas três entidades interligadas, desenvolve-se um organismo complexo e suficientemente capaz de executar um envolvimento interligado de procedimentos estipulados, obtendo um resultado benéfico, que passa por um produto final com qualidade, com as características para o qual foi desenvolvido e sem riscos para o consumidor, visando a satisfação e qualidade de vida da população [4].

### 1.3 Relevância de alguns excipientes

Excipiente é toda a matéria-prima incluída nas formas farmacêuticas, que se junta às substâncias activas ou suas associações para servir-lhes de veículo, possibilitar a sua preparação e a sua estabilidade, modificar as suas propriedades organolépticas ou determinar as propriedades físico-químicas do medicamento e a sua biodisponibilidade.

Os excipientes são agentes não medicinais que existem nos medicamentos, auxiliam o medicamento a ter a devida forma e eficiência farmacêutica e completam a massa ou volume especificado, isto é, muitas vezes os princípios activos são muito potentes e tem que ser usados em concentrações muito baixas, por isso é necessário o excipiente para dar o volume necessário para o medicamento. Os excipientes como são substâncias farmacologicamente inativas, são usados como veículo para o princípio activo e possuem várias funções e específicas, estes são combinados com o princípio activo para se obter as diversas formas farmacêuticas. Apesar de não possuírem ações terapêuticas, são de fundamental importância para a eficácia do medicamento, facilitar a administração, garantir

a conservação e até o próprio processo de fabrico. Os excipientes estão classificados segundo a sua função, como a libertação controlada, absorção num certo local do aparelho digestivo, viscosidade, pH e conservação.

Tabela 1.1: Listagem de algumas classes de excipientes, descrevendo a sua função e alguns exemplos de excipientes.

Excipiente	Função	Exemplos
Alcalinizante	É utilizado em preparações líquidas para fornecer um meio alcalino para fins de estabilidade do produto.	Dietanolamina, trietanolamina, citrato de sódio
Acidificante	É empregue em preparações líquidas para fornecer meio ácido, contribuindo com a estabilidade do produto.	Ácido cítrico, ácido fumárico
Consevante antifúngico	Usado em preparações líquidas e semi-sólidas para prevenir o crescimento de fungos.	Butilparabeno, etilparabeno, metilparabeno, ácido benzóico, propilparabeno, benzoato de sódio
Antioxidante	Usa-se para prevenir a deterioração das preparações por oxidação.	Ácido ascórbico; palmitato de ascorbila; hidroxibutilanisol; hidroxibutiltolueno; ácido hipofosforoso; monoglicérol; ascorbato de sódio; bissulfito de sódio; metabissulfito de sódio; formaldeído de sódio
Tamponizante	Emprega-se para resistir à mudança de pH após diluição ou adição de ácidos.	Metafosfato de potássio, fosfato de potássio, acetato de sódio, citrato de sódio
Quelante	Substâncias que formam complexos estáveis solúveis em água (quelato) com metais, usado em alguns líquidos farmacêuticos como estabilizantes para complexar metais pesados que podem promover a instabilidade.	EDTA, citrato, ácido edético
Corante	Emprega-se para conferir cor em preparações sólidas (comprimido e cápsulas) e líquidas.	Óxido férrico, caramelo
Agente emulsificante	Usa-se para promover a dispersão de partículas finamente divididas de líquidos num meio no qual é imiscível. O produto final pode ser uma emulsão líquida ou uma emulsão semi-sólida (ex: creme).	Monoestearato de glicerina, monoestearato de sorbitano, estearato de polioxietileno 50
Aromatizante	É utilizado para fornecer sabor e odor agradável à preparação.	Óleo de anis, de canela, coco, de laranja, de hortelã, mentol, baunilha
Espessantes	São empregues para aumentar a consistência ou dureza de uma preparação, geralmente uma pomada.	Álcool cetílico, cera branca, cera amarela, álcool estearílico, parafina, cera microcristalina, cera de ésteres cetílicos
Edulcorante	É usado para conferir sabor doce a preparação.	Aspartame, dextrose, glicerina, sorbitol, manitol, sacarose, sacarina sódica

Neste caso, o excipiente em estudo é o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA <sup>1</sup>; 1,1',2,2'-(Ethano-1,2-dinitrilo)tetra-acético) usado, normalmente, em várias preparações, como preparações líquidas, incluindo colutórios, preparações oftálmicas, e preparações tópicas. Este excipiente está classificado como agente quelante, formando complexos estáveis (quelatos) com iões alcalino-terrosos e com metais pesados. Desta forma, o EDTA, complexa com metais pesados que podem estar presentes no produto e promover a instabilidade da formulação.

Esta é a razão porque os agentes quelantes são frequentemente descritos como “removedores” de iões em solução, sendo este processo, comumente, conhecido como sequestro. A estabilidade do complexo está dependente do ião metálico envolvido e do pH, tema abordado e desenvolvido mais à frente [5].

<sup>1</sup>Do Inglês, Ethylenediamine tetraacetic acid

## Capítulo 2

# Fundamentação

Antes de partir para os assuntos relacionados com o objectivo principal deste trabalho, a validação do método analítico, é necessário abordar alguns aspectos relacionados com o fundamento físico-químico do método analítico, nomeadamente no que se refere à formação de complexos em solução.

Para que o produto farmacêutico tenha um prazo de vida considerável, é necessário adicionar certos ingredientes que lhe confira essa capacidade. É usado, normalmente, em preparações líquidas como agente antioxidante, prevenindo a oxidação na tentativa de proteger a formulação de qualquer processo oxidativo e conseqüentemente o desenvolvimento de substâncias degradativas levando há inativação do fármaco. É usado também como agente quelante (sequestrante), actuando como estabilizante da formulação, este complexa com metais pesados que podem estar presentes no produto e que podem promover instabilidade.

Para que um método analítico possa ser posto em prática corrente num laboratório de apoio a uma indústria farmacêutica este tem de ser previamente validado. Por este motivo iremos aqui abordar as questões mais relevantes relacionados com este assunto.

Já na fase final da validação há necessidade de estimar a incerteza total do método analítico razão pela qual esses conceitos também serão aqui abordados.

### 2.1 Equilíbrio químico

O método analítico em causa pode ser classificado como um caso clássico de volumetria de complexação. Neste tipo de métodos, o fundamento de quantificação é essencialmente de cariz químico e escapa um pouco ao conceito tradicional de método instrumental. Contudo, no nosso entendimento, este facto não implica que este método seja de modo algum menos relevante para aquilo que se pretende - quantificar o teor de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) em preparações farmacêuticas com teores finais da ordem de 1 mM.

Neste tipo de reacções químicas participam essencialmente dois tipos de compostos - o catião<sup>1</sup> (regra geral um metal) e o ligando (espécie que vai coordenar

---

<sup>1</sup>Chama-se de catião uma espécie que apresenta carga positiva em solução.



o primeiro). No entanto convém não esquecer que todo este processo químico ocorre no seio de uma solução aquosa que, como iremos ver, determina alguns destes comportamentos.

Considerando que durante o acto da titulação não ocorrem alterações de estado de oxidação<sup>2</sup>, ainda assim este sistema químico está sujeito a diversos processos químicos distintos tais como reacções do tipo ácido-base, solubilidade e formação de complexos.

### 2.1.1 O meio aquoso

Sendo o meio aquoso constituído por moléculas polares, ver figura (2.1), a água tem tendência para associar-se estabelecendo geometrias relativamente estáveis apesar de se tratar de um fluido no estado líquido.

Na presença de espécies com carga (catiões e aniões<sup>3</sup>), a água rearranja-se de forma a “coordenar”<sup>4</sup> o ião, ver figura (2.1), minimizando deste modo as repulsões electrostáticas [6].

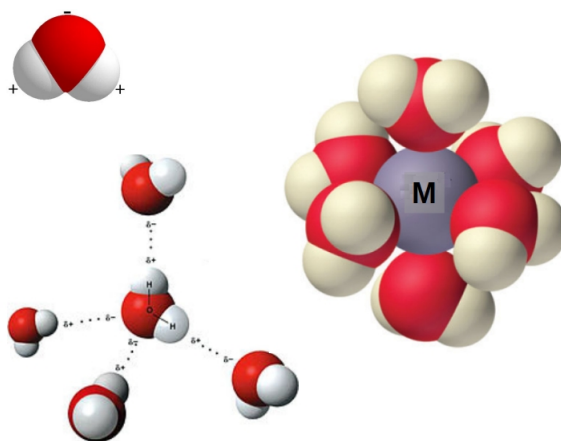
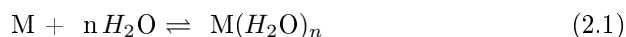


Figura 2.1: Representação da água e algumas das suas propriedades: em cima e à esquerda representa-se a molécula de  $H_2O$  evidenciando a sua polaridade (resultante da diferença de electronegatividade entre os elementos hidrogénio e oxigénio); ainda à esquerda mas em baixo representa-se o tipo de estrutura tridimensional de como as moléculas do solvente se organizam em solução; na presença de catiões (M) a água organiza-se à sua superfície exibindo-lhe o seu dipolo negativo de modo a minimizar a energia do sistema.

Esta interacção íntima das moléculas de água em torno dos iões nela dissolvidos designa-se de solvatação.

Este fenómeno pode ser descrito através da equação



<sup>2</sup>É previsível que, sendo o chumbo (II) e o EDTA espécies químicas estáveis em termos de transformações do tipo oxidação-redução já que correspondem aos respectivos estados mais estáveis.

<sup>3</sup>São espécies químicas que apresentam carga negativa em solução.

<sup>4</sup>Entenda-se aqui neste caso a formação de uma estrutura relativamente organizada de moléculas de água em redor do ião, com o qual interagem por via electrostática.

em que M representa o catião que vai ser hidratado para formar a espécie solvatada ( $M(H_2O)_n$ ).

Por assim dizer, a água é de facto o primeiro ligando com quem o catião interage no processo de dissolução do respectivo composto em meio aquoso e esta relação é determinante no subsequente comportamento físico-químico desta espécie em solução.

### 2.1.2 Reacções ácido-base

O metal hidratado, formado através do equilíbrio expresso pela equação (2.1), pode sofrer desprotonação como se se tratasse de um ácido fraco. A figura (2.2) traduz esquematicamente como o processo de desenrola.

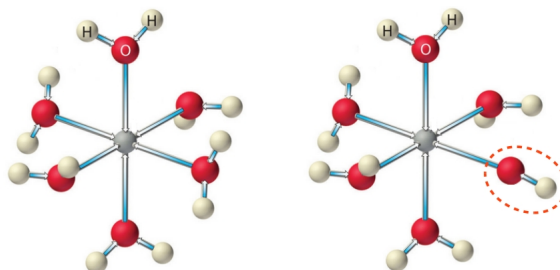
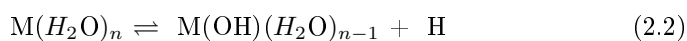


Figura 2.2: Esquema representativo do comportamento ácido de catiões (M) em solução - o protão libertado pelo aquo-complexo é responsável pela formação dos respectivos hidróxidos metálicos. De uma forma geral, a forte interacção entre o catião e o dipólo negativo da molécula de água (concentrado sobre a superfície o átomo de oxigénio mais afastada dos hidrogénios) faz-se através de uma transferência parcial de carga. Devido à grande diferença de electronegatividade entre o oxigénio e o hidrogénio e ainda à transferência de carga  $O \rightarrow M$ , o par de electrões da ligação O-H dessa molécula de água fica mais deslocalizado sobre o respectivo oxigénio, promovendo a libertação de um protão e a formação de um ligando hidróxido ( $OH^-$ ), assinalado na figura com o tracejado.

Este processo de hidrólise ácida pode ser descrito pela equação genérica



onde a espécie H representa  $H^+$  (*aq.*).

À medida que este tipo de reacções se vão sucessivamente processando, as moléculas de água que coordenam o metal central vão dando lugar a ligandos com carga ( $OH^-$ ) que apresentam maior afinidade para o catião<sup>5</sup>. Como consequência a carga total da espécie formada vai progressivamente deixando de ser positiva para tender para zero, comprometendo desse modo a sua solubilidade em meio aquoso.

<sup>5</sup>O ligando carregado com carga oposta à espécie central interage melhor do que uma molécula polar.

Por outro lado, o EDTA é um composto químico que possui a capacidade de se ionizar em meio aquoso conforme o pH do meio. A sua fórmula estrutural encontra-se representada na figura (2.3).

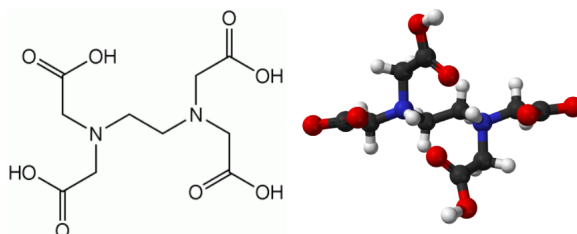
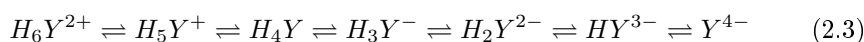


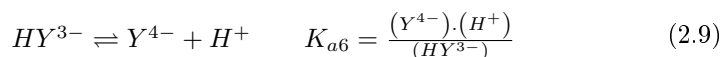
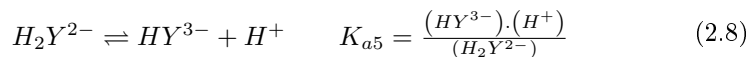
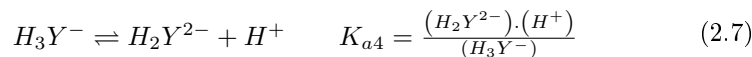
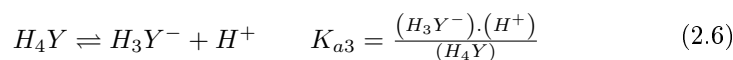
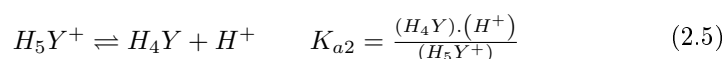
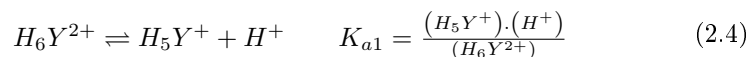
Figura 2.3: Fórmula estrutural e representação tridimensional do EDTA. Na imagem da direita os átomos assinalados a vermelho representam o elemento oxigénio (O) e a azul os átomos de azoto (N); os restantes (a branco) são os hidrogénios (H).

A sua ionização depende da presença de quatro grupos carboxilato (-COOH) e duas aminas terciárias<sup>6</sup> ( $R_1-N(R_2)-R_3$ ). Os grupos carboxilato apresentam valores de  $pK_a$  de 0.0, 1.5, 2.00 e 2.69 enquanto que os grupos amínicos os valores 6.13 e 10.37.

Se se considerar toda a escala de pH usual (valores situados de 0 a 14) o EDTA comporta-se como uma espécie hexa-prótica convertendo-se sucessivamente em



Se para cada uma destas espécies, eq.(2.3), se definir uma constante de equilíbrio de acidez (desprotonação sucessiva de cada espécie ácida) teremos de considerar os seguintes equilíbrios,



Escrevendo a equação de balanço de massa para o EDTA,

$$C_{EDTA} = [H_6Y^{2+}] + [H_5Y^+] + [H_4Y] + [H_3Y^-] + [H_2Y^{2-}] + [HY^{3-}] + [Y^{4-}] \quad (2.10)$$

<sup>6</sup>Uma amina terciária corresponde a um átomo de azoto tri-substituído por átomos de carbono.

Aproximando as equações (2.4) a (2.9) para o caso de força iónica insignificante<sup>7</sup>, ao substituir em (2.10) e simplificando fica-se com

$$\frac{C_{EDTA}}{[H_6Y^{2+}]} = \frac{[H^+]^6 + \sum_{i=1}^6 \left( \prod_{j=1}^i K_{aj} \right) \cdot [H^+]^{6-i}}{[H^+]^6} = \frac{1}{\alpha_0} \quad (2.11)$$

O inverso da equação obtida, eq.(2.11), corresponde à fracção molar da espécie não desprotonada ( $H_6Y^{2+}$ ) também designada de  $\alpha_0$ .

De modo similar podem ser definidas as fracções molares para as espécies mono-desprotonada ( $\alpha_1 = [H_5Y^+]/C_{EDTA}$ ) a totalmente desprotonada ( $\alpha_6 = [Y^{4-}]/C_{EDTA}$ ).

A maior vantagem deste tipo de abordagem quantitativa do equilíbrio ácido base com espécies polipróticas é permitir traçar o diagrama de especiação com base nos valores de  $pK_a$  determinados experimentalmente.

Na figura (2.4) encontra-se representado o diagrama de especiação do EDTA com base nos valores publicados [7].

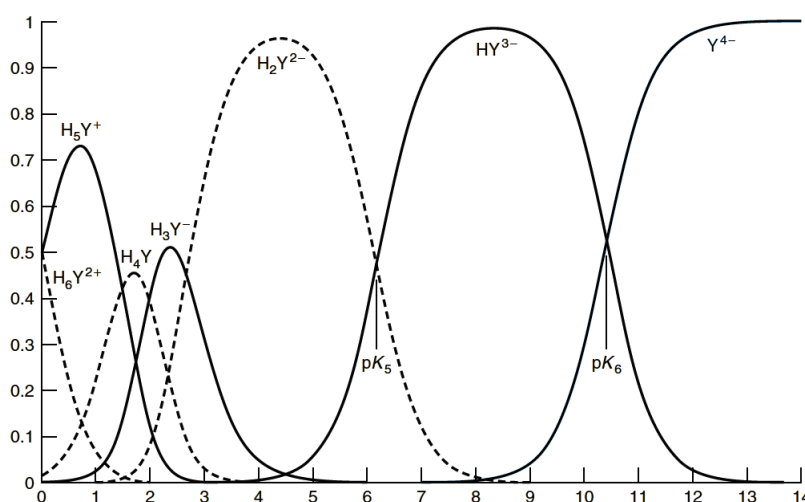


Figura 2.4: Diagrama de especiação do EDTA (fracções molares) em função do valor de pH do meio. A linha a azul destaca a fracção molar da espécie totalmente desprotonada do EDTA ( $Y^{4-}$ ) que é a que tem maior apetência para coordenar cátions metálicos (adaptado de [7]).

Este diagrama, fig.(2.4), permite evidenciar que a valores baixos de pH (entre 0 e 2) coexistem quatro espécies -  $H_6Y^{2+}$ ,  $H_5Y^+$ ,  $H_4Y$  e  $H_3Y^-$ . Só para valores de pH superiores a 4 é que começa a haver predomínio de uma determinada espécie numa certa gama de valores de pH. Contudo, é necessário o meio

<sup>7</sup>Quando a força iónica é insignificante ( $I \rightarrow 0$ ) a actividade da espécie iónica ( $(X) = \gamma_X \cdot [X^z]$ ) aproxima-se da respectiva concentração analítica ( $[X^z]$ ) já que o coeficiente de actividade respectivo aproxima-se do valor unitário ( $\gamma_x \rightarrow 1$ ).

apresentar um pH superior a 10.37 ( $pK_{a6}$ ) para haver predomínio da espécie totalmente desprotonada ( $Y^{4-}$ ), que é aquela que tem maior apetência para formar complexos com catiões metálicos.

### 2.1.3 Solubilidade

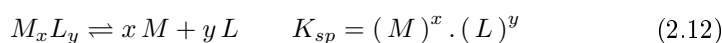
A solubilidade de uma espécie em solução aquosa depende, em grande parte, da energética - estabilidade relativa das interacções coesivas (ligações soluto-soluto e solvente-solvente) e as interacções adesivas (soluto-solvente) [6].

No caso de as interacções coesivas serem predominantes sobre as interacções de adesão, as espécies (soluto e solvente) irão ter tendência para permanecer coesas e a não interagirem entre elas e, como tal, o soluto não se irá dissolver no solvente.

No caso do meio aquoso, sendo a sua molécula polar, as interacções soluto-soluto já de si são fortes. Se a espécie em solução for um ião (catião / anião) o tipo de interacção soluto-solvente será do tipo ião-dipolo cuja estabilidade é superior à dipolo-dipolo, principal força coesiva das moléculas da água.

Contudo, para que o composto se dissolva inicialmente terá que ter forças coesivas suficientemente fracas ou ligeiramente enfraquecidas para facultar a sua dissolução.

No caso de um composto iónico pouco solúvel do tipo  $M_xL_y$  a dissolver-se em meio aquoso o equilíbrio define-se em termos de



em que as espécies  $M$  e  $L$  representam o catião e o anião da composição do composto iónico.

Uma das forças motrizes mais relevantes que promove a solubilidade de espécies em meio aquoso está relacionada com interacções electrostáticas. Estas serão tanto mais intensas quanto maior a densidade de carga das partículas em solução.

No caso da hidrólise dos aquo-complexos, eq.(2.2) na página 12, a solubilidade destas espécies em meio aquoso fica muitas vezes comprometida ficando por isso esta dependente do valor do pH do meio.

Para o caso da dissolução de um hidróxido  $M(OH)_n$  teremos



sendo o respectivo produto de solubilidade dado por

$$pK_{sp[M(OH)_n]} = (M) \cdot (OH)^n \quad (2.14)$$

Na tabela (2.1) indicam-se alguns dos valores da literatura para os catiões mais insolúveis em água, devido à formação dos respectivos hidróxidos.

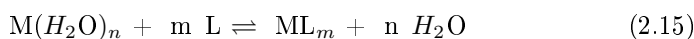
Tabela 2.1: Solubilidade de alguns hidróxidos de catiões em meio aquoso - produtos de solubilidade ( $pK_{sp}$ ) tabelados a 25 °C [7, 8].

	$pK_{sp}$		$pK_{sp}$		$pK_{sp}$		$pK_{sp}$
<i>AgOH</i>	15.4	<i>Co(OH)<sub>3</sub></i>	44.5	<i>In(OH)<sub>3</sub></i>	36.9	<i>Tl(OH)<sub>3</sub></i>	45.2
<i>Al(OH)<sub>3</sub></i>	33.5	<i>Cr(OH)<sub>2</sub></i>	15.7	<i>Mg(OH)<sub>2</sub></i>	10.7	<i>U(OH)<sub>2</sub></i>	22.4
<i>Au(OH)<sub>2</sub></i>	5.5	<i>Cr(OH)<sub>3</sub></i>	29.8	<i>Mn(OH)<sub>2</sub></i>	12.7	<i>V(OH)<sub>3</sub></i>	34.4
<i>Ba(OH)<sub>2</sub></i>	3.2	<i>Cu(OH)<sub>2</sub></i>	29.4	<i>Ni(OH)<sub>2</sub></i>	15.1	<i>Y(OH)<sub>3</sub></i>	23.2
<i>Ca(OH)<sub>2</sub></i>	5.3	<i>Fe(OH)<sub>2</sub></i>	15.1	<i>Pb(OH)<sub>2</sub></i>	15.2	<i>Zn(OH)<sub>2</sub></i>	15.5
<i>Cd(OH)<sub>2</sub></i>	14.3	<i>Fe(OH)<sub>3</sub></i>	38.4	<i>Pd(OH)<sub>2</sub></i>	28.5		
<i>Ce(OH)<sub>3</sub></i>	21.2	<i>Ga(OH)<sub>3</sub></i>	20.7	<i>Sc(OH)<sub>3</sub></i>	30.1		
<i>Co(OH)<sub>2</sub></i>	14.8	<i>Hg(OH)<sub>2</sub></i>	25.4	<i>Sn(OH)<sub>2</sub></i>	26.2		

Da tabela anterior verifica-se que, de uma forma genérica, os hidróxidos metálicos mais insolúveis correspondem a metais de transição, especialmente a espécies de maior estado de oxidação já que este aumento de carga do catião está relacionado com um aumento da sua densidade de carga e, conseqüentemente, reforça as interações electrostáticas entre o catião e o anião hidroxilo conduzido à formação de um composto iónico de alta estabilidade e por isso com menor solubilidade<sup>8</sup>.

#### 2.1.4 Formação de complexos

Quando presente em solução uma espécie (L) que é capaz de interagir melhor com o catião solvatado que o próprio solvente, o equilíbrio previamente estabelecido, eq. (2.1), evolui no sentido de



onde  $ML_m$  representa o complexo formado por coordenação com “ $m$ ” moléculas de ligando - diz-se então que o número de coordenação do complexo formado é “ $m$ ”.

Sendo a sua intervenção genérica, usualmente o solvente não é considerado na escrita deste tipo de equações e a reacção expressa através da equação (2.15) pode ser convenientemente simplificada representando-se sob a forma



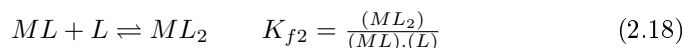
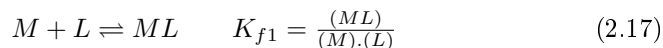
que contudo implicitamente pressupõe a participação da água na reacção<sup>9</sup>.

A equação anterior transmite ainda uma noção que corresponde a uma realidade não necessariamente totalmente correcta - da sua escrita depreende-se que se forma de uma só vez uma espécie com número de coordenação  $m$  o que

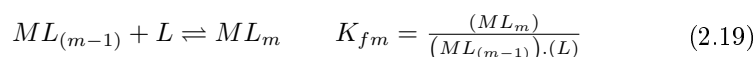
<sup>8</sup>Devido às intensas forças coesivas o composto iónico formado terá maior dificuldade em desagregar-se em solução ou seja, será menos solúvel.

<sup>9</sup>Regra geral, para evidenciar esse facto são acrescentadas anotações que evidenciam o estado em que a espécie se encontra - (aq.) para espécies presentes em meio aquoso, (solv.) para espécies solvatadas, etc. Não pretendendo ser exaustivos num assunto que não é o cerne do trabalho, optou-se por simplificar este tipo de notação de modo a transmitir uma mensagem mais clara ao leitor.

não está totalmente correcto já que, na realidade, este equilíbrio processa-se em diferentes fases tais como



...



A diferença mais relevante nesta notação destaca-se essencialmente ao nível da constante de equilíbrio que se está a considerar - se se pretender definir o equilíbrio químico expresso pela equação (2.16) deve-se então mencionar que se trata de uma constante global de formação ( $\beta_m$ )

$$\beta_m = \frac{(ML_m)}{(M).(L)^m} \quad (2.20)$$

enquanto que nos restantes equilíbrios, eqs.(2.17) a (2.19), se trata de constantes de formação parciais ( $K_{fi}$ ) onde as espécies entre parêntesis representam as actividades das respectivas espécies representadas.

Embora os conceitos de equilíbrio (global ou faseado) sejam distintos eles podem ser mutuamente transpostos se se atender a que a constante de formação global ( $\beta_m$ ) corresponde ao produto das constantes parciais ( $K_{fi}$ ) que conduzem à formação dessa espécie ou seja,

$$\beta_m = \prod_{i=1}^m K_{fi} = K_{f1}.K_{f2} \dots .K_{fm} \quad (2.21)$$

Alguns ligandos possuem a particularidade de poderem coordenar o metal central através do estabelecimento de diversas ligações simultâneas - este tipo de ligando designa-se de substância quelante e a espécie coordenada formada designa-se de quelato.

Um destes exemplos de quelante é o EDTA que coordena integralmente um catião dando origem à formação exclusiva de complexos com estequiometria de 1:1 (1M - 1L)<sup>10</sup>.

O EDTA é um agente complexante muito versátil e com elevada afinidade para diversos catiões presentes em solução. A sua forma estrutural e o modo como este forma os quelatos M-EDTA está representada na figura (2.5).

<sup>10</sup>Neste tipo de complexos a proporção entre metal (M) e ligando (L) mantém-se sempre de 1:1, respectivamente.

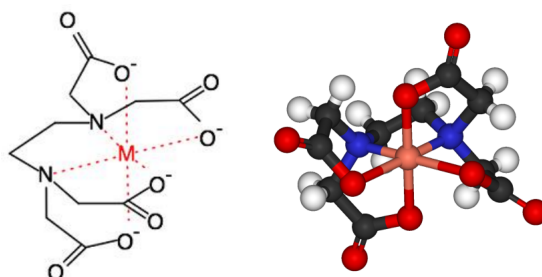
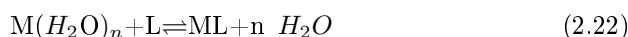


Figura 2.5: Estrutura do ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA): à esquerda a representação do ligando e à direita uma perspectiva tridimensional do complexo M-EDTA formado.

Pensa-se que o tipo de complexos formados apresenta elevada estabilidade (constantes de formação muito elevadas) não só devido ao tipo de ligações formadas ( $M^+ \text{---} :N$  e  $M^+ \text{---} :O^-$ ) mas essencialmente devido a um efeito entrópico positivo relacionado a formação do quelato<sup>11</sup>, ver equação



Esta afinidade depende essencialmente das características do catião (carga, configuração electrónica) em causa mas também do grau de ionização do EDTA, como já anteriormente citado na secção 2.1.2, na página 12.

Na tabela (2.2) encontra-se uma listagem de algumas constantes termodinâmicas relativas à formação de complexos metal-EDTA ( $\log(K_f)$ ).

Tabela 2.2: Constantes de equilíbrio referentes à formação de complexos com o EDTA a 25 °C e estimadas para força iónica nula [7].

Ião	$\log(K_f)$	Ião	$\log(K_f)$	Ião	$\log(K_f)$	Ião	$\log(K_f)$
$Ag^+$	7.2	$Eu^{3+}$	17.25	$Mn^{3+}$	25.2	$Ti^{3+}$	21.3
$Al^{3+}$	16.4	$Fe^{2+}$	14.3	$Na^+$	1.86	$Tl^+$	6.41
$Ba^{2+}$	7.88	$Fe^{3+}$	25.1	$Nd^{3+}$	16.51	$Tl^{3+}$	35.3
$Be^{2+}$	9.7	$Ga^{3+}$	21.7	$Ni^{2+}$	18.4	$Tm^{3+}$	19.32
$Bi^{3+}$	27.8	$Gd^{3+}$	17.35	$Pb^{2+}$	18	$U^{4+}$	25.7
$Ca^{2+}$	10.65	$Hf^{4+}$	29.5	$Pd^{2+}$	25.6	$V^{2+}$	12.7
$Cd^{2+}$	16.5	$Hg^{2+}$	21.5	$Pm^{3+}$	16.9	$V^{3+}$	25.9
$Ce^{3+}$	15.93	$Ho^{3+}$	18.56	$Pr^{3+}$	16.3	$VO^+$	15.5
$Co^{2+}$	16.45	$In^{3+}$	24.9	$Ra^{2+}$	7.4	$VO^{2+}$	18.7
$Co^{3+}$	41.4	$K^+$	0.8	$Sc^{3+}$	23.1	$Y^{3+}$	18.08
$Cr^{2+}$	13.6	$La^{3+}$	15.36	$Sm^{3+}$	17.06	$Yb^{3+}$	19.49
$Cr^{3+}$	23.4	$Li^+$	2.95	$Sn^{2+}$	18.3	$Zn^{2+}$	16.5
$Cu^{2+}$	18.78	$Lu^{3+}$	19.74	$Sr^{2+}$	8.72	$Zr^{4+}$	29.3
$Dy^{3+}$	18.3	$Mg^{2+}$	8.79	$Tb^{3+}$	17.87		
$Er^{3+}$	18.89	$Mn^{2+}$	13.89	$Th^{4+}$	23.2		

<sup>11</sup>Um quelato é um complexo que resulta do estabelecimento de várias ligações metal-ligando (M-L) que se estabelecem em simultâneo formando complexos poli-coordenados com apenas um ligando. Se se pensar que o metal está inicialmente coordenado com águas, no termo dos reagentes teremos 2 espécies a dar origem a um maior número de espécies em solução o que se traduz num aumento da entropia do sistema.



Da tabela (2.2) verifica-se também que quanto maior o estado de oxidação do catião tanto maior é a estabilidade do complexo formado.

### 2.1.5 Composição do sistema

Tanto a suspensão que se pretende avaliar como o procedimento analítico envolve alguns constituintes químicos que importa aqui rever um pouco no sentido de avaliar até que ponto estes podem ou não interferir com o ensaio em questão.

#### 2.1.5.1 Hexametilenotetramina

A hexametilenotetramina é uma substância muito versátil, com aplicações variadas. O seu principal uso é na produção de resinas fenólicas, onde é adicionado como um componente de endurecimento, é usado também no fabrico de adesivos, revestimentos, fixador de corantes, na vulcanização da borracha e como um agente anti-corrosivo em aço [9].

O seu uso em titulações complexométrias é já bastante conhecido [3, 10, 11], este composto é usado como agente tamponizante, fixando o pH do meio numa gama muito restrita, ou seja o pH do meio sofre pouca oscilação, proporcionando assim condições favoráveis à formação do complexo metal-ligando, uma vez que já foi referido que este tipo de reacções está dependente do pH [12, 13].

#### 2.1.5.2 Indicador

O alaranjado de xilenol é um indicador usado em titulações complexométricas. A escolha do indicador é feita consoante a janela de pH do meio e com a afinidade para formar ligação com o metal, ou seja, este passo só ocorre quando o metal, neste caso o  $Pb^{2+}$ , está em excesso e dá-se a ligação do metal com o indicador levando à mudança de cor, o alaranjado de xilenol muda de amarelo para vermelho, quando se liga ao ião metal, a pH 5.5, e é uma mudança de cor fácil de observar.

Na figura (2.6) encontra-se representada a estrutura do xilenol bem como se encontram indicados alguns dos valores mais relevantes referentes ao seu comportamento ácido-base em solução aquosa.

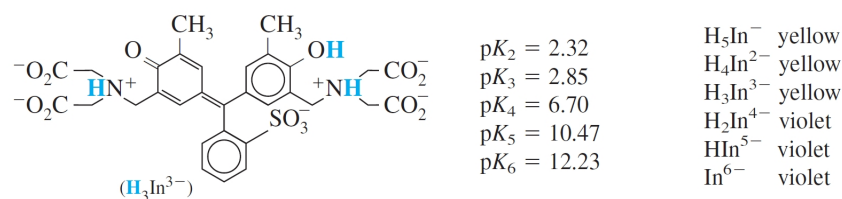


Figura 2.6: Estrutura química do indicador alaranjado de xilenol com indicação dos valores de  $pK_a$  mais relevantes e respectiva cor do indicador em meio aquoso [7].

Deve-se ter em conta também que o quociente entre a constante de formação do complexo metal-EDTA e a constante de formação do complexo metal-indicador deve ser elevado ( $> 10^4$ ), ou seja, a formação do complexo metal-EDTA deve ocorrer em primeiro lugar e só depois deve ocorrer a formação do

complexo metal-indicador. Por outro lado a constante de formação do complexo metal-indicador não deve ser demasiado baixa, isto é, o quociente entre a concentração do indicador e a concentração do metal deve ser o mais baixo possível ( $< 10^{-2}$ ), pois pode levar a uma má percepção do ponto de equivalência [3].

## 2.2 Tratamento de resultados

De seguida vamos resumir alguns assuntos fundamentais referentes ao tratamento de resultados e suporte estatístico para a tomada de decisão.

### 2.2.1 Testes estatísticos

Toda a análise estatística de resultados parte de um certo conjunto de pressupostos essenciais que condicionam drasticamente os resultados e convém por isso enunciar: *a)* ausência de erro sistemático, *b)* erro aleatório com distribuição normal e *c)* erro não correlacionado [14, 15].

#### 2.2.1.1 Nível de confiança e nível de significância

Ainda que a estimativa central esteja correcta<sup>12</sup>, devido à componente aleatória intrinsecamente envolvida na quantificação, há sempre uma certa margem de possibilidade de se cometer um erro de juízo na avaliação estatística de hipóteses já que trata-se de um evento binomial onde existe uma hipótese inicial ( $H_0$ ) e uma hipótese alternativa ( $H_1$ ) que lhe é complementar,

$$p[H_0] + p[H_1] = 1 \quad (2.23)$$

Dado que a hipótese nula ( $H_0$ ) é concebida no sentido da igualdade, esta será aceite por defeito, se não for demonstrada a sua falsidade. Assim sendo, três situações distintas podem ocorrer no que diz respeito à decisão estatística sobre a validade das hipóteses em estudo, ver tabela 2.3.

Tabela 2.3: Teste estatístico de hipóteses: tipos de erros que podem ocorrer na tomada de decisão.

realidade decisão tomada	$H_0 = V$ ( $H_1 = F$ )	$H_0 = F$ ( $H_1 = V$ )
aceitar $H_0$	$\checkmark$ ( $1 - \alpha$ )	erro do tipo II ( $\beta$ ) (aceitação abusiva)
aceitar $H_1$	erro do tipo I ( $\alpha$ ) (rejeição abusiva)	$\checkmark$ ( $1 - \beta$ )

Desta tabela conclui-se que existem duas situações correctas e duas anómalas.

Nas situações correctas a decisão tomada está em conformidade com a realidade enquanto que nas situações de erro a decisão tomada é antagónica.

Assim, os erros estatísticos cometidos podem ser de dois tipos:

*a)* **erro por excesso** - refere-se a uma falsa rejeição (rejeição abusiva da hipótese quando esta deveria ter sido aceite). Este erro chama-se de erro do

<sup>12</sup>Estimativa concordante com o valor correcto.

tipo I ( $\alpha$ ) - a hipótese nula estava correcta e foi abusivamente rejeitada por ter sido considerada falsa;

*b) erro por defeito* - refere-se a uma falsa aceitação (aceitação abusiva da hipótese que estava incorrecta). Este erro designa-se por erro do tipo II ( $\beta$ ) - a hipótese nula estava errada e foi abusivamente aceite como verdadeira.

Por uma questão de segurança estatística, é preferível cometer um erro por rejeição abusiva (erro do tipo I) do que um erro devido a uma aceitação abusiva (erro do tipo II).

A probabilidade máxima com que se pretende proceder à rejeição abusiva (erro do tipo I) é designada de nível de significância do teste e é designada de  $\alpha$  (geralmente indicado em termos percentuais por  $100\alpha\%$ ). A probabilidade de aceitação da hipótese correcta designa-se de nível de confiança e corresponde à probabilidade de  $(1 - \alpha)$  (expressa em termos percentuais por  $100(1 - \alpha)\%$ ).

Chama-se de valor de prova a probabilidade de aceitação da hipótese nula,  $p[H_0]$ .

Na formulação de hipóteses estatísticas, a hipótese nula (inicial,  $H_0$ ) vai no sentido de não haver diferença significativa: no sentido de pertencer ao grosso da distribuição também designado de  $(1 - \alpha)$ ; a hipótese alternativa ( $H_1$ ) visa essencialmente a diferença significativa ( $\alpha$ ): o complemento da hipótese nula.

### 2.2.1.2 Procedimento

Os testes estatísticos servem para, com critérios estatísticos, auxiliar a tomar decisões na interpretação dos resultados. Os testes estatísticos devem ser efectuados com base numa certa sequência lógica de procedimento.

**Formulação do problema** Em primeiro lugar deve-se efectuar uma análise do evento por forma a racionalizar a questão e poder testar. Procura-se deste modo traduzir a questão experimental para a lógica estatística: o que é que se pretende provar?

**Escolha do teste** Com base no que se pretende verificar, o teste é escolhido atendendo à distribuição estatística que melhor se adequa a este tipo de teste. As distribuições estatísticas mais comuns para efectuar testes estatísticos são a normal,  $t$ -student,  $F$ -Fisher e qui-quadrado.

**Estabelecimento do nível de significância** Antes de mais, previamente te que ser estabelecido o nível de significância com que se pretende tirar conclusões - prever qual o erro máximo admissível para se tirar conclusões erradas por rejeição abusiva ( $\alpha$ ).

Regra geral o nível de significância refere-se a  $\alpha = 0.05$  podendo também ser baixado para  $\alpha = 0.01$  para serem tiradas conclusões mais definitivas, como no caso de testes que impliquem decisões críticas, tais como escolher o melhor modelo de calibração ou retirar pontos da curva de calibração, o nível de significância de referência é o valor  $\alpha = 0.01$ .

**Hipóteses de trabalho** As hipóteses colocadas devem ser antagónicas e disjuntas (não sobreponíveis) por forma a abranger o universo do evento.

A hipótese nula ( $H_0$ ) deve ser formulada no sentido de não haver diferença (está tudo correcto); a hipótese alternativa ( $H_1$ ) incide sobre a diferença significativa (procura demonstrar a não conformidade) e é estabelecida de forma a abranger o universo complementar da hipótese nula.

**Simetria do teste** Um vez que a hipótese nula vai sempre no sentido da igualdade, a simetria do teste a efectuar depende da hipótese alternativa formulada. Se o que se pretende é um teste de desigualdade ( $H_1 : x_i > x_j$ ) apenas se está interessado em comparar a sobreposição unilateral de caudas (valores extremos) das duas distribuições o que corresponde a um teste unilateral. Se o que se pretende é um teste de igualdade ( $H_0 : x_1 \simeq x_2$ ), está-se interessado em comparar a sobreposição central do corpo das distribuições (valores interiores, intervalo de confiança) o que irá corresponder a um teste bilateral (as áreas de rejeição situam-se nas duas zonas extremas à distribuição).

**Cálculo do teste** O valor experimental da função discriminante,  $TV$  (parâmetro estatístico) é calculado com base na expressão da distribuição estatística subjacente. Em geral os testes estatísticos baseiam-se nas distribuições  $t$ -student,  $F$  de Fisher e  $\chi^2$ .

**Comparação com valores críticos** Os valores críticos estão tabelados de acordo com o nível de significância e com o número de graus de liberdade. Estes valores permitem definir as regiões de aceitação e de rejeição das hipóteses formuladas.

Sempre que possível deve-se estimar o respectivo valor de prova,  $p[H_0]$ , no sentido de confirmar a conclusão anteriormente assumida.

**Conclusão** No caso do valor experimental exceder os limites tabelados (entrar na região de rejeição) diz-se que ao nível de confiança  $100(1 - \alpha)\%$  há diferença significativa e a hipótese inicial deve ser rejeitada em detrimento da hipótese alternativa (complementar); caso contrário, não há evidência estatística significativa para rejeitar a hipótese nula.

As normas ISO referentes à qualidade recomendam testes de significância aos níveis de 5% ( $\alpha = 0.05$ , probabilidade de efectuar 1 insucesso em cada 20 decisões) e 1% ( $\alpha = 0.01$ , probabilidade de taxa de insucesso de 1/100).

Assim, três situações podem ser obtidas,

$$\left\{ \begin{array}{ll} TV \leq X_{0.05(\nu)} & \implies \text{H0 aceite} \\ X_{0.05(\nu)} < TV \leq X_{0.01(\nu)} & \implies \text{H0 dúbia} \\ TV > X_{0.01(\nu)} & \implies \text{H1 aceite} \end{array} \right. \quad (2.24)$$

### 2.2.1.3 Testes baseados nas distribuições estatísticas

As distribuições estatísticas ( $t$ -student,  $F$  e  $\chi^2$ ) estão muito relacionadas com o teste de hipóteses já que estas, devido a serem bem caracterizadas, podem ser utilizadas como termo de comparação em diversas situações reais, providenciando os valores críticos necessários.

> **Distribuição  $t$ -student** Quando está em causa a comparação de estimativas de posição, assumindo que se trata de distribuições normais e independentes, calcula-se o valor teste

$$TV = \frac{\bar{x} - \mu}{\sigma_{\bar{x}}} \leq t_{\alpha(n-1)} \quad (2.25)$$

e compara-se este resultado com o valor crítico da distribuição  $t$ -student ao nível de confiança de  $100.(1 - \alpha)\%$ . Se a hipótese nula assumir a igualdade de valores a hipótese alternativa assume a desigualdade,

$$\begin{cases} H_0 : \bar{x} = \mu \\ H_1 : \bar{x} \neq \mu \end{cases} \iff \begin{cases} H_0 : \bar{x} = \mu \\ H_1 : \bar{x} < \mu \vee \bar{x} > \mu \end{cases} \quad (2.26)$$

e consequentemente o valor crítico refere-se à distribuição cumulativa bilateral (hipótese centrada assumindo eventual diferença nos extremos). Caso se procure demonstrar que o valor estimado é superior ao valor correcto, a hipótese nula assume a situação da igualdade (valor inferior ou igual a) enquanto que a hipótese alternativa dá conta desta diferença,

$$\begin{cases} H_0 : \bar{x} \leq \mu \\ H_1 : \bar{x} > \mu \end{cases} \quad \begin{matrix} p[H_0] \sim (1 - \alpha) \\ p[H_1] \sim (\alpha) \end{matrix} \quad (2.27)$$

Os valores críticos correspondem à distribuição cumulativa unilateral (hipótese marginal).

> **Distribuição  $F$  de Fisher** Quando está em causa a comparação de variâncias de distribuições normais aleatórias e independentes, calcula-se o valor teste

$$TV = \frac{\sigma_1^2}{\sigma_2^2} \quad (2.28)$$

que, no caso de distribuições normais e independentes, deve seguir uma distribuição de Fisher. Como hipóteses assume-se como hipótese inicial ( $H_0$ ) que não há diferença significativa entre as variâncias (diferença puramente aleatória),

$$\begin{cases} H_0 : \sigma_1^2 = \sigma_2^2 \\ H_1 : \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2 \end{cases} \iff \begin{cases} H_0 : \sigma_1^2 = \sigma_2^2 \\ H_1 : \sigma_1^2 < \sigma_2^2 \vee \sigma_1^2 > \sigma_2^2 \end{cases} \quad (2.29)$$

o que corresponde a efectuar um teste bilateral para o quociente das variâncias. A hipótese nula ( $H_0$ ) assume que não há diferença significativa entre variâncias e a hipótese alternativa ( $H_1$ ) assume que se houver diferença significativa, a variância do numerador excede a do denominador.

O teste  $F$  também pode ser efectuado de forma diferencial, também conhecido como teste de Mandel [16, 17]. Este processo consiste em comparar a alteração da variabilidade ( $\Delta\sigma^2 = \Delta SS/\Delta\nu$ ), o aumento da variabilidade resultante de uma diminuição do número de graus de liberdade, ( $\nu_1 - \nu_2 > 0$ ) com uma estimativa puramente aleatória da dispersão ( $\sigma_{pe}^2 = \sigma_2^2$ )

$$TV = \frac{\Delta\sigma^2}{\sigma_{pe}^2} = \frac{\Delta SS/\Delta\nu}{\sigma_{pe}^2} = \frac{(\nu_1 \times \sigma_1^2 - \nu_2 \times \sigma_2^2)/(\nu_1 - \nu_2)}{\sigma_2^2} \quad (2.30)$$

Como hipóteses considera-se  $H_0$ : os objectos/parâmetros removidos não afectam significativamente a variância da população<sup>13</sup> caso contrário  $H_1$ : estes afectam significativamente a variabilidade final<sup>14</sup>.

> **Distribuição qui-quadrado** Neste caso o valor teste a calcular pode assumir uma das três expressões seguintes, que estão relacionados com a distribuição qui-quadrado e que facultam diferentes tipos de abordagens,

$$TV = \begin{cases} \sum_i^N z_i^2 = \sum_i^N \left(\frac{x_i - \mu}{\sigma}\right)^2 & \leftrightarrow \text{normalidade (qualidade do ajuste)} \\ \frac{(n-1) \times s^2}{\sigma^2} & \leftrightarrow \text{intervalos de confiança (variância)} \\ \sum_i^N \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i} & \leftrightarrow \text{comparação directa (frequências)} \end{cases} \quad (2.31)$$

sendo a primeira opção utilizada na avaliação da normalidade das distribuições.

#### 2.2.1.4 Outros testes

Há diversos testes que não se baseiam nas distribuições estatísticas anteriores mas nem por isso deixam de ser relevantes para a avaliação estatística e tomada de decisão ao nível do controlo da qualidade.

> **Teste de Grubbs** Dado que as estimativas paramétricas são sensíveis a valores “contaminados”, estes valores “outliers” produzem em geral erros de estimativa quer na posição (enviesamento) quer na dispersão (inflacção da imprecisão) afectando deste modo tanto a exactidão como a dispersão.

O teste de Grubbs [18, 19] é recomendado pela IUPAC, ISO 17025 e ASTM E-178. Um determinado valor pode ser considerado discrepante se a sua distância à estimativa central exceder um valor múltiplo do desvio padrão global. Como  $H_0$  assume-se que o valor em causa ( $x_?$ ) não difere significativamente da estimativa central. O valor a calcular é,

$$TV(G) = \frac{\max |x_i - \bar{x}|}{s_x} = \frac{|x_? - \bar{x}|}{s_x} \quad (2.32)$$

em que  $\bar{x}$  é a média e  $s_x$  o desvio padrão dos  $N$  valores experimentais (incluindo o valor em causa,  $x_?$ ).

Este valor só é excluído se exceder o valor crítico tabelado referente a 95% de confiança e para  $n$  valores experimentais, tabela A.1.

> **Teste de simetria e curtose** Uma vez que a estatística paramétrica convencional está baseada na presunção de que os valores aproximam-se de uma distribuição normal, é de todo conveniente avaliar esta hipótese já que pode comprometer a representatividade da estimativa em termos de posição do valor

<sup>13</sup>Se se tratar de objectos, estes pertencem à distribuição (não são outliers), se se tratar de parâmetros do modelo, estes são supérfluos (não melhoram significativamente a qualidade do ajuste).

<sup>14</sup>No caso de objectos, estes podem ser outliers um vez que a sua remoção diminui drasticamente a variabilidade final; no caso de parâmetros, estes são considerados importantes dado que melhoram significativamente a qualidade do ajuste.

central (mais provável) bem como do respectivo intervalo de valores (assimetria da distribuição).

O perfil da distribuição normal é testado calculando o valor

$$TV(SC) = \left( \frac{a_3}{\sigma(a_3)} \right)^2 + \left( \frac{a_4}{\sigma(a_4)} \right)^2 \quad (2.33)$$

onde  $a_3$  e  $a_4$  representam as estimativas de simetria e de curtose da distribuição e

$$\sigma^2(a_3) \simeq \frac{6(N-2)}{(N+1)(N+3)} \quad (2.34)$$

$$\sigma^2(a_4) \simeq \frac{4N(N-3) \times \sigma^2(a_3)}{(N+1)(N+5)} \quad (2.35)$$

representam as respectivas variâncias.

A amostra em causa terá um perfil normal se o valor obtido ( $TV(SC)$ ) não exceder o valor crítico previsto pela distribuição qui-quadrado ( $\chi_{\alpha(2)}^2$ ), com dois graus de liberdade, referente ao nível de confiança de  $100(1-\alpha)$ .

> **Teste de Cochran** Este teste permite verificar se uma determinada variância máxima ( $s_{max}^2$ ) (eventual outlier de dispersão) excede estatisticamente os valores de um conjunto de variâncias populacionais. Como hipótese inicial assume-se que não há diferença estatística entre variâncias

$$\begin{cases} H_0 : & s_{max}^2 \leq s_i^2 \\ H_1 : & s_{max}^2 > s_i^2 \end{cases} \quad (2.36)$$

e calcula-se o valor experimental,

$$TV(C) = \frac{s_{max}^2}{\sum_{i=1}^n s_i^2} \quad (2.37)$$

que não deve exceder o valor crítico tabelado a 95% de confiança referente a  $N$  variâncias calculadas com base em  $M$  réplicas, tabela A.2.

> **ANOVA** A análise de variância (ANOVA) é uma ferramenta estatística importante para distinguir as diversas contribuições sobre a variância total observada ( $\sigma_T^2$ ). Permite distinguir dentro da variabilidade total de diversos conjuntos de valores experimentais as contribuições puramente aleatória ( $\sigma_0^2$ ) e contribuições sistemáticas entre amostras ( $\sigma_A^2$ ).

A ANOVA de factor único baseia-se na decomposição da dispersão total ( $SS_T$ ) em duas parcelas: a dispersão interna ou puramente aleatória ( $SS_0$ )<sup>15</sup> e a dispersão causada pelo efeito em estudo ( $SS_A$ )<sup>16</sup>

$$SS_T = SS_0 + SS_A \quad (2.38)$$

em que  $SS$  significa soma de quadrados.

<sup>15</sup>Esta dispersão traduz a variabilidade não explicada pelo factor.

<sup>16</sup>Relacionada com a variabilidade explicada pelo efeito do factor.

No caso de haver  $m_i$  réplicas em cada nível de factor, a variância interna de cada nível (variabilidade dentro das amostras) é estimada através de,

$$s_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{m_i} (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{(m_i - 1)} \quad (2.39)$$

em que  $\bar{x}_i$  representa o valor médio desse nível.

A variância dentro dos  $N$  grupos (variabilidade interna média dos diferentes níveis do factor) é dada pelo somatório das variâncias internas de todos os grupos,

$$s_0^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N s_i^2 = \frac{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^{m_i} (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{\sum_{i=1}^N (m_i) - N} \quad (2.40)$$

No caso de o número de réplicas ser idêntico em cada nível do factor em estudo, ( $m_i = M$ ),

$$s_0^2 = \frac{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{N(M - 1)} \quad (2.41)$$

A variância entre amostras (entre os diferentes níveis do factor  $A$ ) é dada pela dispersão das médias de cada um dos níveis  $\bar{x}_i$  em relação à media global  $\bar{x}$ ,

$$s_A^2 = \frac{\sum_{i=1}^N m_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2}{(N - 1)} \quad (2.42)$$

No caso de o número de réplicas ser idêntico, ( $m_i = M$ ),

$$s_A^2 = \frac{M \cdot \sum_{i=1}^N (\bar{x}_i - \bar{x})^2}{(N - 1)} \quad (2.43)$$

Se o factor em estudo (factor  $A$ ) não influi de modo significativo, ambas as dispersões (dentro dos níveis e entre níveis do factor) são estimativas da variância da componente aleatória. Quando o factor influi de modo significativo, a dispersão devida ao factor  $A$  ( $s_A$ ) torna-se maior que a componente puramente aleatória ( $s_0$ ).

As hipóteses estatísticas formuladas são:

$$\begin{cases} H_0 : & s_A^2 \leq s_0^2 \\ H_1 : & s_A^2 > s_0^2 \end{cases} \quad (2.44)$$

Deste modo, pode ser calculado o teste  $F$  para comparar as dispersões,

$$TV = \frac{s_A^2}{s_0^2} \leq F_{\alpha(N-1, N(M-1))}^u \quad (2.45)$$

## 2.2.2 Calibração e quantificação

A estimativa do teor do analito na amostra faz-se, regra geral, através de um método comparativo - procura-se inicialmente descrever a função de resposta do método analítico ao analito através de uma função matemática designada de modelo.



Em termos instrumentais e metrológicos<sup>17</sup>, designa-se de calibração a operação de verificação e ajuste do sinal instrumental de modo a que o valor reportado pelo equipamento corresponda a uma determinada unidade definida no sistema internacional de unidades (SI).

No laboratório, usualmente recorre-se a este termo para definir a função que relaciona a concentração de padrões<sup>18</sup> e o sinal instrumental gerado pelo detector do equipamento.

Em termos numéricos a calibração consiste em definir uma função de resposta ( $f(x_i; b_j)$ ) capaz de descrever a dependência do sinal instrumental ( $y_i$ ) da variável independente (concentração,  $x_i$ ) manifestada através de alguns parâmetros ( $b_j$ ) de modo minimizar o erro do modelo ( $e_i$ ),

$$e_i = y_i - f(x_i; b_j) \quad (2.46)$$

O erro total do ajuste do modelo de calibração ( $SS$ ) pode ser estimado com base em

$$SS = \sum_{i=1}^N (e_i)^2 = \sum_{i=1}^N (y_i - f(x_i; b_j))^2 \quad (2.47)$$

Como modelos de funções de resposta ( $f(x_i; b_j)$ ) regra geral usa-se polinómios de baixo grau (1º ou 2º graus) de forma a conseguir traduzir, de modo computacionalmente facilitado<sup>19</sup>, a resposta instrumental.

Diferentes estratégias podem ser seguidas de forma a minimizar o erro do ajuste, eq.(2.47), de entre as quais se consideram a a) a estimativa robusta e b) a estimativa por mínimos quadrados.

No primeiro caso, a estimativa robusta [20], os parâmetros do modelo são estimados separadamente com base em derivadas numéricas (desde o grau igual ao polinómio até ao grau zero) usando a mediana<sup>20</sup> como método de estimativa robusta. Contudo, esta abordagem não tem suporte estatístico (via modelo de erro) mas terá tanto mais significado quanto maior for a dimensão da amostra considerada ( $N \sim \infty$ ).

Já no segundo caso, a estimativa por mínimos quadrados, implica uma estimativa paramétrica baseada em todos os  $N$  valores experimentais ( $N < 20$ ). Este facto confere alguma vulnerabilidade deste tipo de abordagem já que, a presença de valores discrepantes (anómalos ou “outliers”) frequentemente produz erros sistemáticos<sup>21</sup> nas estimativas de posição e inflação das estimativas de incerteza obtidas por esta via.

<sup>17</sup>A metrologia refere-se à ciência que lida com a quantificação e estimativa de valores.

<sup>18</sup>Soluções padrão são soluções que contêm um teor bem conhecido de determinado analito.

<sup>19</sup>As funções polinomiais permitem descrever, de modo simples, uma resposta que linear ou inclusivamente com determinada curvatura. A maior vantagem deste tipo de funções é que os seus parâmetros são linearmente dependentes e que, por este facto, as derivadas parciais do modelo em função aos respectivos parâmetros são independentes destes o que permite estimar com todo rigor os parâmetros do modelo directamente, através de operações matriciais e sem recurso a métodos iterativos de aproximação.

<sup>20</sup>A mediana corresponde ao percentil 50%. este facto confere-lhe uma elevada robustez já que o seu ponto de quebra está muito próximo de 50% (ligeiramente a baixo deste valor).

<sup>21</sup>Enviesamento do valor estimado em relação ao valor correcto.

Foi anteriormente referido que as funções mais convenientes para utilizar como modelo de calibração são polinómios de baixo grau. No caso de ser um polinómio de primeiro grau ( $P_{01}$ )

$$P_{01} : f(x_i; b_0, b_1) = b_0 + b_1 \cdot x_i \quad (2.48)$$

ou de segundo grau ( $P_{012}$ )

$$P_{012} : f(x_i; b_0, b_1, b_2) = b_0 + b_1 \cdot x_i + b_2 \cdot x_i^2 \quad (2.49)$$

a estimativa média de erro do modelo

$$\sigma_{fit} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - f(x_i; b_j))^2}{(N - p)}} \quad (2.50)$$

é muitas vezes utilizada para estimar incertezas quer na estimativa do teor do analito quer na estimativa dos limiares analíticos do método.

Como iremos ver de seguida, há diferentes estratégias analíticas que permitem estabelecer a relação entre o teor do analito e o respectivo sinal instrumental gerado.

### 2.2.2.1 Curva de calibração

A forma mais usual de se executar a calibração de um instrumento é através da curva analítica (ou curva de calibração). Este processo consiste em preparar padrões com concentrações bem conhecidas do analito e matriz (veículo de suporte onde coexiste o analito) o mais próximo da realidade da amostra em estudo. Estas soluções são introduzidas no equipamento e o respectivo sinal instrumental gerado é registado.

Se se considerar uma grande amplitude de concentrações, regra geral, a resposta analítica apresenta um certo encurvamento, ver figura (2.7).

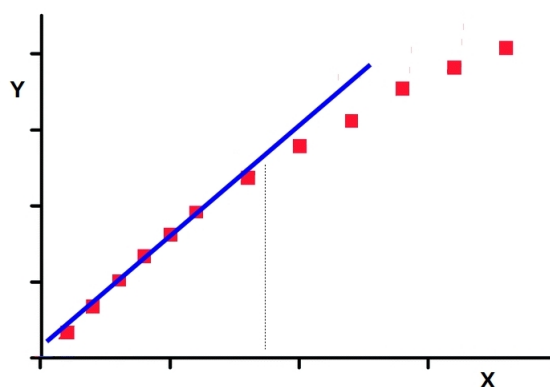


Figura 2.7: Curva de calibração exemplificativa da perda de linearidade da resposta instrumental (Y) em função do teor de analito (X): a curva a azul sobreposta representa uma dependência linear ( $P_{01}$ ) e o tracejado vertical delimita a região de resposta linear.

Nestes casos, o modelo de calibração mais adequado deve ser por isso um polinómio de segundo grau ( $P_{012}$ , eq.(2.49)). Contudo, este modelo conduz a estimativas paramétricas difíceis de implementar.

A solução mais conveniente passa quase sempre por restringir a gama analítica a uma zona de resposta mais linear, ver figura (2.7). Deste modo as estimativas paramétricas são muito mais convenientes e fáceis de calcular.

Através de métodos numéricos diversos procura-se definir uma função que descreva a dependência da resposta instrumental em função da concentração do analito contido nos padrões, ver figura (2.8).

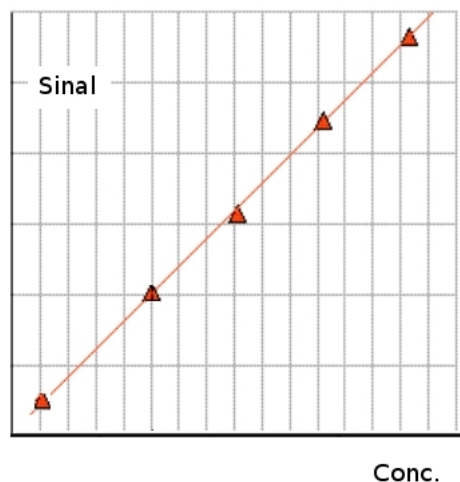


Figura 2.8: Esquema simplificado de exemplificação de uma curva de calibração: os valores experimentais (triângulos a vermelho) representam as leituras instrumentais (sinal) em função da respectiva concentração; a linha contínua traduz a função de calibração que relaciona o sinal instrumental com a concentração do analito em causa.

No sentido de facilitar a quantificação do teor do analito nas amostras, na calibração pretende-se estabelecer uma relação linear entre concentração do analito e o respectivo sinal de resposta do equipamento.

Neste caso os cromatogramas para os padrões são obtidos, e as áreas são utilizadas para a obtenção de um gráfico em função da concentração para se obter a curva analítica. Este gráfico deve obter uma reta que passe pela origem que depois irá servir para a obtenção dos valores para a análise quantitativa. A calibração deve ser frequente para maior exatidão [21].

Uma vez definida a calibração do equipamento com uma função  $P_{01}$ , eq.(2.48), pode-se agora fazer a quantificação do analito utilizando-se para o efeito a função inversa da calibração - com base no sinal instrumental obtido ( $\bar{Y}_A$ ) com a amostra pretende-se estimar o teor do analito ( $X_A$ ) presente através de

$$X_A = \frac{\bar{Y}_A - b_0}{b_1} \quad (2.51)$$

e a respectiva incerteza (erro padrão,  $\sigma(X_A)$ ) estimada através de

$$\sigma(X_A) = \frac{\sigma_{fit}}{b_1} \cdot \sqrt{\frac{1}{M} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{Y}_A - \bar{y}_C)^2}{b_1^2 \cdot \sum (x_i - \bar{x}_C)^2}} \quad (2.52)$$

onde  $\bar{Y}_A$  é o valor médio do sinal da amostra (obtido através de  $M$  réplicas) e  $(\bar{x}_C, \bar{y}_C)$  são as coordenadas do centróide<sup>22</sup> da curva de calibração.

Uma vez obtidas as estimativas paramétricas do teor e respectiva incerteza, equações (2.51) e (2.52), após a respectiva correcção ao factor de diluição, utiliza-se os valores da distribuição *t-student* bilateral ao nível de significância  $\alpha = 0.05$  com  $(N - 2)$  graus de liberdade para estimar os respectivos intervalos de confiança a 95%.

## 2.3 Validação de métodos

A validação consiste em demonstrar que determinado procedimento está conforme o pretendido e que este é fiável e duradouro.

No caso de métodos analíticos, validar significa demonstrar que todo o método analítico é adequado para a quantificação de um determinado analito numa certa matriz a um certo nível de concentração [22, 23].

### 2.3.1 Definições

Antes de mais é de todo conveniente definir alguma nomenclatura específica aos métodos analíticos de modo a facultar o pleno entendimento destes assuntos. Sem pretender ser exaustivo vejamos alguns dos conceitos mais relevantes:

**Analito** Chama-se de analito a entidade físico-química do sistema que se pretende avaliar - identificar a sua presença e, se possível isolar e/ou quantificar.

**Amostra** Fração do universo que se pretende caracterizar.

**Amostra cega** Amostra simulada em laboratório que vai ser processada em conjunto com as restantes amostras ou padrões. no caso do analista conhecer previamente o teor do analito presente a amostra designa-se de “amostra cega de ordem 0”; se houver um preparador que fez a amostra e a deu a quantificar ao analista (que desconhece esse valor) designa-se de “amostra cega de ordem 1”; no caso de haver um supervisor que controla o trabalho independente do preparador e do analista designa-se agora de “amostra cega de ordem 2”.

**Representatividade da amostra** Na impossibilidade de utilizar todo o sistema (universo em estudo) para a análise a efectuar, pretende-se que a amostra colhida seja o máximo representativa ou seja, que as propriedades que se pretendem avaliar sejam equivalentes ao sistema original. Diversas estratégias podem ser utilizadas de forma a maximizar este objectivo tais como a *a)* homogeneização prévia (antes de remover a amostra procura-se uniformizar a composição do sistema em estudo), *b)* replicagem (colheita de diversas amostras do mesmo sistema) e *c)* amostragem composta (remoção de várias amostras e subsequente homogeneização para a produção de uma amálgama final).

<sup>22</sup>Estas coordenadas correspondem aos valores médios obtidos para o sinal ( $\bar{y} = \sum y_i/N$ ) e concentração ( $\bar{x} = \sum x_i/N$ ).

**Método analítico** Conjunto de técnicas e procedimentos devidamente planejados e consertados de forma a permitir resolver uma determinada questão analítica. Regra geral procura-se responder a questões do tipo: o analito está presente na amostra?, qual a sua concentração?, cumpre as especificações?, etc.

**Estimativa** Estimativa ou resultado analítico é aquilo que se obtêm como resposta do método analítico utilizado. Pode uma grandeza qualitativa (ex: resposta do tipo presente / ausente) ou quantitativa (ex: indicação de um parâmetro representativo do valor obtido pelo método).

**Estimativa não paramétrica** Também conhecida como estimativa robusta, consiste num valor numérico que traduz uma determinada propriedade cuja forma de cálculo não envolve operações numéricas complicadas. Como exemplos podemos ter os percentis que traduzem o valor obtido com uma determinada probabilidade de ocorrência.

**Estimativa paramétrica** São valores numéricos (parâmetros) obtidos através de operações numéricas. Implicam o recurso a um modelo e a estimativa envolve todos os valores experimentais.

**Repetições** Estimativas obtidas em igualdade de circunstâncias operacionais no menor espaço de tempo possível - implica realizar análises consecutivas (ou em paralelo) sobre a mesma amostra, usando o mesmo método e equipamento (ou similar em caso de testes em paralelo), no mesmo laboratório, pelo mesmo analista, no menor intervalo de tempo possível (ou em simultâneo, no caso de testes simultâneos).

**Réplicas** Trata-se de ensaios independentes, usando o mesmo método e condições similares de análise, sobre amostras independentes, representativas do mesmo sistema.

**Distribuição** Representação do conjunto de valores experimentais, obtidos quer por repetição quer por replicagem da amostra, que traduzem a frequência ou probabilidade de ocorrência em função dos valores obtidos.

**Posição** Resultado representativo da estimativa central da distribuição ( $\mu$ ); indica o valor mais provável obtido pelo conjunto de ensaios. Pode ser estimada por via paramétrica (ex: média,  $\bar{x}$ ) ou por via robusta (ex: moda ( $\tilde{x}$ ), mediana ( $\hat{x}$ )).

**Dispersão** Resultado representativo do afastamento relativo dos valores experimentais em relação à tendência central representada pela estimativa de posição.

**Valor exacto** Valor real, considerado como verdadeiro ou de referência ( $\tau$ ).

**Exactidão** Proximidade do resultado ou estimativa obtida em relação ao valor real. Pode ser estimada em termos absolutos (erro ou desvio) ou relativos (erro relativo).

**Erro ou desvio** Diferença entre o valor estimado e o valor exacto. Esta diferença pode ser indicada em termos de erro absoluto ( $\Delta = \mu - \tau$ ). Este valor possui a mesma dimensão que a propriedade a ser quantificada e pode apresentar valor negativo significando neste caso estimativa por defeito.

**Erro relativo** Estimativa adimensional do desvio. É calculado em termos relativos considerando a estimativa central como valor de referência ( $RE = \Delta/\mu$ ). O seu valor em termos percentuais ( $\%RE = 100\Delta/\mu$ ) é mais conveniente porque permite dar uma noção rápida da sua ordem de grandeza.

**Desvio padrão** Estimativa paramétrica da dispersão; traduz a dispersão aleatória de valores em torno da sua estimativa central,  $s_x$ .

**Erro padrão** Desvio padrão de uma estimativa paramétrica (parâmetro do modelo); no caso da média corresponde ao valor do desvio padrão da média,  $s_{\bar{x}}$ .

**Erro aleatório** Dispersão de valores inerente a diversos factores não controlados e a dificuldades de quantificação (limitações instrumentais). Pode ser representado pela dispersão puramente aleatória ( $s_{pe}$  ou  $\sigma_0$ ).

**Erro sistemático** Evidência analítica de que existe uma diferença significativa entre o resultado experimental e o valor real. O erro sistemático pode ter dois tipos de contribuições - pode ser constante ou proporcional.

**Erro sistemático constante** Desvio constante (aditivo), independente do teor de analito em causa, responsável pelo enviesamento das estimativas em relação ao valor real.

**Erro sistemático proporcional** Desvio que é proporcional ao teor de analito considerado; traduz-se através de um termo multiplicativo em relação ao teor considerado.

**Incerteza** Amplitude de valores dentro dos quais se espera encontrar o valor correcto (estimativa central) com um certo grau de probabilidade. Esta amplitude de erro provável apresenta duas contribuições - erro aleatório e erro sistemático.

**Precisão** Estimativa da proximidade relativa de uma série de valores experimentais. A precisão é avaliada através de estimativas de dispersão - menor dispersão de valores significa maior precisão. A precisão pode ser avaliada por estimativa robusta (ex: percentis,  $X_\alpha$ ) ou paramétrica (ex: desvio padrão)

**Repetibilidade** Estimativa da precisão obtida em condições de repetição ( $s_r$ ) - mesmas condições e no menor intervalo de tempo possível.

**Reprodutibilidade** Estimativa de dispersão estimada à escala global (extra-laboratorial,  $s_R$ ) - traduz a variabilidade máxima do método quando se recorre à comparação de valores para as mesmas amostras, obtidos com o mesmo método, em circunstâncias analíticas equivalentes.

**Precisão intermédia** Estimativa da precisão que não corresponde nem à repetibilidade nem à reprodutibilidade ( $s_I$ ).

**Rastreabilidade** Conjunto de operações de comparação sucessiva que garantem a representatividade de uma determinada propriedade à escala global.

**Padrão** Material que serve de referência como valor representativo de uma propriedade cujo valor é bem conhecido. Um padrão deve possuir um conjunto de características que garantam a sua qualidade e permitam a sua utilização em diferentes locais e instantes - deve ser estável<sup>23</sup>, reprodutível<sup>24</sup> e rastreável<sup>25</sup>.

**Calibração** Operação de verificação e ajuste da resposta instrumental à propriedade físico-química para a qual o equipamento foi concebido. Consiste em garantir que o equipamento garante a rastreabilidade da grandeza que se pretende avaliar<sup>26</sup>.

**Aferição** Operação de avaliação da função de resposta do equipamento em função da medição da propriedade para a qual o equipamento foi previamente calibrado<sup>27</sup>.

**Quantificação** Operação inversa da aferição em que se procura inferir o valor da propriedade obtido com base na função de resposta instrumental (aferição do equipamento)<sup>28</sup>.

**Branco** Amostra simulada que supostamente não contém o analito já que este não foi adicionado à amostra que foi submetida a avaliação.

**Matriz da amostra** Toda a matéria constituinte da amostra que não corresponde ao analito em causa.

**Branco de amostra** Amostra real que supostamente não possui o analito ou que o seu teor está a baixo da capacidade de detecção do equipamento.

---

<sup>23</sup>Não sofrer adulteração e, desse modo, ser capaz de manter as suas características nas dimensões espaço-tempo da realidade em causa.

<sup>24</sup>A propriedade que ele representa pode ser reavaliada em diferentes instantes conduzindo sempre ao mesmo valor.

<sup>25</sup>A propriedade avaliada está directamente relacionada com uma determinada grandeza previamente definida e é representativa desta unidade.

<sup>26</sup>Por exemplo, a calibração de uma balança analítica requer que o valor indicado (resposta do equipamento) corresponda estatisticamente ao valor do padrão utilizado (massa aferida).

<sup>27</sup>Recorrendo ainda ao caso das balanças analíticas, corresponderia a verificar a relação entre o valor nominal da massa aferida utilizada e o valor experimental exibido pelo equipamento (leitor analógico ou digital).

<sup>28</sup>Recorrendo ainda ao caso das balanças analíticas, corresponderia a procurar estimar a massa do corpo em observação com base na leitura obtida e na função de resposta previamente definida para o equipamento a quando da sua aferição.

**Material certificado** Amostra real<sup>29</sup> que possui diversos parâmetros devidamente quantificados e explicitados através do seu certificado de garantia. É um material de elevado potencial analítico que permite avaliar a exactidão de um determinado método analítico já que possui valores referenciados na presença de uma determinada matriz de amostra.

**Teste de hipóteses** Avaliação de um determinado evento que pode ser traduzido pela ocorrência de duas situações distintas e complementares - a hipótese nula ( $H_0$ ) deve ser sempre definida no sentido de que tudo está correcto (situação desejável) e contemplar a situação de igualdade enquanto que a hipótese alternativa ( $H_1$ ) traduz o complemento da hipótese nula em termos do universo do evento em avaliação.

**Teste estatístico** Avaliação da possibilidade de ocorrência de uma determinada condição ou evento (teste de hipóteses) usando como critério de decisão a probabilidade de ocorrência estimada para esse evento.

**Erro do tipo I** Erro de rejeição abusiva da hipótese nula ( $H_0$ ) - erro voluntário de avaliação estatística que está relacionado com a rejeição de  $H_0$  ainda que haja indicação de uma certa probabilidade ( $\alpha$ ) de que ela possa estar correcta. Este tipo de erro está relacionado com os ensaios designados de “falsos positivos” (valores considerados como não-nulos quando de facto são nulos).

**Erro do tipo II** Erro de aceitação abusiva da hipótese alternativa ( $H_1$ ) - erro cometido na avaliação estatística quando se assume que a hipótese alternativa é válida com uma certa probabilidade ( $\beta$ ) de que ela possa estar correcta. Este tipo de erro está associado aos ensaios designados de “falsos negativos” (valores considerados nulos quando na realidade não o são).

**Limite de detecção** Menor quantidade de analito responsável por gerar um sinal instrumental que é estatisticamente superior ao valor do sinal obtido com o branco. O limite de detecção ( $X_{LD}$ ) é estimado assumindo  $\alpha = \beta = 0.05$ .

**Limite de quantificação** Menor quantidade de analito detectada e que pode ser correctamente quantificada com todo o rigor analítico possível. Este limite ( $X_{LQ}$ ) é estimado assumindo  $\alpha = \beta = 0.000$ .

**Recuperação** A recuperação ( $\%RI$ ) traduz o grau de concordância (valor percentual) entre a quantidade estimada (por via analítica) e a quantidade de analito que foi adicionado à amostra ou branco.

### 2.3.2 Parâmetros de desempenho

De acordo com as últimas directivas da União Internacional de Química Pura e Aplicada (International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC)

---

<sup>29</sup>Amostra que possui uma determinada matriz natural ou mimetizada e que se encontra bem caracterizada.



[ref] e a Conferência Internacional sobre Harmonização (International Conference on Harmonisation, ICH) [ref] e as Farmacopeias Europeia (European Pharmacopoeia, EP) e dos Estados Unidos da América (United States Pharmacopoeia, USP) para se validar completamente um método analítico tem-se que demonstrar nove parâmetros: a) identificação, b) especificidade e selectividade, c) sensibilidade, d) limiares analíticos, e) linearidade e gama analítica, f) precisão, g) exactidão, h) a robustez e i) a coerência.

A validação embora possa ser uma actividade algo complexa e exigente, é necessária, pois as consequências de um método não validado traduzem-se num desperdício de tempo, dinheiro e recursos, pois os resultados obtidos não apresentam fiabilidade. A validação é um processo moroso mas vital na garantia de qualidade analítica de um processo analítico desenvolvido.

### 2.3.2.1 Identificação

Na identificação procura-se demonstrar que o método é capaz de identificar inequivocamente a presença do analito bem como a sua ausência.

Trata-se de tomar a decisão analítica correcta demonstrando que o analito está presente ou ausente da matriz evidenciando que a propriedade físico-química em que o método analítico se baseia está directamente relacionada com a presença do analito.

### 2.3.2.2 Especificidade e selectividade

A especificidade avalia a capacidade do princípio físico-químico do método analítico responder exclusivamente ao analito presente na amostra.

Regra geral existirá sempre alguma contribuição, por parte de outros componentes da matriz, para o sinal instrumental utilizado como transdutor do teor do analito na amostra, indo deste modo afectar a exactidão dessa medida. Assim sendo, o método deixa de ser específico e passa a designar-se de selectivo - o seu grau de selectividade é estimado com base no erro sistemático introduzido na resposta analítica.

### 2.3.2.3 Sensibilidade

Traduz a variação da resposta do método à variação do teor do analito. Corresponde ao declive da função de aferição do equipamento de medida, sendo o teor a variável independente (representada nas abcissas) e o sinal instrumental a respectiva variável dependente (representada no eixo das ordenadas).

$$m = \frac{\Delta Y}{\Delta X} \quad (2.53)$$

A sensibilidade ( $m$ ) é, então, definida como o menor incremento de concentração ( $X$ ) necessário para originar uma variação detectável no valor do sinal lido ( $Y$ ) coincidindo esta com o declive da recta de calibração quando se trata do modelo linear.

### 2.3.2.4 Limiares analíticos

Os limiares analíticos traduzem o teor mínimo de analito que pode ser avaliado, em determinadas condições, recorrendo a um certo equipamento e método

analítico. Os limiares analíticos mais relevantes são o limite de detecção ( $X_{LD}$ ) e o limite de quantificação ( $X_{LQ}$ ).

O limite de detecção ( $X_{LD}$ ) corresponde à menor quantidade de analito que é possível detectar com uma certa confiança estatística, mas não necessariamente quantificar. Esta concentração é útil para especificar a presença/ausência do analito da amostra. Em termos qualitativos, o conceito de limite de detecção corresponde à concentração mínima que é possível distinguir do branco.

Estes limiares analíticos podem ser estimados por três métodos distintos:

i) através de réplicas do branco (método recomendado pela IUPAC e ISO):

$$Y_{LD} = \bar{y}_0 + 2 \times t_{0.05(m-1)}^u \times \frac{\sigma_{y_0}}{\sqrt{N}} \quad (2.54)$$

onde se faz uma estimativa através do valor médio do sinal do branco ( $\bar{y}_0$ ), o respectivo desvio padrão ( $\sigma_{y_0}$ ) e usando o teste t-student ao nível de confiança de 95%.

ii) com base nos parâmetros da recta:

$$Y_{LD} = b_0 + 2 \times t_{0.05(N-P)}^u \times \sigma_{b_0} \quad (2.55)$$

recorrendo ao valor de intercepção da recta ( $b_0$ ), a respectiva incerteza ( $\sigma_{b_0}$ ) e aplicando o mesmo teste estatístico da alínea i).

iii) com base no desvio padrão do ajuste:

$$Y_{LD} = 2 \times t_{0.05(N-P)}^u \times \sigma_{fit} \quad (2.56)$$

com base no desvio padrão residual ( $\sigma_{fit}$ ) do ajuste da curva de calibração e usando o teste estatístico t-student a 5% de significância.

Deve-se estimar os limiares analíticos através das réplicas de branco de padrão. Não sendo possível desta forma ou se algum destes limites conduzir a uma concentração sem significado físico deve optar-se por utilizar os parâmetros da recta da calibração. Só em último caso deve ser utilizado o desvio padrão do ajuste para este objectivo. Para reportar o limite de detecção em termos de quantidade de analito basta calcular a função inversa da curva de calibração, como mostra a equação (2.57).

$$X_{LD} = F(Y_{LD}) \quad (2.57)$$

Já o limite de quantificação ( $X_{LQ}$ ) corresponde à menor concentração de analito que é possível quantificar com precisão e exactidão definidas e nas condições de operação especificadas. De uma via semelhante ao cálculo do limite de detecção e recorrendo das equações (2.54), (2.55) e (2.56), pode-se estimar este limiar analítico com base em:

i) réplicas do branco ( $m \geq 10$ )

$$Y_{LQ} = \bar{y}_0 + 6 \times t_{0.05(m-1)}^u \times \frac{\sigma_{\bar{y}_0}}{\sqrt{N}} \quad (2.58)$$

ii) com base nos parâmetros da recta

$$Y_{LQ} = b_0 + 6 \times t_{0.05(N-P)}^u \times \sigma_{b_0} \quad (2.59)$$

iii) com base no desvio padrão do ajuste

$$Y_{LQ} = 6 \times t_{0.05(N-P)}^u \times \sigma_{fit} \quad (2.60)$$

Em termos de quantidade de analito, o processo para reportar o limite de quantificação, basta calcular a função inversa da curva de calibração, ou seja, resolver a equação em ordem à concentração de analito como mostra a equação (2.57), usando as equações (2.58), (2.59) e (2.60) consoante a situação em questão, mas neste caso o resultado representará as estimativa ao nível do limite de quantificação ( $X_{LQ}$ ).

### 2.3.2.5 Linearidade e gama analítica

A gama analítica expressa o intervalo de concentração em que o analito gera uma resposta instrumental que é proporcional ao seu teor. O extremo inferior corresponde ao limite de quantificação ( $X_{LQ}$ ) enquanto que o extremo superior corresponde ao valor do teor do padrão que gera um sinal inequívoco e proporcional<sup>30</sup>. Regra geral a linearidade ou faixa de resposta linear está contida na gama analítica - o limite inferior é coincidente mas o limite superior encontra-se restringido até ao teor de analito que apresenta um sinal directamente relacionado através de um segmento de recta.

Com a calibração pretende-se obter uma relação entre o padrão submetido e o correspondente sinal instrumental.

A curva de calibração correcta deve apresentar os seguintes aspectos:

1. O limite inferior é estimado com base na menor concentração capaz de originar um sinal estatisticamente distinto do branco. Após a determinação do limite de quantificação ( $X_{LQ}$ ) deve-se sempre verificar se o menor padrão ( $X_1$ ) excede esse valor ( $X_1 \geq X_{LQ}$ );
2. Os padrões devem abranger a gama de concentrações das amostras. O ideal é que as amostras se situem próximo do centróide da curva de calibração;
3. A variância dos valores medidos deve ser constante uma vez que a introdução de pesos estatísticos implica um custo adicional no esforço da quantificação;
4. A gama de trabalho do método analítico é definida como amplitude de concentrações usadas para a definição de curva de calibração ( $X_1$  e  $X_N$ ).

A calibração é um processo crítico uma vez que dela depende a qualidade das estimativas da quantificação das amostras em termos de precisão e exactidão. Uma vez excluído o problema do erro sistemático cuja estatística não consegue tratar, tem que se ter em conta três passos fundamentais para obter uma curva de calibração correcta que irá condicionar a qualidade dos resultados estimados. Os três passos fundamentais são: representatividade dos valores na curva de calibração (homogeneidade da variância), escolha do modelo e detecção de eventuais valores discrepantes. A análise da homogeneidade das variâncias para o sinal medido é realizada através do Teste Fisher (F) onde se compara as variâncias nos extremos do intervalo de calibração, através da equação (2.61).

$$TV = \frac{\sigma_1^2}{\sigma_2^2} \quad (2.61)$$

<sup>30</sup>Em termos práticos, o extremo superior da curva de aferição encontra-se definido pelas limitações da saturação do detector ou transdutor do sinal instrumental.

De igual modo as hipóteses de trabalho a considerar são apenas duas: existe homogeneidade da variância ( $H_0$ ) ou não existe homogeneidade da variância ( $H_1$ ). Para a escolha do modelo deve usar-se diagnósticos simples mas com fundamento estatístico, sendo o teste de Mandel geralmente mais usado. O passo inicial deste teste corresponde a ajustar um polinómio de primeiro grau ( $P01$ ), bem como um polinómio de segundo grau ( $P012$ ) e calcular, para cada um deles, as respectivas somas de resíduos quadrados. Pretende verificar-se se o aumento na variância do ajuste causada pela eliminação de um parâmetro é equiparável à variância aleatória [pure error], para realizar tal verificação recorre-se à equação (2.62).

$$TV = \frac{\Delta\sigma^2}{\sigma_{pe}^2} = \frac{\Delta SS/\Delta\nu}{\sigma_{pe}^2} \quad (2.62)$$

Se o valor do teste calculado não exceder o valor tabelado ( $F_{0.01(\Delta\nu, \Delta pe)}$ ), onde  $\Delta\nu$  corresponde aos graus de liberdade que vai ser apenas um e  $\nu_{pe}$  o número de graus de liberdade correspondente à variância aleatória) a hipótese nula é aceite, o que corresponde a dizer que ambos os polinómios (primeiro e segundo graus) ajustam os pontos experimentais de modo similar, concluindo-se que o polinómio de primeiro grau é o mais adequado para curva de calibração, já que apresenta maior número de graus de liberdade. Caso o valor do teste obtido ultrapassa este valor crítico a hipótese nula não seria válida, ou seja, o polinómio de segundo grau conduzia a um melhor ajuste dos valores experimentais da curva de calibração. Mas o tratamento estatístico do polinómio de segundo grau é bastante complexo, para isso e de modo a simplificar o trabalho, deve-se reduzir a gama de trabalho no sentido de se obter uma função de calibração linear.

### 2.3.2.6 Precisão

A precisão traduz a coerência dos resultados obtidos em relação ao valor central estimado. Esta costuma ser estimada em termos de repetibilidade ( $s_r$ ), reprodutibilidade ( $s_R$ ) ou precisão intermédia ( $s_I$ ).

A precisão é considerada como uma das mais importantes características no desempenho de um método, pois gera uma informação directa ou analista do grau de certeza/incerteza dos seus resultados, estabelecendo uma relação entre réplicas da mesma amostra. A precisão avalia a concordância e proximidade dos resultados sucessivos sobre a mesma amostra em condições similares, isto é, corresponde à menor variação entre os resultados de testes independentes obtidos sob determinadas condições.

A repetibilidade avalia a precisão obtida entre ensaios realizados em condições idênticas (mesmo operador, mesma instrumentação, mesmo laboratório), no menor espaço de tempo possível. O resultado é expresso em termos de coeficiente de variação da repetibilidade,  $\%CV_r$ , e em percentagem (2.63).

$$\%CV_r = \frac{s_r}{\bar{x}} \times 100 \quad (2.63)$$

Onde  $s_r$  corresponde ao desvio-padrão da amostra e  $\bar{x}$  diz respeito à respectiva média.

A repetibilidade é dada pelo desvio padrão  $s_r$  associado à média dos resultados assim obtidos. O limite de repetibilidade ( $\Delta r$ ) é o valor máximo permitido

para a diferença absoluta entre dois ensaios obtidos em condições de repetibilidade, calculada para o nível de confiança a 95 %, sendo obtido através da equação 2.64.

$$\Delta r = \sqrt{2} \times t_{0.05(m-1)}^b \times \frac{s_r}{\sqrt{m}} \quad (2.64)$$

A reprodutibilidade corresponde a dispersão de valores obtidos através de ensaios interlaboratoriais, relativamente à mesma amostra, mas com um outro operador e num espaço de tempo diferente do caso mencionado anteriormente. Permite ter uma noção da existência de erros aleatórios.

Tal como viria a acontecer neste estudo, nos casos em que só é possível realizar um estudo da repetibilidade, surge como alternativa a precisão intermédia, esta estimativa pode ser expressa sob a forma de coeficiente de variação ( $\%CV_I$ ), como mostra a equação (2.65).

$$\%CV_I = 100 \times \left( \frac{s_I}{\bar{x}} \right) \quad (2.65)$$

onde  $s_I$  representa a dispersão intermédia (superior à repetibilidade) e  $\bar{x}$  do valor reportado. Tem a vantagem de expressar as variações laboratoriais como algumas condições próximas da reprodutibilidade, ou seja, esta estimativa de dispersão pode ser realizada tanto dentro do laboratório como a nível interlaboratorial, os ensaios são executados em dias diferentes, por operadores diferentes, etc. Consiste, portanto, numa avaliação suplementar da precisão que não pode propriamente ser classificada de repetibilidade ou de reprodutibilidade.

### 2.3.2.7 Exactidão

A exactidão é uma medida que expressa quão perto o resultado experimental se aproxima com o resultado esperado. Este resultado pode ser expresso em várias maneiras, sob a forma de erro absoluto ou relativo.

O erro absoluto ( $\Delta$ ) expressa o desvio na medida experimental obtida e é dado pela equação (2.66).

$$\Delta = x_i - x_0 \quad (2.66)$$

onde  $x_i$  é o valor obtido experimentalmente e  $x_0$  é o valor verdadeiro ou de referência.

O erro relativo ( $\%RE$ ) traduz o desvio relativo ao resultado esperado ( $x_0$ ) e é geralmente expresso em percentagem, como se pode ver pela equação (2.67)[24, 21]

$$\%RE = 100 \times \frac{(x_i - x_0)}{x_0} \quad (2.67)$$

A taxa de recuperação ( $\%TR$ ), equação (2.68), tem por objectivo verificar se existem efeitos sistemáticos introduzidos por causas desconhecidas (efeitos de matriz). Consiste na adição de uma quantidade controlada de padrão a uma amostra para verificar a quantidade de analito que se consegue obter,

$$\%TR = 100 \times \frac{(x_f - x_i)}{x_{add}} \quad (2.68)$$

onde  $x_f$  é a quantidade final experimentalmente obtida,  $x_i$  o teor inicial de uma amostra e  $x_{add}$  representa a dopagem realizada.

A exactidão permite estimar a presença de erros sistemáticos que podem ser verificados através da análise de amostras cegas, de testes de recuperação, da análise com um CRM (Certified Reference Material) ou com um SRM (Standart Reference Material) de matriz equivalente ou segundo ensaios interlaboratoriais.

A “recuperação” relaciona-se com a quantidade de analito recuperado no processo em relação à quantidade real presente na amostra. O erro sistemático ocorre pela perda da substância devido à baixa recuperação da extracção, medidas volumétricas imprecisas ou substâncias interferentes na amostra. A utilização de CRM’s, materiais certificados por processos tecnicamente válidos e rastreáveis, deve ser assegurada sempre que se consiga num processo de validação de um método, pois possui para cada parâmetro uma incerteza associada. O uso destes materiais permite a averiguação de possíveis desvios existentes nos equipamentos em uso no laboratório, permitindo uma averiguação para a causa do erro e eliminando-o. Por fim, a realização de ensaios interlaboratoriais também permite chegar a conclusões sobre a exactidão, referentes à mesma amostra, em condições já pré-definidas. Para tal, podem ser efectuados três tipos de ensaios: os de aptidão, de forma a avaliar o desempenho dos laboratórios participantes no estudo; de certificação, tendo como objectivo chegar ao valor certificado para um material candidato a CRM; e de normalização, de forma a estudar as características de um método analítico para o analito em causa, calculando a incerteza do seu resultado em função do valor verdadeiro e de um determinado intervalo.

### 2.3.2.8 Robustez

A robustez avalia a capacidade do método analítico em conduzir ao mesmo valor estimado após alteração deliberada de um certo conjunto de condições experimentais. No caso de o resultado final (teor) estimado ser independente do valor imposto para determinada condição experimental o método diz-se robusto no que respeita a esse factor experimental.

A robustez de um método é a capacidade do método exibir estabilidade ao longo do tempo e não ser afectado por pequenas variações nas condições de operação no laboratório. Os factores normalmente estudados são a estabilidade das soluções, o tempo de conservação da amostra, tempo de preparação e as condições experimentais do equipamento utilizado.

A robustez pode ser determinada através de um teste ao método em condições de precisão intermédia. Deve-se salientar que quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança desse relacionamento quanto à sua precisão e maior insensibilidade (dependência) de factores experimentais deliberadamente alterados, o que é muito benéfico pois o método continua a conduzir a valores concordantes apesar das alterações realizadas.

### 2.3.2.9 Coerência

A coerência avalia a capacidade do método analítico em conduzir ao mesmo valor estimado sem ter imposto qualquer alteração deliberada de condições experimentais. Regra geral traduz a capacidade de reproduzir os mesmos valores entre execuções em instantes diferentes. No caso de o resultado final (teor) estimado ser independente do instante temporal considerado o método diz-se coerente.

## 2.4 Quantificação da incerteza

A validação de um método analítico não poderia estar completa sem se proceder à avaliação da incerteza global do método no sentido de demonstrar que o método apresenta a fiabilidade desejada e cumpre os seus objectivos.

Nesta secção vamos abordar a nomenclatura própria, provenientes da metrologia, para esta abordagem analítica. Posteriormente iremos efectuar alguns diagnósticos das fontes de incerteza que contribuem para a incerteza total do método, o tratamento de incertezas do tipo  $A$  e  $B$ , a estimativa da incerteza combinada ( $u_c$ ) e obtenção da estimativa de incerteza expandida ( $U$ ).

Antes de fazer um resumo sistemático do procedimento da quantificação da incerteza convém definir alguns termos fundamentais com ela relacionados.

### 2.4.1 Nomenclatura

Em metrologia, chama-se incerteza ao parâmetro associado à medição que permite caracterizar a dispersão dos valores experimentais obtidos e é utilizada no processo de quantificação dessa propriedade.

A estimativa da incerteza da medida deve considerar as componentes de erro aleatório e de erro sistemático em relação ao valor normal (real, conhecido, valor de referência, valor consensual, previsto, verdadeiro, etc.).

O erro aleatório não pode ser corrigido enquanto que o erro sistemático pode ser compensado ou eliminado.

A imprecisão e o erro sistemático (desvio) são características de qualquer medição efectuada.

**Incerteza padrão** A incerteza padrão ( $u$ ) é dada pelo erro padrão associado a uma medição - pode referir-se ao desvio padrão no caso de ensaio único ( $M = 1$ ).

**Incerteza relativa** A incerteza relativa ( $RSU$ ) é uma incerteza adimensional normalizada com a estimativa central em valor absoluto.

**Incerteza padrão combinada** A incerteza padrão combinada ( $u_c$ ) traduz o erro padrão associado ao resultado de uma medição em particular (ou série de medições) e toma em consideração diversas componentes da incerteza.

**Incerteza expandida** A incerteza expandida ( $U$ ) é uma incerteza padrão combinada multiplicada por um termo constante  $k$  que lhe garante uma certa taxa de cobertura estatística (nível de confiança) da distribuição referente à incerteza da estimativa.

### 2.4.2 Pressupostos

Para se proceder à quantificação da incerteza da medida efectuada assumem-se os seguintes pressupostos:

i) cada componente de incerteza é traduzida e quantificada através do respectivo erro padrão<sup>31</sup>,

---

<sup>31</sup>Todas as incertezas padrão possuem unidades e devem ser reportadas nas mesmas unidades que as expressas na expressão determinando.

ii) todos os desvios estão supostamente corrigidos (no bias,  $\Delta \simeq 0$ ) por forma a que todas as incertezas coincidem com a incerteza da correcção,

iii) todos os intervalos de incerteza são simétricos,

iv) as componentes da incerteza são classificadas em dois tipos de grupos dependendo da sua origem e não do tipo de erro. Há dois tipos de incertezas a considerar:

- incerteza do **Tipo A** - diagnóstico da componente da incerteza recorrendo a métodos estatísticos,

- incerteza do **Tipo B** - componentes da incerteza avaliadas por outros meios (outros laboratórios, entidades, etc.),

v) a incerteza combinada ( $u_c$ ) representa o erro padrão global do valor a reportar; resulta da combinação de todas as incertezas (A e B) sob a forma da adição de variâncias,

vi) a incerteza expandida ( $U$ ) resulta do produto da incerteza combinada pelo respectivo valor de  $t$ -student para um certo nível de confiança e referente a um determinado número de graus de liberdade

$$U = k \times u_c = t_{\alpha(\nu)}^b \times u_c \quad (2.69)$$

Em geral a incerteza é reportada ao nível de confiança de 95% ( $\alpha = 0.05$ ). Para um grande número de graus de liberdade ( $n > 15$ ), o pode ser utilizado o valor  $k = 2$  para aproximar a cobertura ao nível de confiança de 95% do valor estimado.

### 2.4.3 Estimativa da incerteza

Para se proceder à estimativa da incerteza total na quantificação do analito é necessário: especificar a mensuranda, identificar as diversas fontes de incerteza, quantificar cada uma das componentes da incerteza, estimar a incerteza combinada e calcular a incerteza expandida.

Há várias abordagens possíveis adequadas a este propósito contudo, neste trabalho apenas iremos desenvolver em duas em concreto: a tradicional (bottom-up) e a simulação de Monte-Carlo.

#### 2.4.3.1 Abordagem Bottom-up

##### 1. Especificação da mensuranda

Antes de mais é necessário definir a expressão utilizada na quantificação, que conduz ao cálculo em questão, evidenciando os termos que contêm incertezas associadas. Se o valor a reportar não pode ser directamente avaliado mas é estimado através da comparação com valores da substância de referência (padrões), a equação que combina as várias quantidades deve ser definida.

##### 2. Identificação das fontes de incerteza

A incerteza global apresenta diversas fontes e deve-se essencialmente a:

- amostragem (ex: falta de representatividade devido à falta de homogeneidade)

- pré-tratamento, acondicionamento e armazenamento (ex: perdas e contaminações, estabilidade do analito)



- efeitos instrumentais (ex: calibração e manutenção do equipamento)
- desvios do método (ex: estequiometria do processo, reacções paralelas e incompletas, ...)
- pureza dos reagentes (ex: efeitos não controlados)
- condições experimentais (ex: temperatura ambiente, luminosidade, ...)
- efeitos de matriz (amostra)
- incertezas no cálculo (curva de calibração, réplicas, ...)
- efeito do operador (analista)
- efeitos não controlados (aleatórios)

### 3. Quantificação das fontes de incerteza

#### Diagnóstico da incerteza do **tipo A**:

O erro do tipo A (erro estimado internamente, no laboratório) contém duas componentes - aleatória (que não pode ser corrigida) e sistemática (que teoricamente, pode ser corrigida). A incerteza do tipo A é expressa sob a forma de desvio padrão da média.

#### Diagnóstico da incerteza do **tipo B**:

Esta fonte de incerteza depende de estimativas efectuadas previamente por outras entidades (organismos, fabricante, ...) nas condições usuais de procedimento. Geralmente vem expressa sob a forma de intervalo de confiança ( $\pm a$ ). Em geral duas situações podem surgir:

a) o intervalo de confiança indicado foi estimado para um certo nível de confiança

Neste caso assume-se uma distribuição normal e estima-se a incerteza ( $u(x)$ ) com base nos respectivos valores da distribuição bilateral de  $t$ -student; se não forem conhecidas o número de réplicas em que o cálculo se baseou, considera-se um número infinito de réplicas.

b) o intervalo de confiança especificado não tem nível de confiança associado

Assume-se que o nível de confiança é de 99%. De acordo com o tipo de distribuição prevista para a variável em causa e estima-se a respectiva imprecisão.

A distribuição uniforme é assumida para o caso de a variável em questão poder apresentar com uma certa frequência os valores extremos

$$(x \pm a) \Rightarrow u(x) = \frac{a}{\sqrt{3}} \quad (2.70)$$

Se se suspeitar de que os valores extremos são pouco frequentes deve-se aceitar a distribuição triangular como representante desta fonte de erro aleatório

$$(x \pm a) \Rightarrow u(x) = \frac{a}{\sqrt{6}} \quad (2.71)$$

São exemplos as estimativas de erro com material volumétrico aferido.

Se for expressamente indicado de que a dispersão aleatória é normal ou se existir uma forte suspeita de esta resultar de diversas fontes de erro

independente, a incerteza deve ser estimada assumindo uma distribuição normal

$$(x \pm a)_{\alpha=0.01} \Rightarrow u(x) = \frac{a}{\sqrt{9}} = \frac{a}{3} \quad (2.72)$$

$$(x \pm a)_{\alpha=0.05} \Rightarrow u(x) = \frac{a}{\sqrt{4}} = \frac{a}{2} \quad (2.73)$$

#### 4. Estimativa da incerteza combinada

Regra geral, a incerteza é combinada sob a forma de estimativa de erro indeterminado e independente. Se se assumir que o determinando possui a seguinte expressão

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_p)$$

a incerteza combinada referente ao determinando é dada através da expressão de propagação de erro indeterminado

$$u_c = u(f(x_1, x_2, \dots, x_p)) \Rightarrow u_c^2 = \sum_{i=1}^p \left( \left( \frac{\partial f}{\partial x_i} \right) \times u(x_i) \right)^2 \quad (2.74)$$

onde  $(\partial f / \partial x_i)$  representa o coeficiente de sensibilidade da função determinado em relação à variável  $x_i$ .

No caso de existir erro indeterminado correlacionado, a expressão anterior vem

$$u_c^2 = \sum_{i=1}^p \left( \left( \frac{\partial f}{\partial x_i} \right) \cdot u(x_i) \right)^2 + \sum_{i=1}^p \sum_{j>i}^p \left( \left( \frac{\partial f}{\partial x_i} \right) \cdot u(x_i) \right) \left( \left( \frac{\partial f}{\partial x_j} \right) \cdot u(x_j) \right) \cdot r_{ij} \quad (2.75)$$

em que  $r_{ij}$  representa o coeficiente de correlação dos erros indeterminados entre as variáveis  $i$  e  $j$ .

#### 5. Estimativa da incerteza expandida

A incerteza expandida ( $U$ ) calcula-se através da multiplicação da incerteza combinada pelo factor de cobertura desejado

$$U = k \times u_c \quad (2.76)$$

O factor de cobertura ( $k$ ) tem por finalidade expandir a incerteza combinada ( $u_c$ ) por forma a definir um intervalo de confiança ao qual está associada uma determinada probabilidade. A taxa de cobertura geralmente é calculada para o nível de confiança de 95% ( $\alpha = 0.05$ ).

Se o número de graus de liberdade for baixo ( $\nu < 15$ ) deve-se utilizar os valores da distribuição  $t$ -student (bilateral) como factor de cobertura. Caso contrário, assume-se  $k = 2$ .

A indicação do resultado analítico deve ser sob a forma de intervalo de confiança

$$\mu_X = \bar{X} \pm U \quad (2.77)$$

### 2.4.3.2 Correções

No caso de estar presente um erro sistemático significativo e consistente os valores estimados devem ser corrigidos. As correções mais frequentes reportam-se a correções:

1. de massa para medidas no vazio
2. de volume para a temperatura de calibração
3. de volume do ponto termo
4. da taxa de recuperação

Estas correções introduzem um termo de incerteza adicional que deve também ser introduzido na incerteza combinada do resultado obtido.

#### Correcção da massa

A massa no vazio ( $m^*$ ) pode ser estimada com base na seguinte expressão <sup>32</sup>

$$m^* = m \times \left( \frac{1 - \rho_{ar}/\rho_{calib}}{1 - \rho_{ar}/\rho_{solido}} \right) \quad (2.78)$$

onde  $m$  é a massa indicada pela balança,  $\rho_{ar} = 1.2 \times 10^{-3} \text{ g.cm}^{-3}$  é a massa volúmica média do ar enquanto que  $\rho_{calib}$  e  $\rho_{solido}$  representam as massas volúmicas dos padrões ( $\rho_{calib} = 8.00 \text{ g.cm}^{-3}$  no caso de pesos em aço inox) e do sólido que se pretende pesar.

A amplitude de variação ( $\Delta m$ ) da correcção de massa é dada por

$$\Delta m = m^* - m = m \cdot \left( \left( \frac{1 - \rho_{ar}/\rho_{calib}}{1 - \rho_{ar}/\rho_{solido}} \right) - 1 \right) \quad (2.79)$$

Esta expressão é equivalente a

$$\frac{\Delta m}{m} = \left( \frac{\rho_{calib} - \rho_{solido}}{\rho_{calib}} \right) \cdot \left( \frac{\rho_{ar}}{\rho_{solido} - \rho_{ar}} \right) \quad (2.80)$$

em que as massas volúmicas estão expressas nas mesmas unidades (por exemplo em  $\text{g.cm}^{-3}$ ).

A densidade do ar ( $\rho_{ar}$ ,  $\text{kg.m}^{-3}$ ) pode ser estimada [OIML, [www.oiml.org](http://www.oiml.org)] com base na respectiva temperatura ( $T$ , °C), pressão ( $p$ , mbar) e humidade relativa ( $h$ , %)

$$\rho_{ar} = \frac{(0.348444 \times p) - h(0.00252 \times T - 0.020582)}{(273.15 + T)} \quad (\text{kg.m}^{-3})$$

De acordo com a OIML o valor padrão da densidade do ar é  $1.2 [\pm 0.12] \text{ kg.m}^{-3}$  ( $T = 20 [\pm 5] \text{ °C}$ ,  $p = 1013.25 [\pm 60] \text{ mbar}$ , e  $h = 50 [\pm 30] \text{ %}$ ).

<sup>32</sup>A correcção da massa pesada ( $m$ ) para o valor obtido em vácuo ( $m^*$ ) é dada por

$$m^* = m \times \left( \frac{1 - \rho_{ar}/\rho_{calib}}{1 - \rho_{ar}/\rho_{solido}} \right) \simeq m \times \left( \frac{\rho_{calib}}{\rho_{solido} - \rho_{ar}} \right)$$

onde  $\rho_{calib}$  e  $\rho_{solido}$  representam a densidade do peso de calibração da balança e do corpo que está a ser pesado. Sendo a densidade do ar seco ( $\rho_{ar} \simeq 1.2 \times 10^{-3} \text{ g.cm}^{-3}$ ) muito inferior à do padrão utilizado ( $\rho_{calib} \simeq 8.00 \text{ g.cm}^{-3}$ ), a expressão pode ser simplificada. Desta segunda expressão verifica-se que este erro só se torna significativo com densidades do sólido  $\rho_{solido} < 0.1 \text{ g.cm}^{-3}$ .

**Correcção térmica do volume**

O volume corrigido ( $V^*$ ) para a temperatura de 20 °C

$$V^* = V \times (1 - \alpha_T \times (T - 20)) \quad (2.81)$$

onde  $(T - 20)$  representa o desvio térmico do laboratório (em graus centígrados) e  $\alpha_T$  representa o coeficiente de expansão térmico da água ( $\alpha_T = 2.1 \times 10^{-4} (\text{°C})^{-1}$ ). A amplitude de variação do volume é dada por

$$\Delta V = |V^* - V| = V \times \alpha_T \times |T - 20| \quad (2.82)$$

ou seja, a variação relativa de volume é dada por

$$\frac{\Delta V}{V} = \alpha_T \times |T - 20| \quad (2.83)$$

**Correcção do volume de equivalência**

O volume de ponto termo ( $V_T^*$ ) é dado por

$$V_T^* = V_T - V_0 \quad (2.84)$$

onde  $V_0$  é o volume de excesso gasto na titulação com o branco.

**Correcção da taxa de recuperação**

Quando se demonstra que a recuperação não é unitária ( $\%RI \neq 100$ ,  $Rec \neq 1$ ) é necessário corrigir a concentração encontrada ( $X$ ) de forma a dar

$$X^* = \frac{100 \times X}{\%RI} \quad (2.85)$$

onde  $X^*$  representa a concentração corrigida atendendo à deficiência na recuperação do analito.

Neste caso a amplitude relativa da correcção da concentração é dada por

$$\frac{\Delta X}{X} = \frac{(X^* - X)}{X} = \frac{|100 - \%RI|}{\%RI} = \frac{|1 - Rec|}{Rec} \quad (2.86)$$

**2.4.3.3 Simulação Monte-Carlo**

A simulação de Monte-Carlo consiste no recurso a geradores de números aleatórios para realizar estimativas robustas da incerteza.

Com base numa distribuição normalizada ( $N[0, 1]$ ) pode ser gerada qualquer distribuição normalizada

$$N[\mu, \sigma^2] = \mu + \sigma \times N[0, 1] \quad (2.87)$$

centrada em  $\mu$  e com a dispersão  $\sigma$ .

A maior vantagem deste processo é que basta conhecer cada uma das fontes de incerteza que estão presentes na expressão da mensuranda para realizar uma estimativa da propagação de erro por combinação das diversas variáveis. Este processo é muito vantajoso no caso de mensurandas complicadas.

A fiabilidade das estimativas obtidas depende essencialmente da qualidade dos geradores de números aleatórios bem como do número de estimativas obtidas - será tanto mais rigoroso quanto maior o número de simulações.

## Capítulo 3

# Parte experimental

Neste capítulo vamos dar ênfase e especificar detalhadamente o procedimento experimental para que os procedimentos utilizados e resultados obtidos possam vir a ser repetidos no futuro, caso seja necessário. Assim, além de alguns detalhes sobre o tipo de equipamentos utilizados, vamos especificar a preparação de soluções e seu modo de utilização. Sendo importante para o tratamento de dados e respectiva conclusão estatística, os critérios estatísticos utilizados também serão aqui especificados.

### 3.1 Condições de trabalho

Nesta secção vamos referir o material utilizado como alguns dos detalhes dos reagentes necessários e equipamentos necessários à realização deste trabalho.

O método que se pretende validar recorre essencialmente à volumetria como modo de determinação. Assim sendo o material volumétrico essencial à realização deste método consistiu em material volumétrico de classe A: uma bureta volumétrica de 25.00 ( $\pm 0.05$ ) mL, balões volumétricos (100.00 ( $\pm 0.1$ ) e de 500.00 ( $\pm 0.25$ ) mL), pipeta volumétrica de 25.00 ( $\pm 0.03$ ) mL<sup>1</sup>.

Os reagentes utilizados foram adquiridos pela empresa no seu grau de pureza mais elevado e foram utilizados como tal, sem qualquer tipo de processo de purificação.

De entre estes reagentes referidos algumas das propriedades dos mais relevantes tais como: sal dissódico do ácido etilenodiamina tetraacético dihidratado (Panreac, 100.43%,  $Na_2C_{10}H_{14}N_2O_8 \cdot 2(H_2O)$ , 372.24 g/mol), nitrato de chumbo (Merck, 99.7%,  $Pb(NO_3)_2$ , 331.21 g/mol), hexametilenoctetramina (Panreac, 99.0%,  $C_6H_{12}N_4$ , 140.19 g/mol), ácido clorídrico concentrado (Panreac, 37%, 1.19 g/cm<sup>3</sup>), indicador laranja de xilenol (Panreac,  $C_{31}H_{32}N_2O_{13}S$ , 672.66 g/mol).

Foi ainda utilizada uma solução padrão aferida de EDTA (solução de sal dissódico de ácido etilenodiaminatetraacético 0.1 M (VWR Chemicals).

As soluções aquosas preparadas no laboratório foram obtidas por incorporação de água purificada, obtida por osmose inversa (sistema Millipore ELIX

---

<sup>1</sup>Foi ainda utilizado outro tipo de vidro de suporte às titulações (ex: erlenmeyers, copo, etc) mas que devido à irrelevância do seu impacto analítico não será sequer referido a não ser na descrição de algum procedimento.

10).

Foi utilizada, também, uma solução amostra do novo produto farmacêutico contendo o excipiente (EDTA).

Já ao nível de equipamentos necessários à realização deste trabalho consistiu na utilização de uma balança analítica (Mettler Toledo XS205DU,  $\pm 0.1$  mg), micropipeta (Eppendorf, gama: 500-5000  $\mu\text{L}$ ,  $\pm 40$   $\mu\text{L}$ ) e titulador automático (Metrohm 794 Basic Tritino).

## 3.2 Procedimentos

Neste subcapítulo é descrito os procedimentos e condições experimentais para o desenvolvimento do trabalho.

### 3.2.1 Preparação de soluções

#### 3.2.1.1 Solução Mãe de Nitrato de Chumbo 0.1M

Numa balança analítica, pesou-se 16.5016 g de nitrato de chumbo para um balão de 500 mL, dissolveu-se com água purificada e fez-se o volume final, 500 mL, com o mesmo solvente.

#### 3.2.1.2 Solução de Nitrato de Chumbo 0.001M

Apartir da solução mãe de nitrato de chumbo 0.1 M, pipetou-se 10.00 mL para um balão de 1000 mL e fez-se o volume com água purificada.

#### 3.2.1.3 Solução Mãe de EDTA 10,00 mg/mL

Utilizando uma balança analítica pesou-se, rigorosamente, 1.00 g de EDTA para um balão de 100 mL, dissolveu-se com água purificada e fez-se para o volume final com o mesmo solvente.

#### 3.2.1.4 Solução de Ácido Clorídrico Diluído R

com uma pipeta volumétrica mediu-se cerca de 16.8 mL de ácido clorídrico concentrado e diluiu-se com água purificada para um balão de 100 mL [25].

#### 3.2.1.5 Solução do Branco

A solução do branco é constituída exclusivamente por água purificada.

#### 3.2.1.6 Solução Placebo

A solução placebo é constituída por todos os ingredientes da solução oral excepto pelo EDTA (agente quelante). O placebo no mundo farmacêutico é a matriz do fármaco menos o princípio activo, isto é, é constituído por todos os ingredientes do fármaco menos o ingrediente do princípio activo.

### 3.2.1.7 Mistura de Alaranjado de Xilenol (Indicador)

A mistura de Alaranjado de Xilenol serviu de indicador no processo de titulação do EDTA com chumbo (II). Foi preparada a partir de alaranjado de xilenol e de nitrato de potássio, numa estequiometria de 1:99, pesando 1.014 g de alaranjado de xilenol e 89.994 g de nitrato de potássio, posteriormente procedeu-se à sua trituração para uma melhor homogeneidade da mistura e aumentar a dispersão do indicador [25].

## 3.2.2 Determinações

Nesta secção vão ser explicitados os procedimentos de determinação volumétrica.

### 3.2.2.1 Aferição da solução mãe de Nitrato de Chumbo 0.1M

A determinação do título da solução de nitrato de chumbo 0.1 M é o quociente da massa do soluto pela massa total da solução, ou seja, consiste em determinar o factor de correcção para apurar a verdadeira concentração da solução mãe. Para isso, com a ajuda do titulador automático (Metrohm 794 Basic Titrino), procedeu-se à titulação da solução mãe de nitrato de chumbo 0.1 M com uma solução de EDTA 0.1 M, adicionando 2.0 g de hexametilenotetramina e usando alaranjado de xilenol como indicador. Este título ou factor de correcção determinado, para a solução de nitrato de chumbo 0.1 M, vai ser utilizado também para a solução diluída (Nitrato de Chumbo 0.001 M). A utilização do titulador automático, neste caso, permite ter um erro associado à determinação do título da solução de nitrato de chumbo muito pequeno, isto porque terá um maior rigor no volume dispendido.

### 3.2.2.2 Selectividade do método

É nesta etapa da validação do método analítico que se verifica que o método vai dar uma resposta verdadeira ao analito que se pretender determinar, ou seja, garantindo que não existe interferência de qualquer outro componente da matriz onde está presente o analito a determinar. É de extrema importância que o que se obtém como resultado seja inequívoco e traduza uma boa resposta ao analisar a amostra. Para isso preparou-se seis amostras da mesma solução com concentração de EDTA de 0.2501 mg/mL, que corresponde ao nível de concentração de doseamento do EDTA a 100%. Com a resposta de recuperação, pode-se avaliar a estimativa do erro sistemático introduzido na resposta analítica por interferência química.

### 3.2.2.3 Linearidade

De forma a chegar à curva de calibração prepararam-se padrões de EDTA com diferentes concentrações, a partir da solução mãe de EDTA 10.00 mg/mL e utilizando uma micropipeta (Eppendorf 500 - 5000 $\mu$ L) segundo o esquema indicado na tabela (3.1)

Tabela 3.1: Preparação de padrões de EDTA da curva de calibração.

Teor (%)	Volume pipetado ( $\mu\text{L}$ )	Volume final (mL)	$C_{EDTA}$ (mg/mL)
50	1250	100.00	0.125
80	2000	100.00	0.200
100	2500	100.00	0.250
120	3000	100.00	0.300
150	3750	100.00	0.375

### 3.2.2.4 Repetibilidade do método

Foi preparada uma solução placebo a 100% de EDTA, no qual foram dissolvidos 124.5 mg de EDTA em 500.00 mL de placebo (concentração final 0.2501 mg/mL de EDTA) e efectuou-se seis titulações independentes apartir da solução preparada. Pretende-se avaliar a variação do ensaio no menor curto espaço de tempo à mesma solução e nas mesmas condições.

### 3.2.2.5 Precisão intermédia

Para a precisão intermédia utilizou-se a solução placebo a 100% preparada no subcapítulo anterior, efectuando-se 12 titulações independentes por dois analistas, ou seja, 6 titulações por analista. Pretende-se avaliar o efeito analista na análise à mesma solução e nas mesmas condições.

### 3.2.2.6 Exactidão

Foram preparadas quatro soluções placebo a 0%, 80%, 100% e 120%, em triplicado, afim de determinar a recuperação do método. O procedimento respectivo encontra-se sistematizado na tabela (3.2).

Tabela 3.2: Identificação das soluções padrão de EDTA preparadas, quantidade pesada e estimativa da concentração.

Padrões (ID#) <sup>a)</sup>			Adição de EDTA (mg) <sup>b)</sup>			Concentração ( $C_0$ , mg/mL) <sup>c)</sup>		
P00a	P00b	P00c	—	—	—	0.000	0.000	0.000
P08a	P08b	P08c	20.2	19.8	19.9	0.2029	0.1989	0.1999
P10a	P10b	P10c	124.5	25.1	25.1	0.2501	0.2521	0.2521
P12a	P12b	P12c	29.8	29.7	29.6	0.2993	0.2983	0.2973

<sup>a)</sup> Respectivamente; <sup>b)</sup> Volume final de 100.00 mL; <sup>c)</sup> com algarismo significativo adicional para minimizar erros de truncatura numérica.

Neste ponto pretende-se avaliar a exactidão do método ao nível da recuperação do EDTA nas soluções preparadas.

### 3.2.2.7 Robustez

Para este ensaio foram analisadas quatro soluções placebo a 100% em que se utilizou, para a titulação, o nitrato de chumbo 0.001 M a duas temperaturas diferentes. Da solução de nitrato de chumbo 0.001 M foi colocado um balão de 100.00 mL contendo esta solução no frigorífico a 5 °C ( $\pm 2$  °C) e no escuro,



o outro balão de igual volume à temperatura ambiente e com luminosidade do laboratório, devidamente acondicionado. As titulações foram feitas em dias diferentes, isto é, a 24 horas e a 96 horas, após a preparação da solução de nitrato de chumbo 0.001 M.

### 3.2.3 Procedimento Geral

Dissolver 0.300 g em água purificada e diluir para 300.0 mL com o mesmo solvente. Adicionar 2.0 g de hexametenotetramina e 2.0 mL de ácido clorídrico diluído R. Titular com nitrato de chumbo 0.1 M, usando cerca de 50 mg de alaranjado de xilenol triturado R como indicador.

De acordo com este procedimento, o volume de 1.00 mL de nitrato de chumbo 0.100 M é equivalente a 37.22 mg de EDTA<sup>2</sup>

#### 3.2.3.1 Método proposto pela Farmacopeia Europeia

Doseamento de EDTA em matéria Prima:

Dissolver 0.300 g em água purificada e diluir para 300.0 mL com o mesmo solvente. Adicionar 2.0 g de hexametenotetramina e 2.0 mL de ácido clorídrico diluído R. Titular com nitrato de chumbo 0.1 M, usando cerca de 50 mg de alaranjado de xilenol triturado R como indicador.

De acordo com este procedimento, o volume de 1.00 mL de nitrato de chumbo 0.100 M é equivalente a 37.22 mg de EDTA<sup>3</sup>.

#### 3.2.3.2 Estratégia de validação método analítico

Este procedimento tem como base o procedimento descrito pela Farmacopeia Europeia para o doseamento de EDTA como matéria prima. Posteriormente adaptada para proceder ao doseamento do EDTA no produto final, descrito abaixo.

Pipetar 25.00 mL da amostra para um matraz de 500 mL e adicionar água até cerca de 300 mL, adicionar 2,0 g de hexametenotetramina e 2 mL de HCl diluído R. Usar como indicador alaranjado de xilenol e titular com nitrato de chumbo 1.00 mM até a cor amarela desaparecer, dando lugar a uma cor avermelhada.

A quantidade de EDTA, presente na amostra de volume tomada para a titulação, é determinada através da equação

$$C_{EDTA} = \frac{(V_T - V_0) \times Fc \times 0.3722}{V_A} \quad (3.1)$$

onde  $V_T$  corresponde ao volume gasto na titulação das amostras,  $V_0$  é o volume gasto na titulação da solução do branco,  $Fc$  é o factor de correcção ou o título

<sup>2</sup>Atendendo a que 1.00 mL de Pb(II) de concentração 0.100 M corresponde a 0.100 mmol de catião, devido à estequiometria unitária para com o EDTA isto corresponde ao mesmo número de 0.100 mmol de complexante que se estiver na forma de EDTA dissódico di-hidratado ( $Na_2C_{10}H_{14}N_2O_8 \cdot 2(H_2O)$ ), cuja massa molecular corresponde a 372.24 g/mol, vai corresponder a 37.22 mg.

<sup>3</sup>Atendendo a que 1.00 mL de Pb(II) de concentração 0.100 M corresponde a 0.100 mmol de catião, devido à estequiometria unitária para com o EDTA isto corresponde ao mesmo número de 0.100 mmol de complexante que se estiver na forma de EDTA dissódico di-hidratado ( $Na_2C_{10}H_{14}N_2O_8 \cdot 2(H_2O)$ ), cuja massa molecular corresponde a 372.24 g/mol, vai corresponder a 37.22 mg.

determinado para a solução nitrato de chumbo 0.1 M, 0.3722 é um valor de equivalência em que 1.00 mL de nitrato de chumbo a 0.001 M corresponde a 0.3722 mg de EDTA,  $V_A$  é o volume de amostra utilizado para a titulação,

$$\%C = 100 \times \left( \frac{C_{EDTA}}{C_0} \right) \quad (3.2)$$

onde  $C_{EDTA}$  é a concentração obtida experimentalmente, equação (3.1), e  $C_0$  representa a concentração de referência do fabrico.

## Capítulo 4

# Resultados e discussão

Nesta parte deste relatório vamos apresentar os resultados obtidos e ir avaliando cada questão relacionada com a validação do método individualmente.

### 4.1 Fundamento químico

Em primeiro lugar é necessário prever e explicar o comportamento químico do sistema analítico em causa e verificar a capacidade de este poder ser utilizado para fins de quantificação.

Uma vez que o processo analítico é realizado em meio relativamente ácido ( $\text{pH} \simeq 5.3$ ), fortemente tamponizado com a hexametilenoetetramina ( $pK_a = 4.89$ ), convém saber como se encontra o EDTA em termos de protonação e o catião ( $\text{Pb}^{2+}$ ) em termos de solubilidade.

Atendendo aos valores publicados [7], e ao diagrama da figura (2.4), foram estimadas as fracções molares das espécies do EDTA na faixa de pH 4.0 a 6.0. Os valores estimados encontram-se na tabela (4.1).

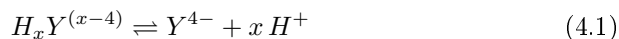
Tabela 4.1: Especificação das diferentes formas do EDTA em função do valor do pH do meio. Destaque a negrito nas espécies cuja contribuição é mais significativa ( $> 0.10$ ).

pH	4.00	4.50	5.00	5.50	6.00	Espécie
$\alpha_0$	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	$H_6Y^{2+}$
$\alpha_1$	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	$H_5Y^+$
$\alpha_2$	0.0005	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	$H_4Y$
$\alpha_3$	0.0463	0.0149	0.0045	0.0013	0.0003	$H_3Y^-$
$\alpha_4$	<b>0.9462</b>	<b>0.9625</b>	<b>0.9268</b>	<b>0.8091</b>	<b>0.5741</b>	$H_2Y^{2-}$
$\alpha_5$	0.0070	0.0226	0.0687	<b>0.1897</b>	<b>0.4256</b>	$HY^{3-}$
$\alpha_6$	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	$Y^{4-}$

Dos valores estimados, tabela (4.1), verifica-se que a pH 4.0 - 6.0 predomina a forma  $H_2Y^{2-}$ , havendo a pH próximo de 6.0 uma forte contribuição da espécie  $HY^{3-}$ .

Todas estas espécies protonadas apresentam uma dificuldade acrescida em termos de serem capazes de coordenar catiões já que este facto envolve a des-

protonação do ligando para se obter a espécie  $Y^{4-}$



Em termos de correcção deste efeito na respectiva constante de equilíbrio consiste em

$$K'_{PbY} = \alpha_6 \cdot K_{PbY} \quad (4.2)$$

em que  $\alpha_6$  assume os valores 2.99E-09, 3.04E-08, 2.93E-07, 2.56E-06 e 1.82E-05 nos valores de pH indicados na tabela (4.1).

Por outro lado o pH do meio vai condicionar a solubilidade dos metais que possam coexistir em solução. Se se atender à equação de solubilidade dos hidróxidos metálicos, (2.13) e (2.14), a solubilidade do metal pode ser estimada com base em

$$pM = pK_{sp(M(OH)_n)} - n \cdot pOH \quad (4.3)$$

onde  $pM$  representa a solubilidade do metal o  $pOH$  a actividade do ião  $OH^-$  em solução, segundo a notação logaritimizada inversa<sup>1</sup>.

Na tabela (4.2) encontra-se uma listagem dos hidróxido-precipitados de alguns catiões, ordenados com base na sua solubilidade em meio ácido.

Tabela 4.2: Solubilidade de alguns hidróxidos de catiões em meio aquoso ( $pM$ ) estimadas para pH = 5.0 - valores ordenados por ordem decrescente de solubilidade.

	$pK_{sp}$	$pM$		$pK_{sp}$	$pM$		$pK_{sp}$	$pM$
$Ba(OH)_2$	3.2	-14.8	$Fe(OH)_2$	15.1	-2.9	$In(OH)_3$	36.9	7.4
$Ca(OH)_2$	5.3	-12.7	$Ni(OH)_2$	15.1	-2.9	$Hg(OH)_2$	25.4	7.4
$Au(OH)_2$	5.5	-12.5	$Pb(OH)_2$	15.2	-2.8	$Sn(OH)_2$	26.2	8.2
$Ga(OH)_3$	20.7	-7.3	$Zn(OH)_2$	15.5	-2.5	$Fe(OH)_3$	38.4	9.9
$Ce(OH)_3$	21.2	-6.3	$Cr(OH)_2$	15.7	-2.3	$AgOH$	15.4	10.5
$Mg(OH)_2$	10.7	-5.8	$Cr(OH)_3$	29.8	2.8	$Pd(OH)_2$	28.5	11.4
$Y(OH)_3$	23.2	-5.3	$Sc(OH)_3$	30.1	3.1	$Cu(OH)_2$	29.4	11.4
$Mn(OH)_2$	12.7	-3.8	$Al(OH)_3$	33.5	4.4	$Co(OH)_3$	44.5	17.5
$Cd(OH)_2$	14.3	-3.7	$U(OH)_2$	22.4	6.4	$Tl(OH)_3$	45.2	18.2
$Co(OH)_2$	14.8	-3.2	$V(OH)_3$	34.4	6.5			

Da tabela (4.2) verifica-se que para pH próximo de 5 o chumbo, Pb(II), é muito solúvel assim como grande parte dos catiões reportados, podendo por isso interferir com a determinação do EDTA.

Diversos catiões poderão estar precipitados nessas condições - da tabela (4.2), se considerar o valor 1E-06 como limite de solubilidade, 11 catiões, a começar com o  $U(OH)_2$  poderão estar complexados.

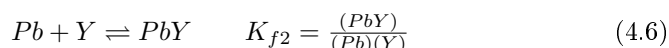
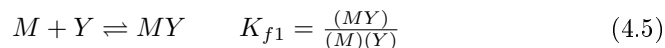
Não sendo a solubilidade do catião a pH próximo de 5 algo de crítico que possa reduzir a interferência de outras espécies, o uso do Pb(II) como titulante ainda será viável se, na presença dum determinado interferente  $M$  em solução, possa ocorrer a reacção de substituição



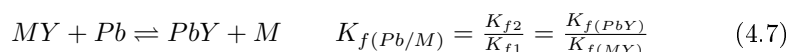
em que o Pb(II) adicionado ( $Pb$ ) possa deslocar o catião do EDTA ( $MY$ ) indo formar a espécie final ( $PbY$ ) com uma extensão razoável.

<sup>1</sup>Para o caso de valores baixos, a notação  $pX$  corresponde a  $pX = -\text{Log}(X) = \text{Log}(1/X)$ .

Para avaliar a extensão da reacção (4.4) tem-se que considerar os equilíbrios



Comparando a equação (4.4) com as equações (4.5) e (4.6) verifica-se que a constante de equilíbrio para a primeira equação poderá ser estimada com base em



Com base nos valores publicados, tabela (2.2), na tabela

Tabela 4.3: Estimativas de constantes de substituição do complexo  $MY$  por  $PbY$ .

$M$	$\log(K_{f(Pb/M)})$	$M$	$\log(K_{f(Pb/M)})$	$M$	$\log(K_{f(Pb/M)})$
$Co^{3+}$	-23.4	$Er^{3+}$	-0.9	$VO^+$	2.5
$Tl^{3+}$	-17.3	$Cu^{2+}$	-0.8	$La^{3+}$	2.6
$Hf^{4+}$	-11.5	$VO^{2+}$	-0.7	$Fe^{2+}$	3.7
$Zr^{4+}$	-11.3	$Ho^{3+}$	-0.6	$Mn^{2+}$	4.1
$Bi^{3+}$	-9.8	$Ni^{2+}$	-0.4	$Cr^{2+}$	4.4
$V^{3+}$	-7.9	$Dy^{3+}$	-0.3	$V^{2+}$	5.3
$U^{4+}$	-7.7	$Sn^{2+}$	-0.3	$Ca^{2+}$	7.4
$Pd^{2+}$	-7.6	$Y^{3+}$	-0.1	$Be^{2+}$	8.3
$Mn^{3+}$	-7.2	$Tb^{3+}$	0.1	$Mg^{2+}$	9.2
$Fe^{3+}$	-7.1	$Gd^{3+}$	0.6	$Sr^{2+}$	9.3
$In^{3+}$	-6.9	$Eu^{3+}$	0.8	$Ba^{2+}$	10.1
$Cr^{3+}$	-5.4	$Sm^{3+}$	0.9	$Ra^{2+}$	10.6
$Th^{4+}$	-5.2	$Pm^{3+}$	1.1	$Ag^+$	10.8
$Sc^{3+}$	-5.1	$Nd^{3+}$	1.5	$Tl^+$	11.6
$Ga^{3+}$	-3.7	$Cd^{2+}$	1.5	$Li^+$	15.1
$Hg^{2+}$	-3.5	$Zn^{2+}$	1.5	$Na^+$	16.1
$Ti^{3+}$	-3.3	$Co^{2+}$	1.6	$K^+$	17.2
$Lu^{3+}$	-1.7	$Al^{3+}$	1.6		
$Yb^{3+}$	-1.5	$Pr^{3+}$	1.7		
$Tm^{3+}$	-1.3	$Ce^{3+}$	2.1		

Importa agora estimar qual a magnitude que esta constante deve possuir de forma a dar um erro insignificante.

Se se assumir que o erro se deve à reversibilidade da reacção (4.7) por esta não ser demasiado extensa, assim no ponto de equivalência teremos uma estimativa de erro similar a

$$\%RE \simeq 100 \times \left( \frac{-1 + \sqrt{1 + \beta \cdot C_M}}{2\beta \cdot C_M} \right) \quad (4.8)$$

em que  $\beta$  é a constante de formação do complexo e  $C_M$  a concentração utilizada do titulante.

Se se pensar em  $C_M = 0.001$  M verifica-se que com valores de  $\log(\beta)$  de 10, 9, 8 e 7 obtém-se erros da ordem de 0.1, 0.2, 0.6 e 2.0%. Assim, as titulações

de substituição devem possuir constantes de formação superiores a  $1E+08$  para garantir erros inferiores a 1%.

Voltando agora aos valores da tabela (4.3) apenas os catiões  $Be^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Ra^{2+}$ ,  $Ag^+$ ,  $Tl^+$ ,  $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  não irão interferir com a determinação. Já se o  $Ca^{2+}$  estiver presente este poderá introduzir um erro da ordem de 2%.

Verifica-se ainda que há uma imensidão de metais que inviabilizariam esta determinação. Assim sendo, a única forma de garantir que estes metais não irão interferir na determinação do EDTA por titulação com chumbo (II) seria criar condições experimentais que garantam a sua ausência ou que a sua concentração seja irrelevante quando comparada com o teor do analito (EDTA) que se pretende determinar.

## 4.2 Verificações

Antes de entrar na validação do método em concreto foram feitas algumas verificações preliminares tais como..

Para avaliar o efeito da matriz da formulação nos resultados da determinação do teor do EDTA foram realizados dois estudos similares - na ausência da matriz e na presença desta, em condições analíticas similares.

### 4.2.1 Exactidão da bureta

Uma das preocupações iniciais que surgiu foi a de tentar demonstrar que a escala de volume da bureta utilizada era exacta - o volume nominal obtido por leitura da escala graduada era coerente com o volume real despejado.

Para tal encheu-se uma bureta de volume nominal máximo de 25.00 mL (0.10 mL no menor incremento marcado, tolerância  $\pm 0.03$  mL). Para realizar este estudo converteu-se cada incremento de volume despendido ( $dV$ ) em massa transferida ( $dm^*$ ) usando o valor  $0.998183$  g/cm<sup>3</sup> publicado para a densidade da água a  $20.1 \pm 0.1$  °C [26].

De seguida comparou-se esta massa transferida com o acréscimo de massa de líquido recebido pela bureta ( $dm$ ) num copo instalado sobre o prato de pesagem uma balança analítica.

Os resultados obtidos encontram-se sistematizados na tabela (4.4).

Tabela 4.4: Compilação dos resultados obtidos na verificação da exactidão do volume despejado por uma bureta.

V	m	V*	V-V*	dV	dV*	dV/dV*
( mL )	( g )	( mL )	( mL )	( mL )	( mL )	
0.00	0.0000	0.00	0.00			
0.99	1.0043	1.00	-0.01	0.94	1.00	0.94
2.01	2.0450	2.04	-0.03	1.02	1.04	0.98
2.99	3.0274	3.01	-0.02	0.98	0.98	1.00
4.02	4.0340	4.02	0.00	1.03	1.00	1.03
5.05	5.0717	5.05	0.00	1.03	1.03	1.00
5.99	6.0110	5.99	0.00	0.94	0.94	1.01
7.02	7.0681	7.04	-0.02	1.03	1.05	0.98
7.99	8.0095	7.98	0.01	0.97	0.94	1.03
8.98	8.9976	8.96	0.02	0.99	0.98	1.01
10.04	10.0852	10.04	0.00	1.06	1.08	0.98
10.99	11.0169	10.97	0.02	0.95	0.93	1.02
11.99	12.0250	11.97	0.02	1.00	1.00	1.00
13.01	13.0123	12.96	0.05	1.02	0.98	1.04
13.98	14.0090	13.95	0.03	0.97	0.99	0.98
15.01	15.0101	14.95	0.06	1.03	1.00	1.03
16.02	16.0104	15.94	0.08	1.01	1.00	1.01
17.04	17.0589	16.99	0.05	1.02	1.04	0.98
18.01	18.0080	17.93	0.08	0.97	0.95	1.03
19.04	19.0480	18.97	0.07	1.03	1.04	0.99
19.98	19.9721	19.89	0.09	0.94	0.92	1.02
20.96	20.9874	20.90	0.06	0.98	1.01	0.97
21.99	21.9870	21.89	0.10	1.03	1.00	1.03
23.02	23.0100	22.91	0.11	1.03	1.02	1.01
23.99	23.9649	23.86	0.13	0.97	0.95	1.02
24.84	24.8335	24.73	0.11	0.85	0.86	0.98

V - volume nominal obtido por leitura da escala da bureta; m - massa pesada de água transferida para o copo de pesagem; V\* - volume calculado com base na massa pesada (m) e densidade; V-V\* - desvio sistemático no volume medido; dV, dV\* - incrementos de volume (nominal e calculado, respectivamente) para verificação da constância da escala de volume da bureta; dV/dV\* - razão de volumes nominal e calculado.

Na figura (4.1) representa-se o volume nominal em função do volume estimado medido através da bureta ao longo da sua amplitude operacional.

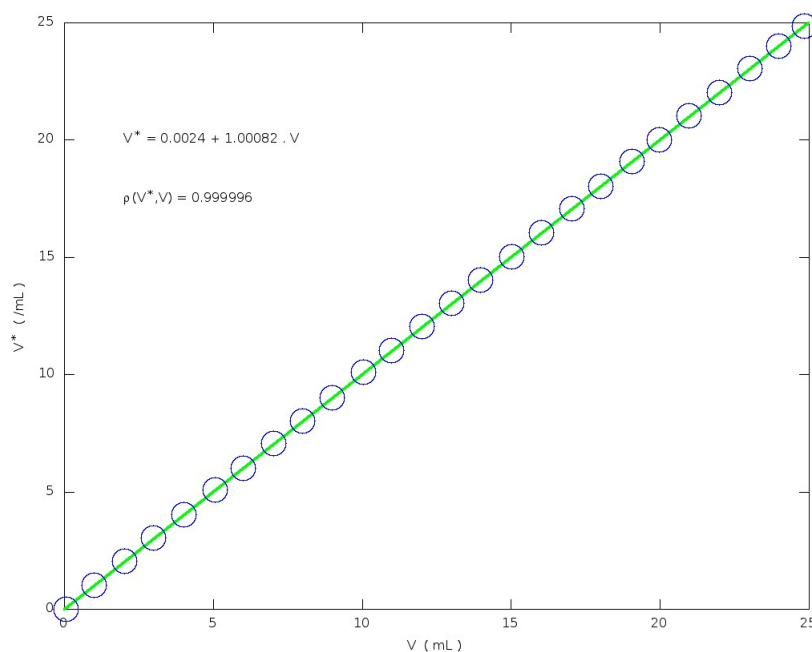


Figura 4.1: Representação do volume despejado calculado ( $V^*$ ) em função do volume nominal ( $V$ ) da bureta. A linha marcada a verde representa a função de recuperação do volume da bureta.

O ajuste dos valores experimentais com um polinómio de primeiro grau conduziu a uma recta com equação (4.9):

$$V^* = 0.0024 + 1.00082 \cdot V \quad (4.9)$$

com um excelente coeficiente de correlação ( $\rho(V^*, V) = 0.999996$ ).

Pretende-se agora avaliar se existe diferença significativa (erro sistemático) ao nível do volume despejado pela bureta. Por comparação directa de  $b_0 = 0.0024$  (0.0083) com o valor zero, obtém-se um valor de teste  $TV = 0.29$  a que corresponde um valor de prova  $p[H_0] = 0.772$  referente a 23 graus de liberdade - isto significa que não existe erro sistemático constante. Comparando agora o declive  $b_1 = 1.00082$  (0.00057) com o valor unitário, obtém-se um valor de teste  $TV = 1.44$  ao qual corresponde um valor de prova  $p[H_0] = 0.164$  - este valor elevado de probabilidade indica-nos também que não existe erro sistemático proporcional. Destas duas demonstrações anteriores valida-se a bureta (em termos de exactidão) para toda a sua escala operacional (0-25 mL).

Embora tenhamos demonstrado a ausência de erro sistemático no volume despejado pela bureta, importa ainda verificar a homogeneidade da escala volumétrica da bureta ao longo da sua escala gama operacional. Para isso foram calculados os incrementos de volume ( $dV$  e  $dV^*$ ) e de seguida o quociente  $dV/dV^*$  que se espera ser unitário ao longo da escala operacional da bureta. Na figura (4.2) encontra-se representado o quociente de incrementos de volume em função do seu índice de valor calculado.



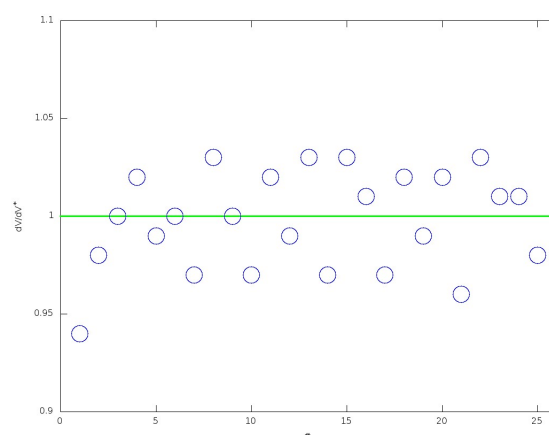


Figura 4.2: Representação do quociente de incrementos de volume ( $dV/dV^*$ ) em função do índice de valor calculado. A linha verde horizontal assinala a posição relativa do valor de referência (a unidade) para comparação com os valores representados.

A figura (4.2) evidêcia uma tendência aleatória do posicionamento relativo dos valores de ( $dV/dV^*$ ) em relação ao valor unitário ( linha verde) ao longo da gama analítica da bureta servindo como testemunho de constância da escala de volume. A estimativa média dos quocientes ( $dV/dV^*$ ) deu 0,9969 (0,0050) que por comparação do valor unitário permite obter o valor de teste  $TV = 0,63$  ao qual corresponde um valor de prova  $p[H_0] = 0,537$  o que equivale a dizer que existe constância da escala de volume em toda a sua gama operacional da bureta.

#### 4.2.2 Titulações em meio simples

No primeiro estudo foi avaliada a capacidade de quantificação do EDTA, na ausência de matriz, a diferentes níveis de concentração situados entre 50% e 150% do valor nominal contido na formulação. Os resultados obtidos encontram-se sistematizados na tabela (4.5).

Tabela 4.5: Resultados obtidos na avaliação da quantificação do EDTA por volumetria directa com nitrato de chumbo na gama de concentração de 50 a 150%.

Teor ( % )	$C_{EDTA}$ ( mg/mL )	$V_T - V_0$ ( mL )			$C_{EDTA}^*$ ( mg/mL )			%RE			TV	$p[H_0]$
50	0.1250	8.53	8.49	8.47	0.1253	0.1246	0.1243	0.2	-0.3	-0.6	0.90	0.463
80	0.2001	13.58	13.65	13.62	0.1993	0.2004	0.1999	-0.4	0.1	-0.1	0.72	0.547
100	0.2501	16.93	17.01	16.96	0.2485	0.2497	0.2489	-0.6	-0.2	-0.5	3.02	0.094
120	0.3001	20.34	20.47	20.40	0.2985	0.3005	0.2994	-0.5	0.1	-0.2	1.10	0.388
150	0.3751	25.49	25.41	25.74	0.3742	0.3729	0.3778	-0.2	-0.6	0.7	0.09	0.936

$C_{EDTA}$  - valor nominal teórico estimado com base na preparação dos padrões de EDTA;  $C_{EDTA}^*$  - concentração determinada experimentalmente por volumetria;  $V_T - V_0$  - volume corrigido; %RE - erro relativo; TV - valor teste calculado;  $p[H_0]$  - valor de prova (estimativa da probabilidade de aceitação da  $H_0$  assumindo  $H_0 : \%RE = 0$ ).

Em cada nível de concentração (teor) testada da tabela 4.5, foi avaliada a eventual presença de valores discrepantes através do teste de grubbs e não foram identificados valores discrepantes ao nível de confiança de 95%. Assim sendo, todos os valores estão aptos para serem utilizados.

Os resultados da tabela (4.5) permitem-nos afirmar que existe boa exactidão ( $p[H_0] \geq 0.10$ ) na amplitude de concentração relativa de 50 a 150% testada.

Realizando o teste de Fisher para avaliar a homogeneidade da variância na gama de concentração relativa testada verifica-se que existe homogeneidade da variância ( $TV = 24.47$ ;  $F_{0.05(2,2)}^b = 39.00$ ;  $p[H_0] = 0.079$ ).

Dentro desta escala de concentração relativa testada, o teste de Cochran revela que a variabilidade é constante ( $p[H_0] \geq 0.05$ ).

Realizando o teste ANOVA de factor único (concentração encontrada) com 5 níveis de concentração e 3 réplicas por nível, verifica-se que existe efeito do nível de concentração ( $TV = 16230.95$  que corresponde a  $p[H_0] = 0.000$ ) - este resultado permite confirmar que o valor estimado para a concentração depende do teor de analito considerado.

Para verificar se esta dependência é directamente proporcional ao teor de analito considerado subtraiu-se o valor da concentração real ( $C_{EDTA}$ ) à estimada ( $C_{EDTA}^*$ ) e voltou-se a realizar o teste ANOVA tendo sido obtidos  $TV = 0.27$  e  $p[H_0] = 0.892$  - agora não foi identificado o factor concentração o que revela haver uma dependência directa do valor estimado em relação ao teor do analito na amostra.

Para avaliar se a exactidão se mantém constante dentro desta escala analítica, vamos realizar também o estudo ANOVA mas agora sobre a exactidão. Este novo estudo permitiu obter um valor de prova de 0.187, o que revela uma boa exactidão dentro da escala de concentração analisada. De modo similar, a variabilidade média da exactidão é de 0.42 o que corresponde a um intervalo de confiança  $\pm 0.93/\sqrt{N}$  %.

Na figura (4.3) apresenta-se a função de recuperação do método na ausência de matriz da amostra através da representação da concentração estimada ( $C_{EDTA}^*$ ) em função da concentração nominal ( $C_{EDTA}$ ) da respectiva amostra.

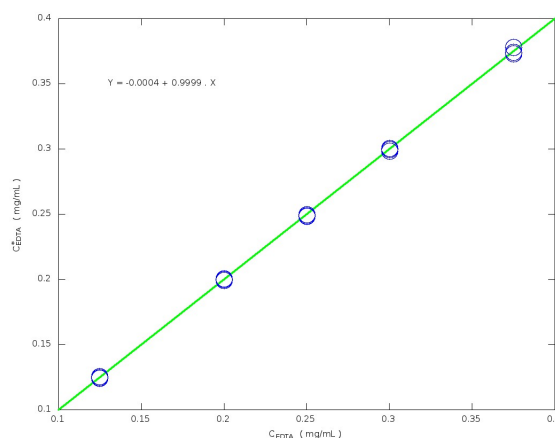


Figura 4.3: Representação dos valores estimados ( $C_{EDTA}^*$ ) em função da concentração nominal ( $C_{EDTA}$ ) do analito. A linha verde representa a função de recuperação.

Ao ajustar um polinómio de primeiro grau (linha verde sobreposta aos valores experimentais) obteve-se

$$C_{EDTA}^* = -0.0004 + 0.9999 \cdot C_{EDTA} \quad (4.10)$$

Esta função de recuperação permite-nos avaliar se existe algum erro sistemático significativo ao nível de erro sistemático constante (ordenada na origem não nula) ou erro sistemático proporcional (declive não unitário) fazendo a comparação directa entre as estimativas de  $b_0$  e  $b_1$  com 0 e 1, respectivamente.

Da função de recuperação estimada, a ordenada na origem deu  $b_0 = -0.0004$  (0.0010) que, por comparação directa com o valor zero, conduziu ao valor de teste  $TV = 0.46$ . O respectivo valor de prova de ( $p[H_0] = 0.654$ ) evidencia que a ordenada na origem é nula indicando, deste modo, que não existe erro sistemático constante. Já para o declive obteve-se a estimativa  $b_1 = 0.9999$  (0.0036); comparando-a com o valor unitário surge um valor de teste  $TV = 0.03$  que corresponde ao valor de prova de  $p[H_0] = 0.978$ , evidenciando que este parâmetro coincide estatisticamente com o valor unitário e, deste modo, demonstrando que não existe erro sistemático proporcional.

Não estando presentes as contribuições de erro sistemático pode-se então afirmar que, na gama analítica testada, não foi detectado erro sistemático para a quantificação do EDTA em meio simples, na ausência da matriz da amostra.

A função de recuperação ajustada permite ainda prever os limiares analíticos referentes à detecção e à quantificação. Não havendo neste caso réplicas de branco e sabendo que a ordenada na origem é estatisticamente nula, os limiares analíticos calculados com base no erro do ajuste ( $\sigma_{fit}$ , equações (2.56) e (2.60)) conduzem aos valores  $X_{LD} = 0.0032$  mg/mL e  $X_{LQ} = 0.0095$  mg/mL para a determinação na ausência de excipiente.

### 4.2.3 Titulações na presença da matriz

Foram também realizados ensaios similares mas agora na presença da matriz do fármaco. Os resultados obtidos encontram-se sistematizados na tabela (4.6).

Tabela 4.6: Valores das titulações efectuadas a diferentes níveis de concentração de EDTA, na presença de matriz.

Teor (%)	$V_T - V_0$ (mL)			$C_{EDTA}^*$ (mg/mL)			$C_{EDTA}$ (mg/mL)			%RE			TV	$pH_0$	
0	0.04	0.01	0.05	0.0006	0.0001	0.0008	0.0000	0.0000	0.0000						
80	13.64	13.53	13.63	0.2002	0.1986	0.2001	0.2503	0.2482	0.2502	0.0	0.2	0.0	0.41	0.725	
100	16.93	16.84	17.12	0.2485	0.2472	0.2513	0.2485	0.2472	0.2513	0.3	0.0	0.2	1.92	0.195	
120	20.36	20.24	20.26	0.2988	0.2971	0.2974	0.2490	0.2476	0.2478	1.3	-0.2	-0.1	0.69	0.560	

$C_{EDTA}^*$  - valor nominal teórico estimado com base na preparação dos padrões de EDTA;  $C_{EDTA}$  - concentração determinada experimentalmente por volumetria;  $V_T - V_0$  - volume corrigido; %RE - erro relativo; TV - valor teste calculado;  $pH_0$  - valor de prova (estimativa da probabilidade de aceitação da  $H_0$  assumindo  $H_0 : \%RE = 0$ ).

Os resultados da tabela (4.6) permitem-nos avaliar diversas questões.

Em cada nível de concentração (teor) testada da tabela 4.6, foi avaliada a eventual presença de valores discrepantes através do teste de Grubbs e não foram identificados valores discrepantes ao nível de confiança de 95%. Assim sendo, todos os valores estão aptos para serem utilizados.

A primeira delas é a estimativa do volume de correcção ( $V_0$ ) do ponto termo da titulação devido ao erro de viragem do indicador. Dado que na tabela já temos os valores corrigidos, a estimativa do volume gasto no branco (Teor = 0%) dá  $V_{0\%} = 0.033$  (0.021); comparando esse volume com o valor zero (assumindo como hipótese nula uma correcção bem feita) obteve-se o valor de teste  $TV = 2.77$  que corresponde a um valor de prova de  $p[H_0] = 0.109$  indicando que existe concordância estatística ou seja, o volume de correcção estipulado anteriormente está correcto.

Os ensaios em branco na presença de excipiente permitem-nos averiguar se existe alguma interferência na determinação provocada pela matriz. As estimativas de concentração obtidas são  $C_0 = 0.00050$  (0.00036) mg/mL; comparando esta estimativa com o valor zero obtém-se  $TV = 2.40$  o que corresponde a  $p[H_0] = 0.138$  sugerindo que o valor do branco se pode considerar como nulo, ou seja, a matriz da amostra não introduz erro sistemático.

Com base nos resultados da tabela (4.6), podemos afirmar que na gama analítica testada (teor a variar entre 80-120%) existe boa exactidão já que utilizando a ANOVA de factor único aplicada ao estudo do erro relativo (%RE) dos três níveis de concentração (80, 100 e 120%) com três réplicas cada, permitiu obter o valor teste  $TV = 0.28$  correspondente ao valor de prova  $p[H_0] = 0.767$ . A elevada probabilidade obtida no valor de prova indica que não existem diferenças significativas entre os níveis de concentração testados. Olhando agora a cada nível *per-si*, e aplicando o teste t-student respectivo, obtém-se valores de prova 0.725, 0.195 e 0.560 referentes à comparação do erro relativo com o valor zero nos níveis de concentração 80, 100 e 120%. Assim sendo, pode-se então dizer, uma vez mais, que existe boa exactidão, uma vez que ficou demonstrado que, em qualquer nível de concentração avaliada, o desvio sistemático estimado com base no erro relativo (%RE) é estatisticamente nulo.

A estimativa da dispersão puramente aleatória do erro relativo, estimada através da ANOVA, deu  $\sigma_{pe} = 0.51$  o que corresponde a um intervalo de confiança para o erro relativo de  $1.2/\sqrt{N}$  % (onde  $N$  representa o número de réplicas envolvidas na estimativa).

Olhando agora à dispersão da estimativa das concentrações de EDTA, realizando o teste de Cochran aos três níveis de concentração com três réplicas por nível obtém-se o valor teste  $TV = 0.562$  que é inferior ao valor crítico tabelado 0.87 (ver tabela (A.2) do apêndice), ficando assim demonstrado a homogeneidade da variância na determinação da concentração do EDTA na presença de matriz, ao nível de concentrações 80, 100 e 120%. Aplicando o teste de Fisher para avaliar a homogeneidade da variância na gama de concentração relativa em estudo verifica-se que existe homogeneidade da variância ( $TV = 14.97$ ;  $F_{0.05(2,2)}^b = 39.00$ ;  $p[H_0] = 0.063$ ).

Importa agora avaliar a dependência do valor estimado para a concentração em relação ao teor em análise. Realizando o teste ANOVA de factor único sobre a concentração determinada experimentalmente ( $C_{EDTA}^*$ ), verifica-se que existe efeito do nível de concentração ( $TV = 3601.3$  que corresponde a  $p[H_0] = 0.000$ ) - este resultado permite confirmar que o valor estimado para a concentração depende do teor de analito considerado. Para verificar se esta dependência é directamente proporcional ao teor do analito considerado subtraiu-se o valor da concentração real ( $C_{EDTA}$ ) à estimada ( $C_{EDTA}^*$ ) e voltou-se a realizar o teste ANOVA tendo sido obtido um valor de teste  $TV = 0.31$  que corresponde a um elevado valor de prova ( $pH_0 = 0.745$ ). Como agora não foi identificado como significativo o factor concentração isto evidencia que há uma dependência directa do valor estimado ( $C_{EDTA}^*$ ) em relação ao teor do analito presente na amostra ( $C_{EDTA}$ ).

Na figura encontra-se representada a função de recuperação referente à determinação da concentração do EDTA ( $C_{EDTA}^*$ ) em função da concentração teórica ( $C_{EDTA}$ ).

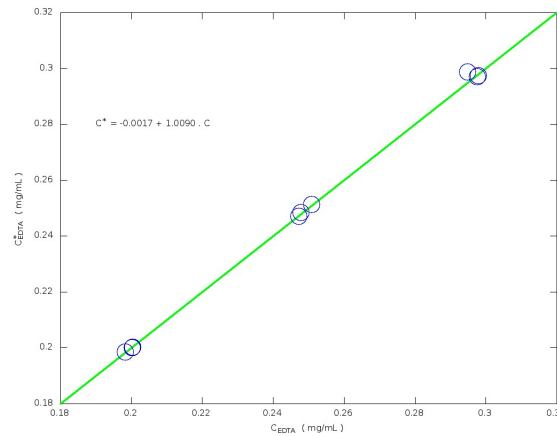


Figura 4.4: Representação da função de recuperação referente à determinação da concentração do EDTA ( $C_{EDTA}^*$ ) em função da concentração teórica ( $C_{EDTA}$ ).

Na figura (4.4) está representada a recta de ajuste dos valores experimentais cuja a equação é:

$$C_{EDTA}^* = -0.0017 + 1.0090 \cdot C_{EDTA} \quad (4.11)$$

Para avaliar a presença de desvios sistemáticos terão de ser feitos testes estatísticos aos parâmetros desta função de recuperação. Comparando a estimativa da ordena na origem ( $b_0 = -0.0017 (0.0029)$ ) com o valor zero, obtém-se o valor de teste  $TV = 0.60$  que corresponde ao valor de prova  $p[H_0] = 0.567$  - este parâmetro é estatisticamente nulo o que corresponde dizer que não existe erro sistemático constante. Comparando agora o declive ( $b_1 = 1.009 (0.012)$ ) com o valor unitário obtém-se o valor de teste  $TV = 0.78$  que corresponde ao valor de prova  $p[H_0] = 0.461$  - está demonstrado também que não existe erro sistemático proporcional.

Usando os valores de concentração estimados para o branco de amostra (ensaio na presença da matriz da amostra), ver tabela (4.6), e a equação (2.54) na página 36, fica-se com a estimativa  $C_o = 0.0005 (0.0004)$  que permite chegar aos limiares analíticos  $X_{LD} = 0.0017$  mg/mL e  $X_{LQ} = 0.0041$  mg/mL.

Usando agora a função de recuperação ajustada para estimar os limiares analíticos com base no erro do ajuste ( $\sigma_{fit}$ , equações (2.56) e (2.60)) obtém-se os valores  $X_{LD} = 0.0048$  mg/mL e  $X_{LQ} = 0.015$  mg/mL para a determinação na presença de matriz.

Comparando estas estimativas, verifica-se que o limite de quantificação obtido com o branco de amostra é próximo do valor do limite de detecção proveniente da estimativa obtida através da função de recuperação - os limiares obtidos através da função de recuperação são superiores aos obtidos com base no branco de amostra.

Comparando ainda com os limiares analíticos obtidos anteriormente, secção na página 59, na ausência de matriz (0.0039 e 0.013 mg/mL, respectivamente) estas estimativas são praticamente idênticas às obtidas com a função de recuperação no caso da matriz de amostra estar presente.

O facto de as estimativas obtidas através da função de recuperação serem concordantes entre si revelam que a matriz não interfere ao nível dos limiares analíticos nesta quantificação. Os respectivos valores médios são  $X_{LD} = 0.0044$  e  $X_{LQ} = 0.014$  mg/mL, respectivamente.

Pensamos que as estimativas estão muito inflacionadas em relação ao valor obtido com o branco de amostra ( $X_{LD} = 0.0017$  mg/mL e  $X_{LQ} = 0.0041$  mg/mL) porque a função de recuperação foi apenas avaliada numa gama de concentração muito alta (50 a 150 e 80 a 120%) relativamente ao valor do branco (teor 0%) resultando esta discrepância essencialmente de um erro de extrapolação - o limite de detecção obtido nestas condições aproxima-se do limite de quantificação obtido com o branco de amostra mas, devido à extrapolação excessiva a segunda estimativa passa a ser cerca de 3.3 vezes superior.

### 4.3 Validação

De seguida iremos verificar os parâmetros de validação do método analítico de acordo com as indicações anteriormente explicitadas na secção (2.3.2).

#### 4.3.1 Identificação

O método volumétrico descrito que se pretende validar apresenta diversas dificuldades analíticas em termos de identificação inequívoca do analito (EDTA) tanto porque na formulação em causa podem estar presentes substâncias que

complexem com o titulante (solução de padrão de nitrato de chumbo (II)) quer porque o EDTA pode complexar com diversos outros catiões.

No que diz respeito à capacidade de se identificar o EDTA e/ou detectar a sua inequívoca presença na amostra através de alguma reacção concreta não cremos que tal facto seja possível. O EDTA tem um comportamento químico muito genérico - por um lado, reage com diversos catiões diferentes sem produzir algum fenómeno físico-químico específico. Por outro lado existem diversos compostos com a mesma capacidade de coordenar este mesmo grupo de catiões. Assim sendo, não existe nenhum fenómeno físico-químico distinguível que permita, através deste, distinguir a presença do EDTA nas amostras.

Ao utilizar um padrão primário de nitrato de chumbo (II), com elevada pureza, este facto garante-nos que, à priori, apenas poderá haver eventual contribuição de outros catiões (na formação de complexos com o EDTA) se estes já estiverem presentes na matriz do produto que se pretende avaliar.

### 4.3.2 Selectividade

Atendendo à falta de selectividade na reacção do EDTA com o titulante (Pb(II)) é natural que o método deixe de ser específico e passe a designar-se de selectivo - o seu grau de selectividade será assim condicionado pela presença de catiões competidores ou complexantes adicionais, presentes na matriz da amostra.

A melhor forma de avaliar a selectividade nas condições do método será através da estimativa do erro sistemático introduzido na resposta analítica por interferência química devida a:

1. outros complexantes que possam reagir preferencialmente com o titulante (solução aferida de Pb(II));
2. outros metais que possam coexistir inicialmente no produto final.

Sobre a primeira situação não estamos muito convencidos de que esta seja possível de ocorrer já que a composição da matriz da amostra é bem conhecida. No sentido de procurar avaliar a selectividade foi realizado um estudo usando uma amostra reconstituída<sup>2</sup> contendo um teor bem conhecido de analito (estipulou-se a concentração de EDTA de 0.2501 mg/mL que corresponde ao nível de concentração de doseamento do EDTA a 100%). Os resultados obtidos estão sistematizados na tabela na página seguinte.

---

<sup>2</sup>A amostra reconstituída consistiu num branco de amostra ao qual foi adicionado um teor bem controlado de analito.

Tabela 4.7: Valores das titulações efectuadas ao mesmo nível de concentração de EDTA, na presença de matriz.

Ensaio	$(V_T - V_0)$ ( mL )	$C_{EDTA}$ ( mg/mL )
A1	16.90	0.2496
A2	16.90	0.2496
A3	16.80	0.2471
A4	16.90	0.2496
A5	16.75	0.2474
A6	16.80	0.2471

$(V_T - V_0)$  - volume corrigido;  $C_{EDTA}$  - concentração determinada experimentalmente por volumetria.

Os resultados permitiram chegar a  $C_{EDTA} = 0.2484 (0.0013)$  mg/mL (correspondente ao doseamento de  $\%C_{EDTA} = 99.32 (0.53)\%$ ).

Confrontando a concentração obtida com o valor de referência (0.2501 mg/mL) através de um teste t-student, o que permitiu obter um valor de teste  $TV = 3.06$ , correspondendo ao valor de prova  $p[H_0] = 0.056$ .

Do estudo apresentado anteriormente com amostras reais, secção 4.2.3 na página 61, já tínhamos também chegado à conclusão de que o desvio sistemático estimado com base no erro relativo ( $\%RE$ ) é estatisticamente nulo, indicando que, nas condições de ensaio do método em questão com amostras reais não existe erro sistemático significativo.

Assim, fica demonstrado que nas condições de ensaio com este tipo de amostra o método é selectivo.

### 4.3.3 Sensibilidade

Traduz a variação da resposta do método ( $\Delta Y$ ) a um incremento do teor do analito ( $\Delta X$ ), ver equação (2.53) 2.53 na página 35 e corresponde ao declive da função de calibração do método analítico.

No caso em concreto, atendendo à expressão da mensuranda, equação (3.1), a variável independente (representada nas abcissas) é a concentração imposta ( $C_{EDTA}$ ) e a respectiva propriedade medida (volume gasto corrigido,  $V_T - V_0$ ) a variável dependente (representada no eixo das ordenadas).

Uma vez que para concentração nula se espera obter volume gasto nulo, a sensibilidade deve corresponder ao declive da recta, que melhor se ajusta aos valores experimentais, com ordenada na origem nula.

Tabela 4.8: Resultados obtidos na avaliação da sensibilidade à determinação do EDTA, efectuada a diferentes níveis de concentração e na ausência de matriz.

Teor ( % )	$C_{EDTA}$ ( mg/mL )	$V_T - V_0$ ( mL )			$C_{EDTA}^*$ ( mg/mL )		
50	0.1250	8.53	8.49	8.47	0.1253	0.1246	0.1243
80	0.2001	13.58	13.47	13.42	0.1993	0.1978	0.1970
100	0.2501	16.93	17.01	16.96	0.2485	0.2497	0.2489
120	0.3001	20.34	20.47	20.40	0.2985	0.3005	0.2994
120	0.3751	25.49	25.41	25.74	0.3742	0.3729	0.3778

$C_{EDTA}$  - valor nominal teórico estimado com base na preparação dos padrões de EDTA;  $V_T - V_0$  - volume corrigido;  $C_{EDTA}^*$  - concentração determinada experimentalmente por volumetria.



Através dos valores da tabela 4.8 pode-se construir a curva de calibração, que está representada na figura 4.5.

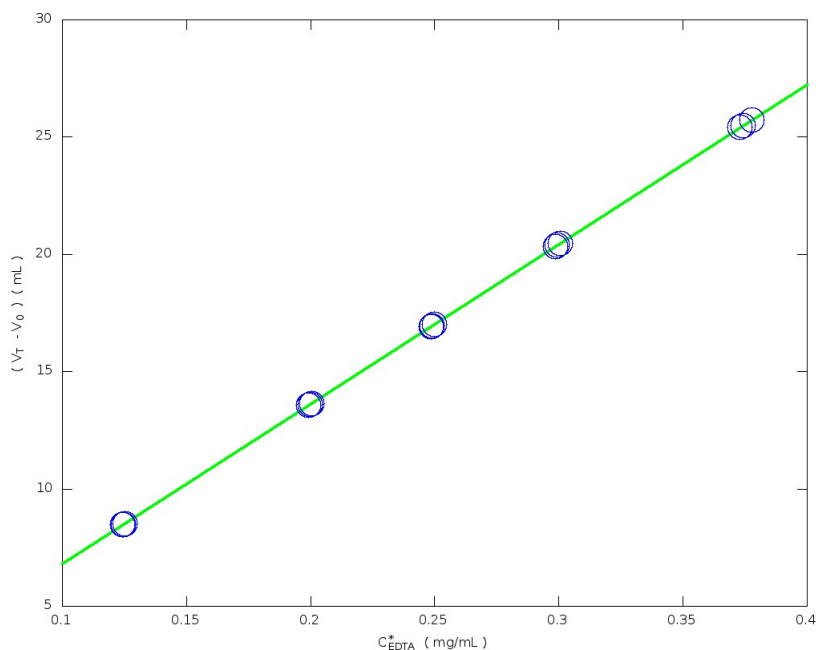


Figura 4.5: Representação da estimativa para a curva de calibração para a gama de 50 a 150% do valor nominal no fármaco.

Pretende-se agora avaliar estatisticamente os parâmetros da recta ( $b_0$  e  $b_1$ ) e calcular a respectiva sensibilidade.

Há duas vias de estimar e testar estes parâmetros: através da verificação de que  $b_0 = 0$  e estimativa da sensibilidade com base no declive  $b_1$  e através dos quocientes  $\left(\frac{V_T - V_0}{C_{EDTA}}\right)$  que devem assumir um valor constante. Contudo, para evitar falsas estimativas, em cada nível de concentração foi previamente avaliada a eventual presença de valores discrepantes através do teste de Grubbs não tendo sido identificados valores anómalos ao nível de confiança de 95%.

Do ajuste com  $P01$ , equação (2.48) na página 28, obteve-se as estimativas  $b_0 = -0.046$  (0.039) em mL e  $b_1 = 67.83$  (0.15) em  $\text{mg}^{-1}$ <sup>3</sup>. Comparando a ordenada na origem com o valor zero, obteve-se um valor teste de  $TV = 1.18$  sendo o respectivo valor de prova  $p[H_0] = 0.260$  - este valor alto de probabilidade permite concluir que a ordenada na origem é efectivamente nula. Quanto à sensibilidade, o valor obtido é também estatisticamente concordante com a constante da respectiva mensuranda  $68.13$  mL/mg ( $TV = 2.01$ ,  $p[H_0](b_1 = 68.13) = 0.065$ ) tendo-se obtido um valor de prova ( $p[H_0] = 0.065$ ) aceitável já que ultrapassa o valor de referência 0.05. As estimativas obtidas através de  $P01$ , apontam para

<sup>3</sup>Dado que a variável dependente ( $V_T - V_0$ ) se encontra expressa em (mL) e a variável independente ( $C_{EDTA}$ ) em (mg/mL), a sensibilidade  $dY/dX$  será dada em função de  $\text{mg}^{-1}$ .

um intervalo de confiança de 0.32 em relação à estimativa  $b_1$ , o que significa que estes valores podem oscilar entre 67.51 e 68.15 sendo o valor considerado verdadeiro 68.1288 mL/mg, revelando uma vez mais que existe boa exactidão.

Utilizando agora uma segunda abordagem, dos 15 quocientes estimados ( $\frac{V_t - V_0}{C_{EDTA}}$ ), obteve-se a média 68.096 o que corresponde a um erro relativo de  $\% = 0.1\%$ ; o intervalo de confiança a 95% tem a amplitude de 0.13 correspondendo à gama de valores situada entre 67.97 e 68.23 mL/mg, que abrange o valor teórico previsto (68.1288 mg<sup>-1</sup>).

Este estudo permitiu-nos concluir que não existe erro sistemático constante, os valores obtidos pelo método ( $V_t - V_0$ ) são linearmente dependentes da concentração do analito, a sua sensibilidade do método coincide com o valor previsto pela expressão da mensuranda (68.1288mL/mg).

#### 4.3.4 Limiares analíticos

Os limiares analíticos traduzem o teor mínimo de analito que pode ser avaliado, em determinadas condições, recorrendo a um certo equipamento e método analítico. Os limiares analíticos mais relevantes são o limite de detecção ( $X_{LD}$ ) e o limite de quantificação ( $X_{LQ}$ ).

Na secção (4.2.3), (4.2.3), foi estimada com base em brancos de amostra os valores  $X_{LD} = 0.0017$  mg/mL e  $X_{LQ} = 0.0041$  mg/mL que acreditamos serem os mais plausíveis já que as estimativas obtidas pela via da função de recuperação conduziu a valores inflacionados.

#### 4.3.5 Linearidade e gama analítica

A gama analítica expressa o intervalo de concentração em que o analito gera uma resposta instrumental que é proporcional ao seu teor. O extremo inferior corresponde ao limite de quantificação ( $X_{LQ}$ ) enquanto que o extremo superior corresponde ao valor do teor do padrão que gera uma resposta inequívoca e proporcional<sup>4</sup>.

A melhor forma de testar a linearidade da resposta analítica trata-se de testar o ajuste dos valores experimentais com um polinómio de 2º grau (P012) e comparar estes resultados com os referentes obtidos com o polinómio de 1º grau (P01), ver resultados da tabela (4.9).

Tabela 4.9: Resultados obtidos para os ajustes dos valores experimentais aplicando um polinómio de primeiro grau (P01) e um polinómio de segundo grau (P012).

	P01	P012
SS	0.0309	0.0240
$\nu$	13	12
$\sigma_{fit}^2$	0.0024	0.0020

P01- ajuste polinomial de primeiro grau; P012 - ajuste polinomial de segundo grau; SS - soma de quadrados;  $\nu$  - graus de liberdade;  $\sigma_{fit}^2$  - variância do ajuste.

Comparando os valores obtidos na tabela (4.9), o valor de teste dá  $TV = 3.45$  o que corresponde a um valor de prova de  $pH_0 = 0.088$  – este resultado indica-

<sup>4</sup>Em termos práticos, o extremo superior da curva de aferição encontra-se definido pelas limitações da saturação do detector ou transdutor do sinal instrumental.

nos que há uma probabilidade bastante apreciável (aproximadamente de 10%) para a hipótese nula ser válida, ou seja, ambos modelos ( $P01$  e  $P012$ ) ajustam de modo similar os valores experimentais. Assim sendo, o melhor modelo será aquele que tem maior número de graus de liberdade, que neste caso é o  $P01$ . Desta forma, fica demonstrado que a resposta é linear, a gama analítica com resposta linear fica então definida pelo valor mínimo quantificável ( $X_{LQ}$ ) e pelo valor do padrão de maior concentração, ou seja, de 0.014 a 0.375 mg/mL, respectivamente.

### 4.3.6 Precisão

A precisão traduz a coerência dos resultados obtidos em relação ao valor central estimado. Esta costuma ser estimada em termos de repetibilidade ( $s_r$ ), reprodutibilidade ( $s_R$ ) ou precisão intermédia ( $s_I$ ).

Neste estudo procurou-se estimar a repetibilidade do ensaio usando amostras reconstituídas resultantes da adição de um teor bem conhecido de analito (100% = 0.2501 mg/mL) à matriz (placebo). Os dados obtidos estão sistematizados na tabela (4.10).

Tabela 4.10: Dados relativos ao ensaio para a repetibilidade.

Ensaio	$V_T - V_0$ ( mL )	$C_{EDTA}$ ( mg/mL )	%RI ( % )
E1	17.04	0.2501	100.0
E2	16.89	0.2479	99.1
E3	16.96	0.2489	99.5
E4	17.05	0.2502	100.1
E5	16.96	0.2490	99.6
E6	17.01	0.2497	99.9

$C_{EDTA}^*$  - concentração determinada experimentalmente por volumetria;  $(V_T - V_0)$  - volume corrigido; %RI - taxa de recuperação.

Os resultados da tabela (4.10) conduziram ao teor estimado de % $C_{EDTA} = 99.70$  (0.35)%. Por comparação com o valor de referência respectivo obteve-se um valor de teste de  $TV = 2.14$ , correspondendo a  $p[H_0] = 0.086$  evidenciando boa concordância.

A estimativa obtida para a concentração foi de 0.24931 (0.00087,  $\nu = 5$ ) mg/mL, sendo a repetibilidade estimada de 0.00087 mg/mL, o que corresponde a uma imprecisão relativa de 0.3%.

Anteriormente, secção (4.2.2) na página 59, tinha sido estimada a repetibilidade dentro da gama analítica 50-150%, na ausência da matriz, como sendo 0.0014 ( $\nu = 10$ ). Comparando estas estimativas (teste de Fisher bilateral) obteve-se o valor teste  $TV = 2.59$  correspondendo ao valor de prova de  $p[H_0] = 0.305$ . Deste modo ficou demonstrado que a matriz não afecta a precisão.

No sentido de procurar avaliar a precisão intermédia referente ao efeito de analista fez-se a comparação dos resultados obtidos em 6 determinações (réplicas da mesma amostra) com dois analistas distintos, realizando os ensaios no mesmo

dia e em condições similares. Os resultados obtidos neste estudo encontram-se sistematizados na tabela (4.11).

Tabela 4.11: Resultados obtidos relativos ao ensaio de estimativa da precisão intermédia devida ao efeito do analista.

Analista	$C_{EDTA}$ (mg/mL)					
$A_1$	0.2493	0.2476	0.2469	0.2489	0.2465	0.2478
$A_2$	0.2495	0.2493	0.2493	0.2474	0.2493	0.2485

$A_1$  e  $A_2$  - identificação dos analistas 1 e 2, respectivamente;  $C_{EDTA}$  - concentração determinada experimentalmente por volumetria.

A análise ANOVA não permitiu evidenciar efeito do factor analista ( $p[H_0] = 0.084$ ), por isso esta incerteza não pode ser estimada.

Já ao nível da reprodutibilidade não há informação para esta estimativa, uma vez que não foram ainda realizados estudos interlaboratoriais neste sentido.

### 4.3.7 Exactidão

A exactidão traduz a proximidade da estimativa obtida (valor central) em relação ao valor real (ou considerado como tal). Em termos de validação do método pretende-se verificar qual a ordem de grandeza do erro sistemático cometido e verificar se este é estatisticamente significativo quando comparado com a precisão que lhe está associada.

Este estudo consistiu na avaliação da exactidão ao nível dos resultados no meio sem matriz, secção (4.2.2) na página 59, e com a presença de matriz, secção (4.2.3) na página 61.

Na ausência de matriz e aplicando o teste t-student sobre os resultados da tabela (4.5) permite-nos afirmar que existe boa exactidão ( $p[H_0] \geq 0.10$ ) na amplitude de concentração relativa testada (situada na gama 50 a 150%). Estes resultados foram confirmados através do estudo ANOVA tendo-se obtido um valor de prova de  $p[H_0] = 0.187$ , o que revela uma boa exactidão dentro da escala de concentração analisada.

O mesmo estudo estatístico, mas agora na presença de matriz, suportado pelos resultados da tabela (4.6).

Efectuando o teste t-student sobre os resultados referentes a cada um dos níveis de concentração indicados na tabela (4.6) permite-nos afirmar que existe boa exactidão ( $p[H_0] \geq 0.20$ ) na amplitude de concentração relativa de 80 a 120% testada. A análise ANOVA de factor único aplicada ao estudo do erro relativo (%RE) dos três níveis de concentração (80, 100 e 120%) com três réplicas cada, permitiu obter o valor teste  $TV = 0.28$  ao qual corresponde o valor de prova  $p[H_0] = 0.767$ , indicando que não existe diferenças entre níveis de concentração (a exactidão é concordante).

Estes resultados apontam para uma boa exactidão do método, uma vez que comparando os erros relativos com o valor zero estes são estatisticamente nulos, revelando, em ambos os casos, que a presença ou ausência desta matriz não afecta os resultados.

### 4.3.8 Robustez

A robustez avalia a capacidade do método analítico em conduzir ao mesmo valor estimado após alteração deliberada de um certo conjunto de condições experimentais. No caso de o resultado final (teor) estimado ser independente do valor imposto para determinada condição experimental o método diz-se robusto no que respeita a esse factor experimental.

Para avaliar o impacto da temperatura e luminosidade ambiente sobre a solução de titulante (padrão de Pb(II)) foi realizado um estudo comparativo, de curta duração, que compara o efeito do armazenamento do titulante na bancada (à temperatura ambiente ( $22 \pm 2$  °C) e exposto à luminosidade ambiental do laboratório) e em local refrigerado (dentro do frigorífico, à temperatura aproximada de 5 °C e em local escuro) usando como referência a mesma solução de placebo acrescida do EDTA, preservada em ambiente refrigerado e no escuro. Os resultados encontram-se sistematizados na tabela (4.12).

Tabela 4.12: Dados relativos ao ensaio para a determinação da robustez comparando duas situações de armazenamento do titulante: na bancada (na presença de luz ambiente, à temperatura da ordem de  $22 \pm 2$  °C) e no frigorífico (no escuro, à temperatura de 5 °C).

Tempo (Horas)	$V_T - V_0$ ( mL )			$C_{EDTA}$ ( mg/mL )		
	0	24	96	0	24	96
Bancada	16.76	16.86	16.81	0.2460	0.2475	0.2467
Frigorífico	16.76	16.81	16.92	0.2460	0.2467	0.2484

( $V_T - V_0$ ) - volume de titulante gasto e corrigido;  $C_{EDTA}$  - concentração determinada experimentalmente por volumetria.

Realizando a avaliação da concentração, através da análise ANOVA de duas vias, obteve-se os valores de prova 0.713 e 0.364 para a equivalência de condições entre linhas (tipo de armazenamento da solução de titulante que corresponde a um efeito combinado da temperatura e da luminosidade) e entre colunas (efeito temporal), respectivamente. Ficou assim demonstrado que o titulante preserva a sua concentração quer na bancada ou no frigorífico pelo período de pelo menos 4 dias.

Com este ensaio fica demonstrada a robustez da estabilidade da solução de titulante (nitrato de chumbo (II) a 1.00 mM) em função do tempo de armazenamento no período de quatro dias.

### 4.3.9 Coerência

A coerência avalia a capacidade do método analítico em conduzir ao mesmo valor estimado sem ter imposto qualquer alteração deliberada de condições experimentais.

Regra geral assume-se um período largo (superior a 6 meses) para avaliar esta propriedade o que não foi possível concretizar.

Contudo, o estudo da robustez pelo período máximo de 4 dias permitiu evidenciar que o efeito temporal não possui efeito sobre a concentração do titulante.

## 4.4 Incerteza global

No sentido de avaliar a incerteza global da determinação foram adoptadas duas abordagens distintas - a clássica (bottom-up) e a simulação de Monte-Carlo.

Na figura (4.6) esboça-se o procedimento utilizado na quantificação do teor de EDTA.

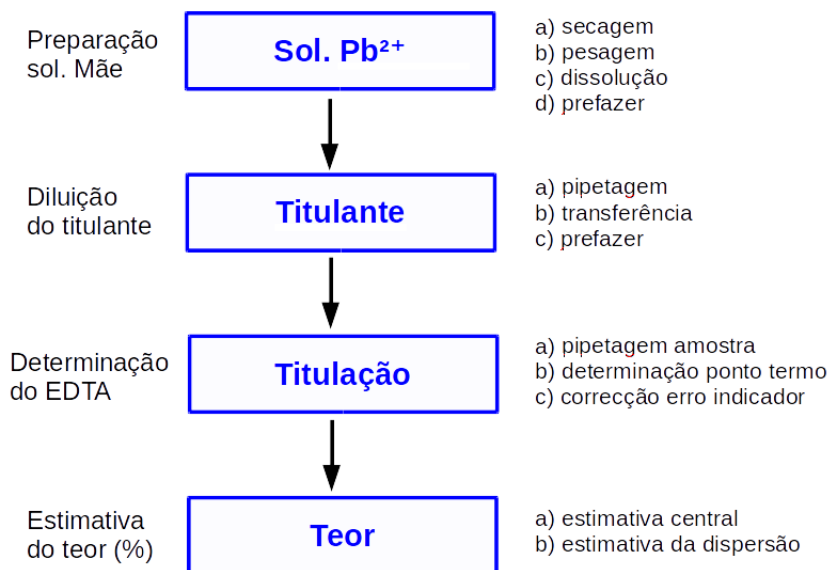


Figura 4.6: Diagrama representativo do processo de quantificação do teor de EDTA: o início do processo consiste na preparação da solução mãe de titulante, a sua diluição para obter uma concentração mais adequada à amostra. Após a preparação da bureta, faz-se um ensaio em branco. De seguida a amostra é recolhida e faz-se a titulação nas mesmas condições.

O procedimento experimental pode ser revisto, passo a passo da seguinte forma:

1. Preparação da solução mãe de Pb(II)  $C_0 = 100.0$  mM - pesou-se ( $\Delta m = (m - m_0) = (34.7237 - 18.2214)$  g) 16.5023 g de nitrato de chumbo (331.22 g/mol, 99.7% puro,  $P = 0.9985 [\pm 0.0015]$ ) para um balão de  $V_1 = 500.0 [\pm 0.20]$  mL e dissolveu-se com água purificada;

$$C_0 = \left( \frac{(m - m_0) \cdot P}{M \cdot V_1} \right) = \left( \frac{\Delta m \cdot P}{M \cdot V_1} \right) \quad (4.12)$$

2. Diluição do titulante Pb(II) 1.000 mM e estimativa de  $F_c$  - pipetagem de 10.00  $[\pm 0.020]$  mL para um balão de diluição de 1000  $[\pm 0.30]$  mL;

$$F_c = \frac{C_{Pb}}{1.000} = \left( \frac{\Delta m \cdot P}{M \cdot V_1} \right) \times \left( \frac{v_2}{V_3} \right) \quad (4.13)$$

3. Pipetagem de 25.00  $[\pm 0.030]$  mL de amostra para um matraz e adição de outros reagentes (acidificador, indicador,...)

4. Titulação - 6 réplicas de amostra ( $v_T \simeq 17.25$  mL) e de branco ( $v_0 \simeq 0.41$  mL) para estimar o volume corrigido ( $\Delta v = v_T - v_0$ );
5. Estimativa da concentração;

$$C_{EDTA} = K \times \left( \left( \frac{1}{Rec} \right) \times \left( \frac{(v_T - v_0) \times Fc}{v_A} \right) \right) = K \times \left( \frac{\Delta v \times Fc}{Rec \times v_A} \right) \quad (4.14)$$

onde  $K = 0.3722$  é um factor de conversão de moles de nitrato de chumbo (II) em massa de EDTA e  $Rec$  traduz a taxa de recuperação encontrada e os restantes termos têm o mesmo significado da equação (3.1);

6. Estimativa do título.

$$\%C_{EDTA} = 100 \times \left( \frac{C_{EDTA}}{C_{Ref}} \right) \quad (4.15)$$

sendo a concentração de referência  $C_{Ref} = 0.02490$  mM. De seguida iremos detalhar cada um dos termos nas suas contribuições individualizadas.

A mensuranda, equação (4.15), é uma expressão intrincada pode ser reescrita da seguinte forma

$$\%C_{EDTA} = \left( \frac{37.22}{C_{ref}} \right) \times \left( \left( \frac{1}{Rec} \right) \times \left( \frac{\Delta v}{v_A} \right) \times \left( \frac{v_2}{V_3} \right) \times \left( \frac{\Delta m \cdot P}{M \cdot V_1} \right) \right) \quad (4.16)$$

onde o termo constante resulta de  $100 \times K = 37.22$ .

Desta última expressão destaca-se que há quatro grandes causas para a incerteza global:

1. a preparação da solução mãe com base na pesagem ( $m - m_0$ ), pureza ( $P$ ), massa molar ( $M$ ) e voluma ( $V_1$ ),  $\left( \frac{\Delta m \cdot P}{M \cdot V_1} \right)$ ;
2. a diluição da solução mãe e estimativa do factor de correcção,  $\left( \frac{v_2}{V_3} \right)$ ;
3. o processo da volumetria com a amostragem ( $v_A$ ) e correcção do volume de equivalência ( $v_T - v_0$ ),  $\left( \frac{\Delta v}{v_A} \right)$ ;
4. correcção da concentração e a recuperação do ensaio,  $\left( \frac{Fc}{Rec} \right)$ .

#### 4.4.1 Abordagem bottom-up

Da equação (4.16) identificam-se quatro contribuições para a incerteza global: preparação da solução mãe, diluição, titulações e correcção atendendo à recuperação e concentração esperada.

##### 4.4.1.1 Preparação da solução mãe

O procedimento inicia com a preparação do padrão de chumbo (II). Esta solução foi preparada por pesagem diferencial do sal de nitrato fornecido pela Merck (Pureza > 99.5%, p.a., 4.53 kg/dm<sup>3</sup>).

Após a secagem do sólido (120 °C, 2 horas), pesou-se num pequeno copo de vidro a massa  $m = 34.7237$  g que foi de seguida transferida (via funil de vidro) para o balão de  $V_1 = 500.00 [\pm 0.20]$  mL. Voltou-se a pesar o copo com massa residual tendo-se obtido o valor  $m_0 = 18.2214$  g.

**a) Pesagem**

Em termos de incertezas na dupla pesagem ( $\Delta m = m - m_0$ ) foram identificadas as seguintes contribuições - calibração da balança ( $u(bias)$ ), repetibilidade ( $u(rep)$ ), excentricidade ( $u(exc)$ ), desvio térmico ( $u(T)$ ) e diferença de densidade ( $u(air)$ ):

1. O fabricante da balança (Metler Toledo<sup>5</sup>) reporta um erro máximo de 0.2 mg em toda a escala – assumindo uma distribuição uniforme com amplitude  $a = 0.2$  mg, a incerteza respectiva será  $u(bias) = 0.0002/\sqrt{3} = 0.00012$  g;
2. Com uma massa de 10 g, o fabricante define como erro para a repetibilidade a amplitude  $a = 0.05$  mg – assumindo uma distribuição uniforme, a amplitude devida à repetibilidade vem  $u(rep) = 0.00005/\sqrt{3} = 0.000029$  g; como se trata de uma avaliação única esta incerteza será utilizada como estimativa de erro padrão;
3. Para o erro máximo devido à excentricidade<sup>6</sup> o fabricante reporta uma amplitude máxima de  $a = 0.3$  mg – assumindo uma distribuição uniforme, a incerteza respectiva virá  $u(exc) = 0.0003/\sqrt{3} = 0.00017$  g;
4. O fabricante prevê um erro de descalibração térmica com amplitude  $a = 0.0000015 \times m \times (T - 20)$  – usando um valor aproximado de massa de 35.00 g e sabendo que o laboratório está termostaticado a  $22 \pm 2$  °C, a amplitude térmica máxima no desvio sobre os 20 °C será de apenas 2 °C; assim sendo  $a = 0.00021$ ; considerando uma distribuição triangular<sup>7</sup>, a incerteza virá  $u(T) = 0.00021/\sqrt{6} = 0.000086$  g;
5. desvio devido ao deslocamento de ar – a densidade do padrão primário reportada é da ordem de  $\rho_{solido} = 4.53$  g.cm<sup>-3</sup>; assumindo que a calibração da balança foi realizada com pesos em aço inox ( $\rho_{calib} = 8.00$  g.cm<sup>-3</sup>) e que o ar do laboratório apresenta uma densidade média de  $\rho_{ar} = 1.2 \times 10^{-3}$  g.cm<sup>-3</sup> a correcção da massa<sup>8</sup> devido ao deslocamento do ar terá uma amplitude máxima de assumindo  $m = 35.00$  g, o valor da amplitude máxima virá  $a = 0.00012$  g; assumindo uma distribuição uniforme, a incerteza virá  $u(air) = 0.000067$  g.

Na tabela (4.13) encontra-se sistematizado o cálculo das fontes de incerteza para a dupla pesagem.

Tabela 4.13: Estimativa da incerteza devida à dupla pesagem do nitrato de chumbo (II) para a preparação da solução mãe.

Grandeza	Símbolo	$x$ (g)	$u(bias)$	$u(rep)$	$u(exc)$	$u(T)$	$u(air)$	$u(x)$ (g)	$RSU(x)$
massa total	$m$	34.7237	0.00012	0.000029	0.00017	0.000084	0.000067	0.00024	0.0000068
m. residual	$m_0$	18.2214	0.00012	0.000029	0.00017	0.000084	0.000067	0.00024	0.000013
m. pesada	$\Delta m$	16.5023						0.00033	0.000020

<sup>5</sup>Manual descarregado de [http://physics.ucsd.edu/neurophysics/Manuals/Mettler Toledo/XS Analytical Balances Operating Instructions.pdf]

<sup>6</sup>A excentricidade avalia o efeito da má colocação do peso sobre o prato da balança (assimetria da carga).

<sup>7</sup>Neste caso, estando o ambiente termostaticado, os valores extremos são menos prováveis.

<sup>8</sup>De acordo com os valores publicados pelo gabinete de metrologia do Canadá [http://metrology.burtini.ca/grav\_air.html].



**b) Incerteza na pureza**

O fabricante do padrão primário (Merck) reporta o valor de pureza  $> 99.7\%$  – assumindo uma distribuição uniforme centrada em 0.9985 com a amplitude  $a = 0.0015$  chega-se a uma estimativa da incerteza devida à pureza de  $u(P) = 0.0015/\sqrt{3} = 0.00087$ .

**c) Incerteza na massa molar**

A incerteza na massa molar provém das estimativas de massas atômicas revistas e publicadas periodicamente pela IUPAC.

De acordo com informações recentes [27] a massa atômica dos elementos azoto (*N*), oxigênio (*O*) e chumbo (*Pb*) são, respectivamente, indicadas sob a forma 14.00686 [ $\pm 0.00042$ ], 15.99940 [ $\pm 0.00037$ ] e 207.21 [ $\pm 0.01$ ]. Assumindo que estes valores resultam de um grande número de ensaios e que estão reportados ao nível de confiança de 95%, as incertezas respectivas serão 0.00021, 0.00019 e 0.0050, respectivamente.

Na tabela (4.14) reportam-se os valores utilizados na estimativa da incerteza relacionada com a massa molar.

Tabela 4.14: Estimativa da incerteza associada à massa molar do padrão primário de nitrato de chumbo [1].

Substância	$x$	$a$	$u(x)$	#	$m$	$u(m)$	$RSU$
<i>N</i>	14.00686	0.00042	0.00021	2	28.01371	0.00042	
<i>O</i>	15.99940	0.00037	0.00019	6	95.9964	0.0011	
<i>Pb</i>	207.21	0.01	0.0050	1	207.21	0.0050	
$Pb(NO_3)_2$					331.22011	0.0051	0.000016

**d) Incerteza no volume**

A incerteza relacionada com volume do balão de diluição ( $u(V_1)$ ) está sujeito a contribuições provenientes da calibração ( $u(cal)$ ), repetibilidade ( $u(rep)$ ) e efeito térmico ( $u(T)$ ):

1. o fabricante dos balões (Linex) prevê uma tolerância de  $a = 0.20$  mL no balão de 500.0 mL – assumindo uma distribuição triangular, a incerteza devida à calibração estima-se que seja  $u(cal) = 0.20/\sqrt{6} = 0.082$  mL;
2. quanto à repetibilidade, devido à incapacidade de avaliar com rigor o volume do balão (por pesagem), assumiu-se que esta incerteza era idêntica à da calibração  $u(rep) \simeq 0.082$  mL ( $m = 1$ );
3. a temperatura afecta essencialmente o volume da solução aquosa cujo coeficiente de expansão térmico é  $\alpha_W(T) = 2.4 \times 10^{-4} (\text{°C})^{-1}$  – assumindo que o laboratório está termostatzado a  $22 \pm 2$  °C, a amplitude térmica média do desvio sobre os 20 °C será de apenas 2 °C; para um volume de 500.0 mL a variação máxima de volume respectiva será  $a = 500.0 \times 2.4 \times 10^{-4}(2) = 0.24$  mL; assumindo uma distribuição triangular teremos como estimativa  $u(T) = 0.24/\sqrt{6} = 0.098$  mL
4. A incerteza combinada relacionada com o volume será então

$$u(V_1) = \sqrt{2 \times (0.082)^2 + (0.098)^2} = 0.15 \text{ mL} \quad (4.17)$$

o que corresponde a  $RSU(V_1) = 0.00030$ .

#### > Incerteza combinada na concentração original

Atendendo a este tipo de expressão, a incerteza combinada na concentração mãe virá

$$RSU(C_0) = \sqrt{RSU^2(\Delta m) + RSU^2(P) + RSU^2(M) + RSU^2(V_1)} \quad (4.18)$$

Os resultados relativos à estimativa da concentração da solução mãe de chumbo (II) encontram-se sistematizados na tabela ..

Tabela 4.15: Sistematização dos resultados relativos à estimativa da concentração do padrão primário de chumbo (II).

Variável	$x$	$u(x)$	$RSU(x)$	%Contrib.
$\Delta m$	16.5023	0.00033	0.000020	2.2
$P$	0.9985	0.00087	0.00087	94.5
$M$	331.22011	0.0075	0.00002	2.5
$V_1$	0.50000	0.00015	0.00030	32.7
$C_0$	0.099496	0.000091	0.00092	

Da tabela anterior verifica-se que a maior fonte de incerteza deve-se à relativamente baixa pureza do padrão primário - o valor da incerteza associada à pureza ( $RSU(P) = 0.00087$ ) é muito similar ao do resultado final ( $RSU(C_0) = 0.00092$ ). Esta é de facto dramática já que supera a incerteza relativa proveniente do volume, que costuma ser a maior contribuição nos padrões primários.

#### 4.4.1.2 Diluição da solução

A solução mãe inicial é posteriormente diluída: tomam-se  $v_2 = 10.00 [\pm 0.020]$  mL da solução inicial e transferem-se para um balão de diluição de  $V_3 = 1000 [\pm 0.30]$  mL.

A incerteza introduzida por este processo depende: da pipetagem e de per-fazer o volume até à marca.

##### a) pipetagem

A incerteza no volume de pipetagem depende essencialmente de três contribuições: calibração ( $u(cal)$ ), repetibilidade ( $u(rep)$ ) e efeito térmico ( $u(T)$ ):

1. incerteza devida à calibração – o fabricante do material vidrado (Linex) reporta o valor de  $a = 0.020$  mL; assumindo uma distribuição triangular,  $u(cal) = 0.020/\sqrt{6} = 0.0082$  mL ( $RSU(cal) = 0.00082$ );
2. incerteza devida à repetibilidade – no sentido de caracterizar a incerteza no enchimento do balão relacionada com a repetibilidade estimou-se a variação relativa de volume ( $\Delta m/m \simeq \Delta v_2/v_2$ ) tendo sido obtido um desvio padrão  $u(rep) = 0.021$  mL ( $RSU(rep) = 0.0021$ );
3. incerteza devida à variação de volume – assumindo que o laboratório está termostaticado a  $22 \pm 2$  °C, a amplitude térmica máxima no desvio sobre os 20 °C será de apenas 2 °C; para um volume de 10.00 mL a variação

máxima de volume respectiva será  $a = 10.00 \times 2.4 \times 10^{-4}(2) = 0.0048$  mL; assumindo uma distribuição triangular teremos como estimativa  $u(T) = 0.0048/\sqrt{6} = 0.0020$  mL ( $RSU(T) = 0.00020$ ).

4. A incerteza combinada relacionada com o volume pipetado ( $u(v_2) = 0.023$  mL) será então o que corresponde a  $RSU(v_2) = 0.0023$ .

#### b) ajuste do volume

Ao perfazer o volume final a  $V_3 = 1000.0$  mL, a incerteza introduzida virá afetada pela calibração ( $u(cal)$ ), repetibilidade ( $u(rep)$ ) e efeito térmico ( $u(T)$ ):

1. incerteza devida à calibração – o fabricante do material vidrado (Linex) reporta o valor de  $a = 0.30$  mL; assumindo uma distribuição triangular,  $u(cal) = 0.30/\sqrt{6} = 0.12$  mL ( $RSU(cal) = 0.00012$ );
2. incerteza devida à repetibilidade – não foi possível estimar esta incerteza pelo que foi assumida como sendo igual à estimada para a calibração,  $u(rep) = 0.30/\sqrt{6} = 0.12$  mL ( $RSU(rep) = 0.00012$ );
3. incerteza devida à variação de volume – assumindo que o laboratório está termostaticado a  $22 \pm 2$  °C, a amplitude térmica máxima no desvio sobre os  $20$  °C será de apenas  $2$  °C; para um volume de  $10.00$  mL a variação máxima de volume respectiva será  $a = 1000.0 \times 2.4 \times 10^{-4}(2) = 0.48$  mL; assumindo uma distribuição triangular teremos como estimativa  $u(T) = 0.48/\sqrt{6} = 0.20$  mL ( $RSU(T) = 0.00020$ ).
4. A incerteza combinada relacionada com o volume final ( $u(V_3) = 0.26$  mL) será então o que corresponde a  $RSU(V_3) = 0.00026$ .

#### > Incerteza devida à diluição

Combinando as incertezas do volume pipetado ( $u(v_2) = 0.023$  mL;  $RSU(v_2) = 0.0023$ ) com a do volume final ( $u(V_3) = 0.26$  mL;  $RSU(V_3) = 0.00026$ ) obtêm-se o valor  $RSU(v_2/V_3) = 0.0023$  o que corresponde a  $(v_2/V_3) = 0.010000$  com  $u(v_2/V_3) = 0.000023$ .

#### 4.4.1.3 Titulação

Na titulação pipetam-se  $v_4 = 25.00 [\pm 0.030]$  mL de amostra para um matraz e adicionam-se outros reagentes. Cada determinação decorre da titulação da amostra ( $v_T \simeq 17.25$  mL) e do branco ( $v_0 \simeq 0.41$  mL) para estimar o volume corrigido ( $\Delta v = v_T - v_0$ ).

Neste caso identificam-se fontes de erro associadas à pipetagem de amostragem (calibração, repetibilidade e temperatura) e às duas titulações (calibração, repetibilidade e temperatura).

#### a) Amostragem

A incerteza no volume de amostragem ( $v_A = 25.00 [\pm 0.030]$  mL) depende essencialmente de três contribuições: calibração ( $u(cal)$ ), repetibilidade ( $u(rep)$ ) e efeito térmico ( $u(T)$ ):

1. incerteza devida à calibração – o fabricante do material vidrado (Linex) reporta o valor de  $a = 0.030$  mL; assumindo uma distribuição triangular,  $u(cal) = 0.030/\sqrt{6} = 0.012$  mL ( $RSU(cal) = 0.00049$ );
2. incerteza devida à repetibilidade – no sentido de caracterizar a incerteza da pipetagem relacionada com a repetibilidade estimou-se a variação relativa de volume ( $\Delta m/m \simeq \Delta v_2/v_2$ ) com 10 réplicas tendo sido obtido um desvio padrão  $u(rep) = 0.028$  mL ( $RSU(rep) = 0.0011$ );
3. incerteza devida à variação de volume – assumindo que o laboratório está termostaticado a  $22 \pm 2$  °C, a amplitude térmica máxima no desvio sobre os 20 °C será de apenas 2 °C; para um volume de 25.00 mL a variação máxima de volume respectiva será  $a = 25.00 \times 2.4 \times 10^{-4}(2) = 0.012$  mL; assumindo uma distribuição triangular teremos como estimativa  $u(T) = 0.012/\sqrt{6} = 0.0049$  mL ( $RSU(T) = 0.00020$ ).
4. A incerteza combinada relacionada com o volume pipetado na amostragem ( $u(v_A) = 0.031$  mL) será então o que corresponde a  $RSU(v_A) = 0.0012$ .

#### b) Titulação da amostra

O resultados das titulações foi inspeccionado de forma global – foram realizadas 6 réplicas de titulação da amostra ( $v_T \simeq 17.25$  mL) e 6 de branco ( $v_0 \simeq 0.40$  mL) para estimar o valor do respectivo volume corrigido ( $\Delta v = (v_T - v_0) \simeq 16.85$ ). Os resultados encontram-se na tabela ..

Tabela 4.16: Valores obtidos na avaliação da incerteza relacionada com estimativa do volume corrigido ( $v_T - v_0$ ) através da titulação da amostra ( $v_T$ ) e volume de titulante gasto no ensaio com o branco ( $v_0$ ).

grandeza	réplicas					
$v_T$ (mL)	17.27	17.20	17.24	17.31	17.29	17.22
$v_0$ (mL)	0.39	0.37	0.42	0.44	0.38	0.42
$(v_T - v_0)$ (mL)	16.88	16.83	16.79	16.86	16.91	16.80

Da tabela anterior obteve-se as estimativas  $v_T = 17.254$  (0.041),  $v_0 = 0.404$  (0.029) e  $(v_T - v_0) = 16.845$  (0.047) mL.

O volume corrigido ( $v_T - v_0$ ) apresentará como contribuições de incerteza a calibração ( $u(cal)$ ), a repetibilidade ( $u(rep)$ ) e a dependência térmica ( $u(T)$ ):

1. calibração – a bureta utilizada vem com indicação de erro de  $a = 0.03$  mL; considerando uma distribuição triangular vem para a incerteza de calibração o valor  $u(cal) = 0.03/\sqrt{6} = 0.012$  mL; como a correcção de volume implica duas leituras aleatórias de volume, a incerteza final virá expandida de  $\sqrt{2}$  ou seja,  $u(cal) = 0.017$  mL;
2. repetibilidade – através das estimativas individuais de incerteza em  $v_T$  e  $v_0$  estima-se  $u(rep) = \sqrt{(0.041)^2 + (0.029)^2} = 0.050$  mL que é da mesma ordem de grandeza da que foi estimada por diferença directa de valores; o valor mais correcto será o que é previsto por via estatística,  $u(rep) = 0.050$

mL para ensaio único ( $m = 1$ ) ou  $u(rep) = 0.029$  mL num ensaio em triplicado<sup>9</sup>;

3. efeito térmico - assumindo que o laboratório está termostatzado a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , a amplitude térmica máxima no desvio sobre os  $20^\circ\text{C}$  será de apenas  $2^\circ\text{C}$ ; para um volume de 16.85 mL a variação máxima de volume respectiva será  $a = 16.85 \times 2.4 \times 10^{-4}(2) = 0.0081$  mL; assumindo uma distribuição triangular teremos como estimativa  $u(T) = 0.0081/\sqrt{6} = 0.0033$  mL ( $RSU(T) = 0.00020$ );
4. no computo global teremos uma incerteza  $u(\Delta v) = 0.053$  mL o que corresponde a  $RSU(\Delta v) = 0.0032$  (no caso de  $m = 1$ ); se se considerar os valores resultantes da repetição de 3 titulações  $u(\Delta v) = 0.034$  mL o que corresponde a  $RSU(\Delta v) = 0.0020$  (no caso de  $m = 3$ ).

> **Incerteza da titulação da amostra** A incerteza relativa à titulação da amostra  $(\Delta v/v_A) = 0.6738$  virá então  $u(\Delta v/v_A) = 0.0023$  ( $RSU = 0.0034$ ,  $m = 1$ ) ou  $u(\Delta v/v_A) = 0.0016$  ( $RSU = 0.0024$ ,  $m = 3$ ).

#### 4.4.1.4 Correções

Na estimativa da recuperação foi feito um estudo em triplicado ( $m = 3$ ) em três dias distintos ( $n = 3$ ) tendo sido obtidos os valores da tabela (4.17).

Tabela 4.17: Valores obtidos no ensaio de recuperação em três dias distintos e com determinações em triplicado.

# Dia	Réplicas		
d1	99.1	100.4	99.9
d2	98.8	98.4	99.6
d3	100.1	99.9	100.2

A análise ANOVA de factor único permitiu concluir que os resultados obtidos nos três dias distintos são estatisticamente concordantes ( $\sigma_A^2 = 0.452$ ,  $\sigma_{pe}^2 = 0.260$ ,  $TV = 1.74$ ,  $p[H_0] = 0.253$ ).

Fazendo um teste  $t$ -student a cada dia ( $H_0 : \%RI = 100$ ), obteve-se os valores de  $TV$  0.55, 3.12 e 0.61 que correspondem a valores de prova superiores a 0.05 (0.637, 0.089 e 0.603, respectivamente) indicando que em cada dia a taxa de recuperação obtida é concordante com o valor previsto ( $\%RI = 100$ ), indicando que não há necessidade de fazer correções extras ao resultado obtido.

#### 4.4.1.5 Incerteza combinada

Atendendo à expressão da mensuranda, eq.(4.16) na página 73, e dado que a recuperação não deve ser tomada em conta, a nova expressão da mensuranda passa a ser

$$\%C_{EDTA} = \left( \frac{37.22}{C_{ref}} \right) \times \left( \left( \frac{\Delta v}{v_A} \right) \times \left( \frac{v_2}{V_3} \right) \times \left( \frac{\Delta m.P}{M.V_1} \right) \right) \quad (4.19)$$

<sup>9</sup>A vantagem em fazer ensaios replicados ( $m > 1$ ) consiste em reduzir a incerteza de um factor de  $1/\sqrt{m}$ .

onde  $C_{ref} = 0.0249$  mg/mL.

Na tabela .. encontram-se sistematizados todos os resultados encontrados anteriormente.

Tabela 4.18: sistematização.

Contribuição	unidades	$x$	$u(x)$	$RSU(x)$	$\%RSU(x)$
$\Delta m$	g	16.5023	0.00033	0.000020	0.6
$P$	—	0.9985	0.00087	0.00087	25.3
$M$	g/mol	331.22011	0.0051	0.000015	0.4
$V_1$	L	0.50000	0.00015	0.00030	8.7
$C_0$	mol/L	0.099496	0.000092	0.00092	26.8
$v_2$	mL	10.000	0.023	0.0023	66.9
$V_3$	mL	1000.00	0.26	0.00026	7.6
$(v_2/V_3)$	—	0.010000	0.000023	0.0023	67.3
$\Delta v$	mL	16.845	0.034	0.0020	58.7
$v_A$	mL	25.000	0.031	0.0012	36.1
$(\Delta v/v_A)$	—	0.673800	0.0016	0.0024	68.9
$\%C_{EDTA}$	—	100.21	0.34	0.0034	100.0

Da tabela anterior destaca-se que as operações que mais afectam a incerteza final são a quantificação ( $\Delta v/v_A$ ) e a diluição ( $v_2/V_3$ ). Na figura (4.7) representa-se em detalhe as contribuições relativas ( $\%RSU$ ) de cada uma das 8 fontes de incerteza na expressão da mensuranda, eq.(4.19).

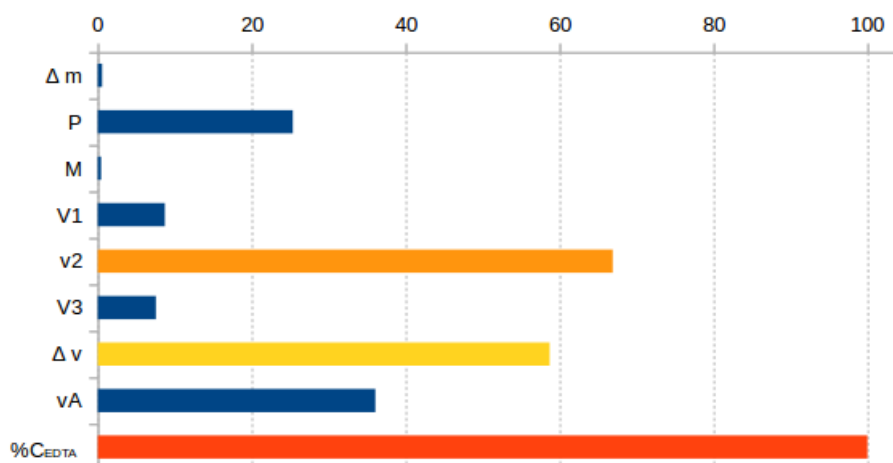


Figura 4.7: Representação das contribuições individualizadas das incertezas relativamente à incerteza final da estimativa.

Da figura anterior verifica-se que a incerteza final vem essencialmente penalizada devido ao pequeno volume pipetado na diluição ( $v_2 = 10.00$  mL) e ao relativamente pequeno volume de titulação ( $\Delta v \simeq 16.85$  mL).

Ainda, de acordo com estes resultados, há possibilidade de reduzir a estimativa da incerteza através *a)* do aumento do número de réplicas ( $m > 3$ ), *b)* uso de maior volume de amostragem ( $v_A$ ) e *c)* o recurso a um padrão de chumbo de maior grau de pureza.

#### 4.4.1.6 Incerteza total

Se se assumir que o valor é para ser reportado a 95% de confiança ( $k = 2$ ) então o resultado final virá

$$\%C_{EDTA} = 100.21 \pm [0.64] \% \quad (4.20)$$

#### 4.4.2 Simulação MC

Com base nos valores encontrados para as 8 variáveis estocásticas que condicionam o valor final da mensuranda ( $\Delta m$ ,  $P$ ,  $M$ ,  $V_1$ ,  $v_2$ ,  $V_3$ ,  $\Delta v$  e  $v_A$ ), eq.(4.19), foi efectuada a simulação de Monte-Carlo de modo a procura validar as estimativas da abordagem “bottom-up”.

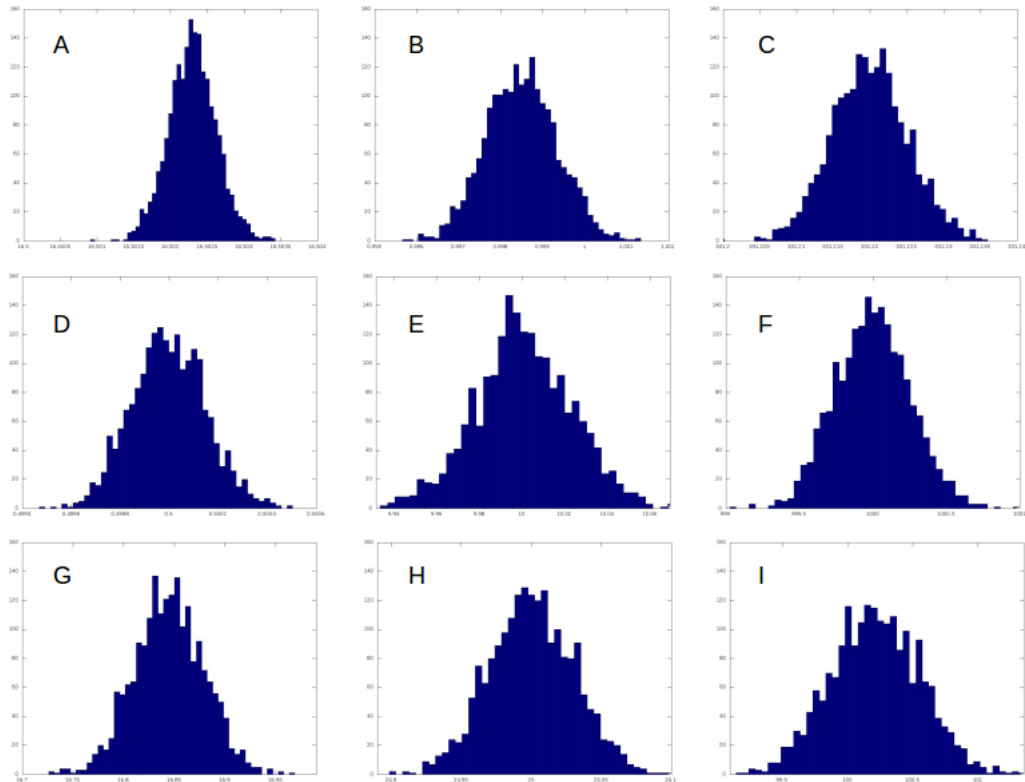


Figura 4.8: Histogramação das variáveis estocásticas geradas por simulação MC: (A)  $\Delta m$ , (B)  $P$ , (C)  $M$ , (D)  $V_1$ , (E)  $v_2$ , (F)  $V_3$ , (G)  $\Delta v$ , (H)  $v_A$  e (I)  $\%C_{EDTA}$ .

Na tabela (4.19) encontra-se um resumo das propriedades estimadas por simulação.

Tabela 4.19: Sistematização dos resultados obtidos por simulação de Monte-Carlo.

variável	Input		Output		%RE		Diagnóstico de normalidade			
	$x$	$u(x)$	$\bar{x}$	$s_x$	$\bar{x}$	$s_x$	$\alpha_3$	$\alpha_4$	$TV(SK)$	$p[H_0]$
$\Delta m$	16.50230	0.00033	16.50230	0.00033	0.0	-1.3	0.0267	3.267	6.24	0.044
$P$	0.9985	0.00087	0.99849	0.00085	0.0	-2.4	0.0531	2.933	1.31	0.518
$M$	331.22011	0.0051	331.2200	0.0052	0.0	1.6	0.0264	2.990	0.24	0.887
$V_1$	0.50000	0.00015	0.50000	0.00015	0.0	0.7	0.0901	2.965	2.82	0.244
$v_2$	10.000	0.023	10.000	0.023	0.0	-0.6	-0.0645	3.092	2.10	0.350
$V_3$	1000.00	0.26	1000.00	0.26	0.0	-1.8	0.0714	3.038	1.82	0.402
$\Delta v$	16.845	0.034	16.845	0.034	0.0	1.4	-0.0241	3.079	0.72	0.698
$v_A$	25.000	0.031	25.000	0.030	0.0	-2.3	0.0217	2.928	0.59	0.744
$\%C_{EDTA}$	100.21	0.34	100.21	0.34	0.0	0.2	0.0306	2.853	2.12	0.347

Da tabela verifica-se que, apesar de os histogramas, figura (4.8), parecerem evidenciar algumas anomalias nas distribuições geradas, o teste simultâneo de simetria ( $\alpha_3$ ,  $\sigma^2(\alpha_3) = 0.00299$ ) e curtose ( $\alpha_4$ ,  $\sigma^2(\alpha_4) = 0.0119$ ), eq.(2.33) na página 25, apontam para que estas sejam de facto consideradas normais o que valida as estimativas paramétricas de posição (média) e dispersão (desvio padrão) na representação das distribuições.

Verifica-se ainda uma boa exactidão na geração das distribuições – erros relativos de 0.0% na posição e inferiores a 2.5% na dispersão.

O resultado final ( $\%C_{EDTA}$ ) surge também com elevada exactidão na estimativa de posição ( $\%RE(\bar{x}) = 0.0\%$ ) e de dispersão ( $\%RE(s_x) = 0.2\%$ ) em relação aos valores previstos pela abordagem “bottom-up”.



## Capítulo 5

# Conclusões

O tema deste trabalho centrou-se na implementação, desenvolvimento e validação um método interno para quantificação de um conservante, o EDTA, num novo produto farmacêutico através de titulação complexométrica.

O método desenvolvido tinha por base um método descrito pela Farmacopeia Europeia para análise do EDTA em matérias primas. O desafio consistiu essencialmente em adaptar o método à quantificação do EDTA em produto acabado o que implica usar uma gama analítica cerca de 100 vezes inferior e na presença de uma matriz mais complexa que aquela para a qual ele foi concebido.

Para garantir que este novo método interno estivesse em condições de conduzir a resultados fiáveis houve necessidade de validar alguns dos seus parâmetros de desempenho.

Numa fase inicial do trabalho de validação houve necessidade de verificar se a bureta que se dispunha para os ensaios apresentava rigor suficiente para a quantificação em causa. Para tal foi necessário avaliar e verificar se o volume nominal da escala marcada correspondia ao volume que era efectivamente despejado. Usando a gravimetria como recurso foi possível demonstrar que existia uma boa exactidão já que não foram detectados erros sistemáticos significativos quer com componente constante quer com contribuição proporcional. Além disso ficou também demonstrado que a escala volumétrica definida na bureta aparenta ser uniformemente bem calibrada, não tendo sido detectadas anomalias de falta de homogeneidade.

Na validação procurou-se seguir as recomendações da IUPAC/ICH/ISO para tentar manter a conformidade com os referenciais Europeus.

Numa primeira fase foi feita a análise ao nível da identificação. Devido à elevada facilidade com que o EDTA forma complexos com diversos catiões em solução aquosa, não se conhece um método simples e expedito para permitir a identificação inequívoca deste analito no seio de uma matriz complexa - apenas em casos de amostras mais simples e de matriz bem conhecida, na ausência de outras espécies quelantes, será possível reconhecer a sua presença por adição de determinado catião com o qual o EDTA tenha elevada afinidade para reagir. De outro modo, a identificação inequívoca teria de ser feita por algum método instrumental mais sofisticados como por exemplo HPLC-MS/MS.

De modo similar, a especificidade e selectividade do método estão muito confinadas devido à ampla aplicabilidade do EDTA como agente complexante. Na presença de amostras reais, com matrizes complexas, é provável que não existam condições analíticas para garantir sequer a selectividade desde que na matriz estejam presentes outros catiões de forte interacção com o EDTA ou outros quelantes. Contudo, no caso do fármaco testado, não foram detectados efeitos de matriz - quer ao nível da exactidão como ao da precisão, a presença da matriz não introduziu alterações significativas quando comparando esses resultados com os obtidos em meio simples.

Verificou-se ainda que, nas condições utilizadas, o volume de correcção do ponto termo da titulação devido à viragem de cor do indicador ( $V_0$ ) era estatisticamente concordante com o valor proposto pelo método descrito ( $V_0 = 0.4$  mL).

Foi também demonstrado que a sensibilidade do método coincidia com o valor previsto pela equação da mensuranda,  $68.1288 \text{ mg}^{-1}$ .

Em termos de gama de aplicabilidade do método, demonstrou-se que a sua resposta analítica tinha comportamento linear na gama 0.125 a 0.375 mg/mL e que, com base em brancos de amostra, se estima que o limite de quantificação se deve situar na ordem de 0.0041 mg/mL o que corresponde a estipular como gama analítica testada entre 0.004 a 0.375 mg/mL.

Em termos de precisão, demonstrou-se a homogeneidade de variância na gama de concentração 0.125 a 0.375 mg/ml sendo a repetibilidade estimada como 0.00087 o que corresponde a uma imprecisão relativa da ordem de 0.3% ao nível da concentração do analito na matriz (0.250 mg/mL). Demonstrou-se ainda que esta imprecisão não era afectada por efeitos de matriz das amostras utilizadas nem por efeito de analista.

Demonstrou-se ainda que o método é exacto, não apresentando efeitos de matriz. O erro relativo médio esperado é inferior a 1%.

Em relação à robustez, foi demonstrado que a estabilidade do titulante em função do tempo de armazenamento, tendo ainda em consideração outros factores de teste (temperatura e luminosidade), o titulante é estável uma vez que os resultados obtidos mostravam ser coerentes com os valores obtidos relativos ao tempo inicial.

Quanto à estimativa da incerteza total do método, a abordagem “bottom-up” prevê uma incerteza expandida de 0.64% ( $k=2$ ) que corresponde, grosso modo, ao erro padrão 0.32, coerente com o valor previsto pela repetibilidade (ensaio único).

Ficou ainda evidenciado que a replicação do ensaio ( $M \geq 3$ ) permitiria reduzir drasticamente esta incerteza e que as operações de pipetagem eram cruciais para condicionar a incerteza global final.

Ficou também demonstrado que, uma vez conhecidas as contribuições de erro de cada fonte de incerteza, a simulação Monte Carlo permite obter, de modo facilitado, excelentes estimativas robustas para a incerteza global.

Em suma, verifica-se que todos os parâmetros do plano de validação foram devidamente sustentados, convergindo assim na sua aceitação e o método analítico proposto validado.

# Bibliografia

- [1] Technical report.
- [2] Satinder Ahuja and Stephen Scypinski. *Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis*. Academic Press, 1st edition, 2001.
- [3] J. Mendham, R.C. Denney, J. D. Barnes, and M.J.K. Thomas. *Vogel's Quantitative Chemical Analysis*. Prentice Hall, 6th edition, 2000.
- [4] World Health Organization, editor. *Quality assurance of pharmaceuticals: a compendium of guidelines and related materials*, volume 2 - Good manufacturing practices and inspection. WHO - World Health Organization, 2007.
- [5] P.J. Sheskey R.C. Rowe and M.E. Quinn, editors. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Pharmaceutical Press, 6th edition, 2009.
- [6] Rymond Chang. *Chemistry*. McGraw-Hill, 10th edition, 2010.
- [7] Daniel C. Harris. *Quantitative Chemical Analysis*. Freeman, 8th edition, 2011.
- [8] Samuel H. Yalkowsky, Yan He, and Parijat Jain. *Handbook of Aqueous Solubility Data*. CRC Press, 2nd edition, 2010.
- [9] F. Ullmann, W. Gerhartz, Y.S. Yamamoto, F.T. Campbell, R. Pfefferkorn, and J.F. Rounsaville. *Ullmann's Encyclopedia of industrial chemistry*. Number vol. 2 in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. VCH, 1995.
- [10] Ashutosh Kar. *Pharmaceutical Drug Analysis*. New Age International, 2th edition, 2005.
- [11] A.N. Shetty P. Parameshwara, J. Karthikeyan and P. Shetty. Quantitative complexometric determination of mercury(ii) in synthetic alloys and complexes using 2-thiazolinethiol as a masking agent. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 3:168–172, 2006.
- [12] J. Karthikeyan, P. Parameshwara, A. Nityananda Shetty, and Prakash Shetty. Complexometric determination of thallium(III) using ethanethiol as a selective masking agent. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17:316 – 320, 04 2006.

- [13] J. Karthikeyan P. Parameshwara and A.N. Shetty. Indirect complexometric determination of mercury(ii) using 3-acetyl-2-thiohydantoin as a selective masking agent. *Indian Journal of Chemical Technology*, 15:493–496, 2008.
- [14] D. Brynn Hibbert and J. Justin Gooding. *Data Analysis for Chemistry*. Oxford University Press, 1st edition, 2006.
- [15] Peter C. Meier and Richard E. Z̃ÄEnd. *Statistical Methods in Analytical Chemistry*. John Wiley, 2nd edition, 2000.
- [16] James N. Miller and Jane C. Miller. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Prentice hall, 5th edition, 2005.
- [17] J. M. Andrade and M. P. Gomez-Carracedo. Notes on the use of mandel's test to check for nonlinearity in laboratory calibrations. *Anal. Methods*, 5:1145–1149, 2013.
- [18] F.E. Grubbs. Sample criteria for testing outlying observations. *Ann. Math. Stat.*, 21:27, 1950.
- [19] F.E. Grubbs. Procedures for detecting outlying observations in samples. *Technometrics*, 11(1):1–21, 1969.
- [20] J. J. Faraway. *Linear Models with R*. Chapman & Hall, 2005.
- [21] N. Skoog Holler. *Principles of Instrumental Analysis*. Thomson, 8th edition, 2007.
- [22] Oona McPolin. *Validation of Analytical Methods for Pharmaceutical Analysis*. Mourne Training Services, 1st edition, 2009.
- [23] Michal E. Swartz and Ira S. Krull. *Handbook of Analytical Validation*. Mourne Training Services, 1st edition, 2012.
- [24] David Harvey. *Modern Analytical Chemistry*. James M. Smith, 1st edition, 2000.
- [25] Council of Europe and European Pharmacopoeia Comission. *European Pharmacopoeia*. Council of Europe, 7th edition, 2010.
- [26] David R. Lide, editor. *CRC Handbook of Chemistry and Physics, Physical Constants of Organic Compounds*. CRC Press, 87th edition, 2007.
- [27] Tyler B. Coplen John K. Bohlke Michael Berglund Willi A. Brand Paul De Bievre Manfred Groning Robert D. Loss Juris Meija Takafumi Hirata Thomas Prohaska Ronny Schoenberg Glenda O'Connor Thomas Walczyk Shige Yoneda Michael E. Wieser, Norman Holden and Kiang-Kun Zhu. Atomic weights of the elements 2011. Technical report, International Union for Pure and Applied Chemistry, 2011.

# Apêndice A

## Tabelas

Tabela A.1: Valores críticos para teste de Grubbs ( $\alpha = 0.05$ ) [ISO 17025, ASTM E-178].

$$G = \frac{|x? - \bar{x}|}{s_x}$$

<i>n</i>	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>G</i>	1.15	1.48	1.71	1.89	2.02	2.13	2.21	2.29	2.34
<i>n</i>	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<i>G</i>	2.41	2.46	2.51	2.55	2.54	2.62	2.65	2.68	2.71
<i>n</i>	21	22	23	24	25	30	35	40	50
<i>G</i>	2.73	2.76	2.78	2.80	2.82	2.91	2.98	3.04	3.13
<i>n</i>	60	70	80	90	100	110	120	130	140
<i>G</i>	3.20	3.26	3.31	3.35	3.38	3.42	3.44	3.47	3.49

Tabela A.2: Valores críticos para o teste de Cochran referente à homogeneidade da variância ( $\alpha = 0.05$ ).

$$C = \frac{s_{max}^2}{\sum_{i=1}^n s_i^2}$$

<i>m</i> = número de réplicas da estimativa de cada variância								
<i>n</i>	2	3	4	5	6	7	10	$\infty$
2	0.9985	0.9750	0.9392	0.9057	0.8772	0.8534	0.8010	0.5000
3	0.9969	0.8709	0.7977	0.7457	0.7071	0.6771	0.6167	0.3333
4	0.9065	0.7679	0.6841	0.6287	0.5895	0.5598	0.5017	0.2500
5	0.8412	0.6838	0.5981	0.5441	0.5065	0.4783	0.4214	0.2000
6	0.7808	0.6161	0.5321	0.4803	0.4447	0.4184	0.3682	0.1667
7	0.7271	0.5612	0.4800	0.4307	0.3974	0.3726	0.3259	0.1429
10	0.6020	0.4450	0.3733	0.3311	0.3029	0.2823	0.2439	0.1000
20	0.3894	0.2705	0.2205	0.1921	0.1735	0.1602	0.1357	0.0500
30	0.2929	0.1980	0.1593	0.1377	0.1237	0.1137	0.0958	0.0333
40	0.2370	0.1576	0.1259	0.1082	0.0968	0.0887	0.0745	0.0250
60	0.1737	0.1131	0.0895	0.0765	0.0682	0.0623	0.0520	0.0167