

O MÉTODO GENERALIZADO DAS ADIÇÕES-PADRÃO E A ELIMINAÇÃO DE INTERFERÊNCIAS EM ANÁLISE MULTICOMPONENTE

Mário C. U. de Araújo

Departamento de Química – CCEN – Universidade Federal da Paraíba – 58.059 – João Pessoa – PB.

Roy E. Bruns.

Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas; Cx. Postal 6154, 13.081 – Campinas – SP.

Recebido em 12/12/90

The Generalized Standard Addition Method (GSAM) is an interesting way to detect, quantify and eliminate interferences, when a multicomponent analysis is being performed and separation methods are not convenient or effective. In this paper, the GSAM is reviewed, discussed and some modifications are proposed. These modifications lead the GSAM to three levels of analysis allowing more flexibility for adjusting the quantity and the time of analysis with the quality of the results desired. Moreover, this new version can accept data when the additions were made by manual procedures or systems of flow injection analysis.

INTRODUÇÃO

A maioria dos métodos instrumentais nas áreas de espectrofotometria, eletroanalítica, etc., utiliza, para a determinação da concentração de uma espécie química em uma amostra, a comparação do seu sinal de resposta contra os sinais de resposta de uma série de soluções de concentrações conhecidas (a chamada curva de calibração). Este procedimento, frequentemente utilizado, é válido somente se o ambiente onde está o analito (do inglês: 'analyte') é semelhante ao ambiente em que foram preparadas as soluções de concentrações conhecidas (os padrões). Se existem diferenças em propriedades como: PH, força iônica, temperatura, viscosidade, tensão superficial, etc. ou nas concentrações de concomitantes a comparação pode ser falsa, isto é, a determinação da concentração do analito pode ser inexata. Costuma-se, às vezes, para contornar este problema denominado de *efeito de matriz*, preparar os padrões para calibração no mesmo ambiente do analito na amostra, o que requer o conhecimento de todas as propriedades da matriz, e isto muitas vezes é impossível na prática. Para melhor contornar este problema tem-se empregado o Método de Adições-Padrão (MAP)¹. O MAP é bastante conhecido pelos químicos analíticos, pois a descrição do método pode ser encontrada em quase todos os livros-texto que tratam da análise química instrumental². O método consiste em se medir as respostas antes e após várias soluções-padrão terem sido adicionadas à amostra, o que corresponde a uma calibração na própria amostra, contornando, assim, o efeito de matriz. Se a curva de respostas com os incrementos de concentração é linear, a concentração do analito na amostra pode ser obtida pela extrapolação da linha reta (resposta versus concentração) para o eixo da concentração, encontrando o valor absoluto da interseção neste eixo.

A aplicação do MAP requer que a resposta do analito antes das adições-padrão seja "zerada", isto é, na ausência deste analito na amostra uma resposta zero seja obtida, ou seja, que interferências químicas, físicas e/ou espectrais³⁻⁵, que surgem de outras espécies presentes na amostra, sejam eliminadas. Na maioria dos casos, a ausência total de interferências não é obtida na prática, e o isolamento de cada analito de todos os ou-

tros interferentes por um método de separação pode tornar-se trabalhoso. Portanto, é importante para um químico analítico, envolvido com esses problemas, que ele possa detectar, caracterizar matematicamente e corrigir estas interferências e/ou os efeitos de matriz. Este método não forneceria apenas uma análise mais exata de todas as espécies envolvidas, mas também serviria para caracterizar a seletividade do instrumento analítico e, por conseguinte, ser de grande importância no desenvolvimento do método analítico. Recentemente, o Laboratório de Quimioterapia da Universidade de Washington, EUA, desenvolveu a base matemática para tal método³⁻¹⁰. Ele é uma combinação do MAP e o comum esquema de análise multicomponente empregando a técnica dos mínimos quadrados. Chamado de Método Generalizado de Adições Padrão (MGAP) (do inglês: 'The Generalized Standard Addition Method (GSAM)', ele é uma generalização por incluir qualquer número de analitos, interferentes e interferidos. O MGAP tem sido aplicado à espectrofotometria de absorção molecular UV-Visível^{3, 7, 8, 11}, espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma induzido em argônio (do inglês: Inductively Coupled Argon Plasma Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES)^{5, 6, 12-15}, voltametria de redissolução (do inglês: 'Stripping Voltammetry')^{16, 17}, fotometria de chama¹⁸, e potenciometria com eletrodo íon-seletivo¹⁹.

Apesar de que a utilização do MGAP possibilita, com algumas restrições, superar eventuais efeitos de matriz e interferências químicas, físicas e/ou espectrais³⁻⁵, a sua execução necessita geralmente da preparação de uma série de soluções-padrão dos analitos interferentes e interferidos e da adição destas soluções à solução da amostra. Se procedimentos manuais convencionais de adições-padrão são utilizados^{4, 5}, além de trabalhosos, eles apresentam geralmente um alto consumo de reagentes e amostras e uma baixa velocidade analítica. Além do mais eles são geralmente mais sujeitos às contaminações, devido ao grande número de etapas analíticas (por exemplo, pipetagens) envolvidas. Para superar estes problemas, têm sido desenvolvidos procedimentos de adições-padrão^{12-14, 18, 20-27}, empregando a técnica de análise por injeção em fluxo (do inglês: 'Flow Injection Analysis (FIA)'^{28, 29}).

DESENVOLVIMENTO MATEMÁTICO DO MGAP

Supondo que uma resposta linear para as 'n' adições-padrão realizadas sobre uma determinada amostra é obtida e, considerando que mais de um sensor 's' possa ser utilizado para um determinado analito (por exemplo, dois ou mais comprimentos de onda, dois ou mais eletrodos fon-seletivo, etc), a expressão matemática para o método de adição padrão (MAP) é dada por:

$$R_{m,s} = (\Delta C_m + C_o) \cdot K_s \quad (m = 1, \dots, n) \quad (1)$$

onde, $R_{m,s}$ é a resposta do sensor 's' para m-ésima adição padrão ΔC_m , C_o é a concentração inicial do analito na amostra e K_s é a constante linear de resposta para o sensor 's'. A resposta do sensor 's' antes do início das adições-padrão, $R_{o,s}$, necessita ser também medida. C_o e K_s podem ser determinadas por regressão linear simples.

Uma vez que nas adições de soluções-padrão as concentrações não são sempre aditivas, respostas com correção de volume, $Q_{m,s}$ devem ser utilizadas. Levando em consideração este problema, a Equação (1) pode ser reescrita como:

$$R_{m,s} = (\Delta N_m / V_m + N_o / V_m) \cdot K_s$$

da qual se obtém,

$$Q_{m,s} = R_{m,s} \cdot V_m = (\Delta N_m + N_o) \cdot K_s \quad (2)$$

onde, ΔN_m é a quantidade (número de moles ou massa) adi-

cionada, V_m é o volume após a m-ésima adição. N_o é a quantidade inicial do analito na amostra a ser determinado, o qual pode ser convertido para concentração conhecendo-se o volume inicial, V_o , da amostra.

A figura 1 mostra graficamente a aplicação do MAP para análise de três amostras contendo a mesma quantidade inicial, N_o , do analito, considerando que na primeira amostra o analito está em um ambiente onde não existe efeito de matriz, curva (A), na segunda amostra o analito está em um ambiente onde existe efeito de matriz, curva (B), e na terceira ele está em um ambiente onde, além do efeito de matriz, existe interferência espectral de um outro analito, i, curva (C). Uma resposta $Q'_{o,s}$ maior do que $Q_{o,s}$ foi mostrada, considerando que um efeito de matriz positivo estava ocorrendo (por exemplo, a presença de etanol em determinação de sódio por fotometria de chama). Na aplicação do MAP a primeira e segunda amostras, o mesmo valor da quantidade inicial do analito, N_o , foi obtido. A diferença na inclinação entre as curvas (A) e (B) ocorre devido à presença do efeito de matriz na segunda amostra. Entretanto, a presença de uma interferência espectral (resposta $Q_{o,i}$) faz com que um resultado maior na quantidade inicial do analito, N'_o seja obtido. Portanto, algumas restrições à aplicação do MAP devem ser enfatizadas:

- a função que relaciona resposta com concentração deve ser linear;
- a resposta $Q_{o,s}$ deve ser "zerada", isto é, na ausência do analito na amostra, deve-se obter uma resposta zero;
- como resultado de (b), se a propriedade medida é afetada por outros componentes que não o analito de interes-

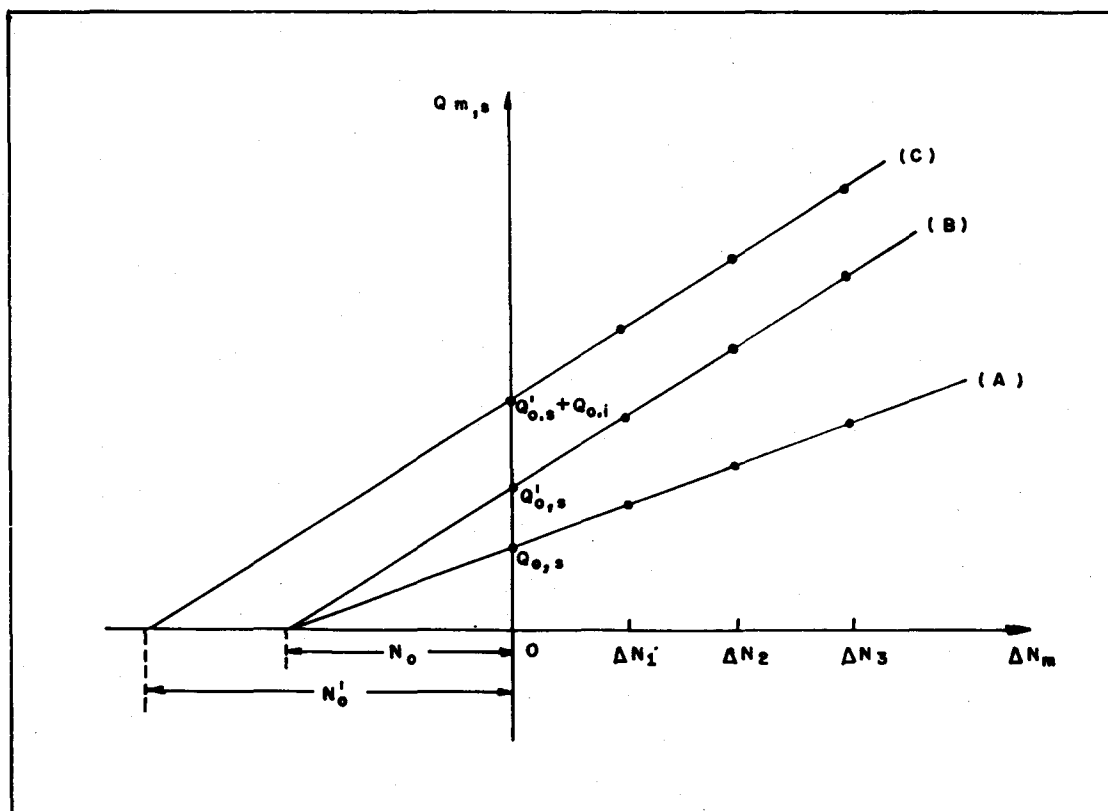


Figura 1 - O método de adição padrão para amostra sem efeito de matriz (A); com efeito de matriz (B) e com efeito de matriz mais interferência espectral (C). $Q_{m,s}$ é a resposta do sensor 's' para 'm'-ésima quantidade (número de moles ou massa) adicionada ΔN_m .

se, então, os efeitos destes componentes devem ser de alguma forma eliminados.

Quanto à restrição (a), esta não é um problema, pois a grande maioria dos métodos de análise química instrumental apresentam, para pelo menos uma faixa de concentração, uma relação linear entre a resposta do sensor e a concentração. Todavia, quanto às restrições (b) e (c), se a resposta do sensor 's' de um analito 'a' é afetada, em uma maneira linear, pelos 'r' componentes da amostra (interferência química, física, e/ou espectral), esta resposta pode ser expressa por uma equação análoga à Equação (2). Estendendo esta equação para incluir as contribuições dos 'r' componentes, obtém-se então:

$$Q_{m,s} = \sum_{a=1}^r (\Delta N_{m,a} + N_{0,a}) \cdot K_{a,s} \quad (m = 1, 2, \dots, n); (s = 1, 2, \dots, p) \quad (a = 1, 2, \dots, r)$$

que dá:

$$Q_{m,s} = \sum_{a=1}^r \Delta N_{m,a} \cdot K_{a,s} + \sum_{a=1}^r N_{0,a} \cdot K_{a,s} \quad (3)$$

onde, $Q_{m,s}$ é a resposta do s-ésimo sensor para a m-ésima adição padrão do analito 'a', $\Delta N_{m,a}$ é a quantidade inicial do analito 'a' na amostra e $K_{a,s}$ é a constante linear de resposta que caracteriza o quanto cada componente 'a' afeta o sensor 's'. Conhecendo-se o volume de amostra, V_0 , e as respostas iniciais dos 'r' sensores antes das adições, $R_{0,s}$, tem-se:

$$Q_{0,s} = R_{0,s} \cdot V_0 = \sum_{a=1}^r N_{0,a} \cdot K_{a,s}$$

e a Equação (3) torna-se:

$$Q_{m,s} = \sum_{a=1}^r \Delta N_{m,a} \cdot K_{a,s} + Q_{0,s} \quad (4)$$

Considerando apenas as variações de respostas, $\Delta Q_{m,s}$ obtém-se:

$$\Delta Q_{m,s} = Q_{m,s} - Q_{0,s} = \sum_{a=1}^r \Delta N_{m,a} \cdot K_{a,s} \quad (5)$$

A Equação (5) pode ser escrita em notação de matriz como:

$$[\Delta Q] = [\Delta N] \cdot [K] \quad (6)$$

onde, $[\Delta Q]$ é uma matriz $n \times p$ das variações de respostas com correção de volume, $[\Delta N]$ é uma matriz $n \times r$ das quantidades adicionadas e $[K]$ é uma matriz $r \times p$ das constantes lineares de resposta.

Para resolver a Equação (6), um programa computacional, escrito em FORTRAN, foi desenvolvido pelo grupo de Seat-

tle³⁻¹⁰, e encontra-se disponível pela Infometrix, Inc³⁰. Este programa, chamado de GSAM, utiliza a inversa generalizada de $[\Delta N]$ definida por $([\Delta N]^T \cdot [\Delta N])^{-1} \cdot [\Delta N]^T$, e o método de regressão linear múltipla pelos mínimos quadrados. Assim, a matriz $[K]$ é obtida (se $n \geq r$ e $p \geq r$) pela expressão:

$$[K] = ([\Delta N])^T \cdot [\Delta N]^{-1} \cdot [\Delta N]^T \cdot [\Delta Q] \quad (7)$$

Após a determinação da matriz $[K]$, o vetor das quantidades iniciais de cada analito na amostra, N_0 , é obtido por:

$$N_0 = ([K]) \cdot [K]^T)^{-1} \cdot [K] \cdot Q_0$$

onde, N_0 é um vetor $r \times 1$, e o Q_0 é um vetor $p \times 1$.

Dois modos de cálculo podem ser realizados pelo programa GSAM para obtenção da matriz $[K]$ e o vetor N_0 , o modo de cálculo TDC ("Total Difference Computation"⁴) e o modo de cálculo IDC ("Incremental Difference Computation"⁴). A diferença entre estes dois modos de cálculo reside apenas na definição das matrizes de entrada $[\Delta N]$ e $[\Delta Q]$, usadas em ambos os modos de cálculo. No cálculo TDC a matriz de entrada $[\Delta N]$ é aquela correspondente às quantidades acumulativas adicionadas, enquanto que para o cálculo IDC, $[\Delta N]$ corresponde justamente às quantidades adicionadas. No modo de cálculo TDC, a matriz de entrada $[\Delta Q]$ corresponde às variações totais das respostas, a partir de Q_0 , enquanto que para o cálculo IDC $[\Delta Q]$ corresponde às variações entre cada resposta.

Na aplicação do MGAP para o cálculo usando o programa GSAM as seguintes restrições são feitas:

- (a) $n \geq r$, o número de adições-padrão deve ser maior ou igual ao número de analitos, isto é, pelo menos uma adição de cada analito, é necessária;
- (b) $p \geq r$, o número de sensores deve ser maior ou igual ao número de analitos, ou seja, pelo menos um sensor, para cada analito, é necessário.

CONSIDERAÇÕES SOBRE O PROGRAMA GSAM

Utilizando regressão linear múltipla, sabe-se teoricamente que a precisão dos elementos da matriz $[K]$ pode ser melhorada simplesmente pelo aumento do número de adições-padrão, se o erro experimental é de comportamento aleatório. Todavia, a exatidão da matriz $[K]$ e, conseqüentemente, do vetor N_0 , depende da exatidão de cada resposta e do planejamento experimental das adições-padrão. Assim, foram incluídos no programa GSAM algoritmos de controle do planejamento experimental das adições e da exatidão das respostas⁴. O primeiro algoritmo é o número de condição generalizado da matriz $[\Delta N]$, que fornece o quanto o planejamento experimental contribui na exatidão da matriz $[K]$. O segundo é o número de condição da matriz $[K]$, que fornece o quanto o vetor N_0 é influenciado pela exatidão do vetor Q_0 e da matriz $[K]$. Portanto, ambos os números de condição calculados pelo programa GSAM dão uma idéia de propagação de erro obtido, devido à exatidão das respostas e ao bom planejamento experimental das adições-padrão.

O PROGRAMA GSAMIN

Um programa de computação foi desenvolvido, a partir do programa GSAM, de modo a ser utilizado em microcomputadores. Este programa, chamado de GSAMIN*¹³, foi escrito em linguagem FORTRAN. O programa GSAMIN permite fazer cálculos quando as adições-padrão forem realizadas ou por procedimentos manuais ou por procedimentos usando sistemas FIA. O programa GSAM foi desenvolvido para procedimentos manuais de adições-padrão^{4, 5}. Além disso, o programa GSAMIN oferece ao usuário uma maior flexibilidade no sentido de adequar a quantidade de trabalho e tempo de análise com a qualidade dos resultados analíticos obtidos pela aplicação do MGAP. Três níveis de análise são permitidos usando tal programa:

- (a) Para uma série de amostras com efeito de matriz semelhante, aplica-se o MGAP aos analitos de interesse para apenas uma amostra, calcula-se a matriz [K] para essa amostra e armazena-se esta matriz em um arquivo em disco. As concentrações iniciais dos analitos de interesse, em todas as amostras, são calculadas pelo GSAMIN, utilizando esta matriz [K] e as respostas iniciais, $Q_{o,s}$, dos analitos de cada amostra. Se flutuações do aparelho de medida ocorrem, são necessárias periódicas aplicações do MGAP para obtenção da matriz [K].
- (b) Se o efeito de matriz é desprezível, uma matriz [K] armazenada no computador, obtida por procedimentos de calibração, é utilizada pelo GSAMIN, juntamente com as respostas $Q_{o,s}$ para o cálculo das concentrações dos analitos. Se flutuações do aparelho ocorrem devem ser obtidas periódicas matrizes [K].
- (c) Se entre as amostras existirem diferenças significativas do efeito de matriz, deve ser aplicado um procedimento completo do MGAP, para cada amostra. As concentrações iniciais dos analitos são obtidas utilizando a matriz [K] de cada amostra e suas respectivas respostas $Q_{o,s}$.

Para os níveis (a) e (b), às vezes é necessário apenas modificar e/ou acrescentar alguns elementos da matriz [K]. Estes elementos são obtidos por um dos procedimentos (a) e (b) de interesse e, utilizando o programa GSAMIN, eles são acrescentados e/ou modificados no arquivo em disco da matriz [K]. Posteriormente, esta matriz [K] modificada poderá ser utilizada para o cálculo das concentrações iniciais dos analitos.

Portanto, o programa GSAMIN permite aceitar dados referentes às adições-padrão efetuadas, utilizando ou procedimentos manuais ou procedimentos usando FIA, e realizar cálculos de modo a tornar mais rápidas as análises que necessitam do MGAP (análises de níveis (a), (b)). Assim, com uma adequada matriz [K] na memória de um microcomputador acoplado ao instrumento de medida, a velocidade analítica pode tornar-se igual à velocidade de leitura das respostas iniciais $Q_{o,s}$. Também, uma coleção histórica de matrizes [K] guardadas em arquivo de disco pode ser utilizada para avaliações periódicas da "performance" dos instrumentos analíticos, por exemplo, como a sensibilidade de um determinado sensor (fotomultiplicada), o alinhamento ótico, etc. Além do mais, este programa é escrito em linguagem acessível ao usuário, permitindo que os métodos de cálculo e controle possam ser estu-

dados e compreendidos, ao contrário dos pacotes de "software", normalmente oferecidos por fabricantes dos instrumentos analíticos. Todavia, alguns algoritmos de controle e cálculo podem ainda ser adicionados e/ou modificados, como, por exemplo, o algoritmo proposto por Vandeginste et al.¹¹ sobre o controle da validade do modelo linear durante o estágio de adição, algoritmo PLS⁹ pode ser usado em lugar da regressão linear múltipla convencional, etc. Tais algoritmos serão objetivos de estudos futuros.

O método como apresentado aqui só pode ser utilizado se a relação resposta-concentração do analito é de alguma forma linearizável. Entretanto, ele pode ser modificado de modo a permitir que uma relação polinomial (quadrática, cúbica ou de qualquer grau arbitrário)³ seja utilizada. Este é também um dos objetivos de estudos futuros.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos pelas discussões e sugestões dos pesquisadores da área de Química Analítica do CENA-USP e do Prof. Dr. Célio Pasquini da UNICAMP.

REFERÊNCIAS

1. Bader, M.; *J. Chem. Educ.* (1980) **57**, 703
2. Willard H.; Merritt Jr, L.; Dean, J.; "Instrumental Methods of Analysis", Editora D. Van Nostrand Company, N. York, EUA, 986pp, 1974.
3. Saxberg, B.E.H.; Kowalski, B.R.; *Anal. Chem.*, (1979) **51**, 1031.
4. Jochum, C.; Jochum, P.; Kowalski, B.R.; *Anal. Chem.* (1981) **53**, 85.
5. Kalivas, J.H.; Kowalski, B.R.; *Anal. Chem.* (1981) **53**, 2207.
6. Kalivas, J.H.; Kowalski, B.R.; *Anal. Chem.* (1982) **54**, 560.
7. Kalivas, J.H.; Kowalski, B.R.; *Anal. Chem.* (1983) **55**, 565.
8. Kalivas, J.H.; Kowalski, B.R.; *Anal. Chem.* (1983) **55**, 532.
9. Frank, I.E.; Kalivas, J.H.; Kowalski, B.R.; *Anal. Chem.*, (1983) **55**, 1800.
10. Moran, M.G.; Kowalski, B.R.; *Anal. Chem.* (1983) **55**, 1800.
11. Vandeginste, B.; Klaessens, J.; Kateman, G.; *Anal. Chem.*, (1984) **56**, 562.
12. Zagatto, E.A.G.; Jacintho, A.O.; Krug, F.J.; Reis, B.F.; Bruns, R.E.; Araújo, M.C.U.; *Anal. Chim. Acta* (1983) **145**, 169.
13. Jacintho, A.O.; Figueiredo, B.R.; Reis, B.F.; Zagatto, E.A.G.; Krug, F.J.; Giné, M.F.R.; Araújo, M.C.U.; Pereira, N.M.; Bruns, R.E. - "Análise Química de Rochas por ICP-AES Eliminação Automática de Interferências". Editora da UNICAMP, Campinas, São Paulo, 134pp, 1985.
14. Giné, M.F.R. - "Análises de Rochas por Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Induzido Empregando Sistemas de Injeção em Fluxo e o Método Generalizado das Adições Padrão". *Tese de Doutorado*, ESALQ-USP, Piracicaba, São Paulo, (1986).
15. Zagatto, E.A.G. - "Análises Químicas Multielementares em Sistemas FIA-ICP-GSAM e Classificações dos Solos do Estado de São Paulo". *Tese de Doutorado*, UNICAMP, Campinas, São Paulo, (1981).
16. Gerlach, R.W.; Kowalski, B.R.; *Anal. Chim. Acta* (1982) **134**, 119.
17. Hoyer, E.; Kryger, L.; *Anal. Chim. Acta* (1985) **167**, 11.
18. Araújo, M.C.U.; Pasquini, C.; Bruns, R.E.; Zagatto, E.A.G.; *Anal. Chim. Acta* (1985) **171**, 337.
19. Walters, F.H.; *Anal. Lett.* (1984) **17**, 1681
20. Tyson, J.F.; Idris, A.B.; *Analyst* (1984) **109**, 23.
21. Greenfield, S.; *Spectrochim. Acta, Part B* (1983) **38B**, 93.
22. Israel, Y.; Barnes, R.M.; *Anal. Chem.* (1984) **56**, 1188.
23. Giné, M.F.; Reis, B.F.; Zagatto, E.A.G.; Krug, F.J.; Jacintho, A.O.; *Anal. Chim. Acta* (1983) **155**, 131.

* Generalized Standard Addition Method of Minerals.

24. Zhaolum, F.; Harris, J.M.; Ruzicka, J.; Hansen, E.H.; *Anal. Chem.* (1985) 57, 1457.
25. Zagatto, E.A.G.; Giné, M.F.; Fernandes, E.A.N.; Reis, B.F.; Krug, F.J.; *Anal. Chim. Acta* (1985) 173, 289
26. Araújo, M.C.U. de; - "Desenvolvimento de Sistemas Automatizados de Adições-Padrão e Eliminação de Interferências em Análises Espectrofotométricas de Rochas, Minerais e Ligas ple Aplicação do Método Generalizado de Adições-Padrão". *Tese de Doutorado*, UNICAMP, Campinas (SP), (1987).
27. Giné, M.F.; Krug, F.J.; Bergamin F^o, H.; Reis, B.F.; Zagatto, E.A.G.; Bruns, R.E.; *J. Anal. Atom. Spect.* (1988) 3, 673.
28. Ruzicka, J.; Hansen, E.H. - "Flow Injection Analysis", Editora John Wiley & Sons, Nova York, EUA, 207pp, 1981.
29. Valcarcel, M.; Luque de Castro, M.D. - "Análisis por Inyección en flujo", Editora Imprenta San Pablo, Córdoba, Espanha, 450pp, 1984.
30. Infometrix, INC - Computer Programa for the Generalized Standard Addition Method - P.O. Box 25808, Seattle, Washington, USA, 98215.