

PLANILHA DE VALIDAÇÃO: UMA NOVA FERRAMENTA PARA ESTIMAR FIGURAS DE MÉRITO NA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS UNIVARIADOS**Fabiana Alves de Lima Ribeiro e Márcia Miguel Castro Ferreira***

Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13084-971 Campinas – SP, Brasil

Sandra Campilongo Morano, Lucimara Rodrigues da Silva e René Peter Schneider

Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 05508-900 São Paulo – SP, Brasil

Recebido em 11/1/07; aceito em 18/5/07; publicado na web em 19/12/07

VALIDATION SPREADSHEET: A NEW TOOL FOR ESTIMATING THE ANALYTICAL FIGURES OF MERIT FOR THE VALIDATION OF UNIVARIATE METHODS. This work presents the VALIDATION SPREADSHEET, a public domain tool that can be used to evaluate the figures of merit for univariate analytical methods. A real example of BTEX determination in environmental samples is included to illustrate its use. The spreadsheet has been developed for Excel® and Open Office®, and is available on the internet at <http://lqta.iqm.unicamp.br>.

Keywords: spreadsheet; figures of merit; validation.

INTRODUÇÃO

O bom desempenho de qualquer técnica analítica depende crucialmente de dois parâmetros: a qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no seu processamento. Uma forma de assegurar a aplicabilidade e o alcance de um método durante as operações de rotina de um laboratório é estabelecendo os limites destes parâmetros por meio da estimativa das figuras de mérito, numa etapa conhecida como validação.

As figuras de mérito são, portanto, os indicadores quantitativos do escopo e do bom desempenho das técnicas, e são descritas na literatura especializada como: seletividade, ajuste da curva analítica e determinação da sua faixa de linearidade, sensibilidade do método, representada pelos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão, exatidão e robustez¹⁻⁸.

A estimativa destes parâmetros pode variar de acordo com a técnica analítica empregada, ou com o protocolo de validação a ser seguido. No intuito de padronizar estes procedimentos, a IUPAC (“International Union of Pure and Applied Chemistry”) publicou no final da década de 90 um guia para calibração em Química Analítica⁴. Ainda em 1990, as agências regulatórias dos Estados Unidos (“FDA, Food and Drug Agency”), Japão (MHLW, “Ministry of Health, Labour and Welfare”) e União Européia (EMEA, “European Medicine Agency”) passaram a organizar a Conferência Internacional sobre Harmonização (ICH, “International Conference on Harmonisation”), para estabelecer padrões para os procedimentos de pesquisa e desenvolvimento de fármacos. Neste contexto, o ICH elaborou um guia sobre validação de métodos^{2,3} que tem sido utilizado também em outras áreas de estudo que não apenas a farmacêutica. Na área de Química Ambiental, os métodos padrões para análise de contaminantes publicados pela Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA, “Environmental Protection Agency”) contêm orientações a respeito da validação destes métodos⁹.

No Brasil, os dois órgãos que regulamentam a validação de métodos analíticos são a Agência Nacional de Vigilância Sanitária

(ANVISA)¹⁰ e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO)¹¹.

Validar um método é um procedimento demorado, que requer um grande número de experimentos analíticos e cálculos estatísticos, o que aumenta o custo das análises.

Estabelecer um bom procedimento de validação requer um compromisso entre validar rápido, e com um número adequado de análises, sem perder a qualidade das estimativas, o que é um desafio na rotina de um laboratório devido às restrições de tempo, custo e potencial instrumental. Na busca deste compromisso, ferramentas que permitam a estimativa das figuras de mérito de maneira rápida e segura são de grande utilidade. Existem disponíveis atualmente no mercado diversos softwares comerciais para validação de métodos, como o *EffiValidation*¹², o *Method Validation Pack* da Agilent¹³ e o *Validation Manager*¹⁴.

O intuito deste trabalho é apresentar e demonstrar a utilização da Planilha de Validação, uma alternativa aos softwares comerciais para a etapa de validação de métodos. Esta planilha permite a rápida estimativa das figuras de mérito, cabendo ao usuário apenas introduzir as informações referentes ao sinal analítico e às concentrações das espécies. Esta planilha não inclui a estimativa da seletividade, por se tratar de um parâmetro específico para determinadas técnicas analíticas e cujo cálculo não apresenta grande complexidade.

Para exemplificar o uso da planilha, foi introduzida no início do texto uma breve revisão sobre figuras de mérito. Esta revisão não tem a pretensão de detalhar extensivamente os procedimentos necessários para validar um método analítico e sim apenas demonstrar como o cálculo de cada parâmetro é realizado. Para uma revisão mais aprofundada é possível encontrar diversos trabalhos na literatura científica^{1-7,15,16}.

O uso da planilha foi ilustrado pela estimativa das figuras de mérito para dados reais da implementação de uma metodologia para análises de benzeno, tolueno, etilbenzeno e *o*-, *m*- e *p*-xilenos (conhecidos pela sigla BTEX) em amostras ambientais utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS). A metodologia escolhida é o método padrão indicado pela EPA¹⁷, que tem sido extensivamente aplicado para análises desta espécie de contaminante em amostras ambientais.

*e-mail: marcia@iqm.unicamp.br

Estimativa das figuras de mérito

Linearidade: o ajuste da curva de calibração

A linearidade de um método expressa a faixa na qual o sinal analítico, denominado variável dependente y_p , é linearmente proporcional à sua concentração, denominada variável independente x_p , e a equação matemática que descreve esta dependência é conhecida como *curva analítica* ou *curva de calibração*. O ajuste de qualquer equação matemática é feito pelo método dos quadrados mínimos, no qual a melhor curva será aquela que fornecerá o menor valor para a soma quadrática dos resíduos (Q) obtidos entre o sinal analítico medido (y_i) e o sinal analítico predito (\hat{y}_i), para um conjunto de N pontos experimentais, como demonstrado na Figura 1 (Equação 1)^{18,19}.

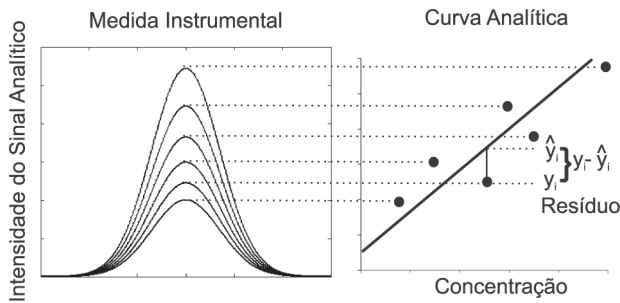


Figura 1. Curva de calibração mostrando a estimativa do resíduo no sinal analítico

$$Q = \sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2 \tag{1}$$

O ajuste da curva pelo método dos quadrados mínimos fornecerá os coeficientes de regressão, que no caso de um ajuste linear ($y_i = a_0 + a_1 x_i$) são os coeficientes linear ($a_0 = \bar{y} - a_1 \cdot \bar{x}$) e angular ($a_1 = \frac{\sum[(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})]}{\sum(x_i - \bar{x})^2}$), em que \bar{x} é o valor médio ($\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{N}$) da concentração (x_i) para o número total de amostras

(N) utilizadas como padrões de calibração. Uma vez conhecidos, estes coeficientes poderão ser utilizados para prever a concentração da espécie de interesse em novas amostras a partir do seu sinal analítico. A adequação do ajuste da curva é fornecida pelo coeficiente de correlação, r , que é a razão da covariância entre a concentração, x , e o sinal analítico, y , ($\frac{1}{(N-1)} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$), com o produto dos desvios padrões de x ($(\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{(N-1)})^{1/2}$) e y ($(\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2}{(N-1)})^{1/2}$),

conforme descrito na equação 2. O coeficiente de correlação apresenta uma faixa de magnitude entre $-1 \leq r \leq 1$, sendo que quanto mais próximo de 1 ou -1, menor será o erro em y e, portanto, melhor será o ajuste da função matemática escolhida à curva de calibração. Para um ajuste linear, no caso hipotético de $r = -1$, todos os pontos da curva de calibração estarão contidos em uma reta com inclinação negativa. No caso contrário, se $r = 1$, todos os pontos da curva deverão estar em cima de uma reta com inclinação positiva. Uma relação não linear entre x e y resultará em um valor relativamente pequeno^{4,19,20}.

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{(\sum (x_i - \bar{x})^2) (\sum (y_i - \bar{y})^2)}} \tag{2}$$

No entanto, apenas o valor do coeficiente de correlação não é suficiente para garantir a adequação do ajuste linear à curva de calibração. Modelos de calibração com alto resíduo no sinal analítico (Figura 2a) ou pontos mal distribuídos ao longo da faixa de calibração (Figura 2b) poderão fornecer um bom coeficiente de correlação, mesmo que uma função linear não seja a melhor descrição para o comportamento entre as variáveis dependente e independente^{4,7,16,18}. Na curva apresentada na Figura 2b, por exemplo, uma equação polinomial passando pelos dois pontos do meio da curva poderia apresentar um valor menor para a soma quadrática dos resíduos (Q , Equação 1) que uma equação linear, o que significaria um melhor ajuste. Para evitar problemas de falta de ajuste durante a modelagem, faz-se necessária a análise cuidadosa do gráfico dos resíduos do sinal analítico e a aplicação de testes para determinar a faixa na qual a curva de calibração apresenta um comportamento linear. Esta faixa é conhecida como “range”, ou faixa de aplicação.

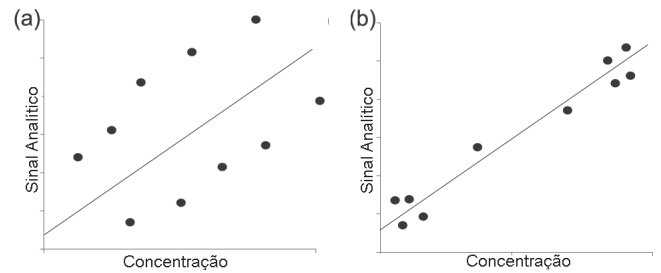


Figura 2. Curva de calibração com (a) alto resíduo no sinal analítico e (b) níveis de calibração mal distribuídos ao longo da faixa de calibração

Análise dos resíduos

A análise do gráfico dos resíduos permitirá detectar problemas no ajuste da curva como, por exemplo, desvios da linearidade (Figura

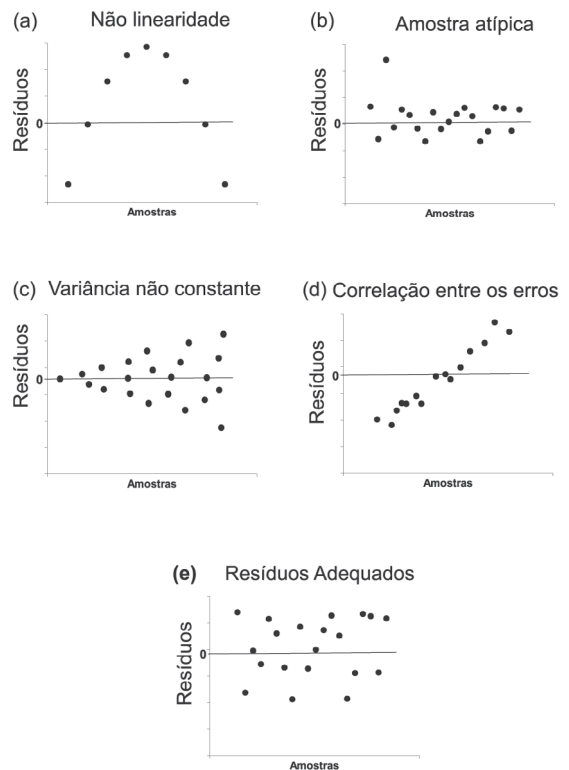


Figura 3. Gráfico dos resíduos mostrando (a) desvios da linearidade, (b) amostras atípicas, (c) heterocedasticidade, (d) erros correlacionados e (e) resíduos com homocedasticidade e normalmente distribuídos

ra 3a), presença de amostras atípicas (Figura 3b), heterocedastidade (Figura 3c) e dependência entre os erros (Figura 3d). Uma curva bem ajustada deverá apresentar erros com distribuição uniforme, média zero e variância constante (homocedastidade), e ausência de amostras atípicas (Figura 3e)^{4,16,20}.

Teste de linearidade

As fontes de variação em qualquer modelo são caracterizadas pela soma quadrática dos resíduos ($\sum(y_i - \hat{y}_i)$) e o melhor modelo de regressão será aquele que minimiza esta soma quadrática. O teste de linearidade proposto na planilha eletrônica é feito pela comparação dos resíduos do ajuste linear ($\hat{y}_{i1} = a_0 + a_1 \cdot x$) e do ajuste quadrático ($\hat{y}_{i2} = a_0 + a_1 \cdot x + a_2 \cdot x^2$) utilizando-se um teste-F de significância.

Esta comparação é feita estimando-se as somas quadráticas dos resíduos no sinal analítico a partir dos desvios padrões obtidos em cada ajuste. O desvio padrão em cada caso pode ser obtido como descrito nas Equações 3 e 4, em que S_{y1} é o desvio padrão calculado para o ajuste linear e S_{y2} é o desvio padrão para o ajuste quadrático^{4,15}.

$$S_{y1} = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{N-2}} \quad (3)$$

$$S_{y2} = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{N-3}} \quad (4)$$

A partir destes desvios estima-se a diferença entre as somas quadráticas dos dois ajustes (ΔS^2) segundo a Equação 5, em que N é o número de padrões de calibração utilizados na construção da curva, e estima-se a significância desta diferença em relação à S_{y2}^2 com o auxílio de um teste F (Equação 6)^{4,15,21}. Na Equação 6, F é o ponto de distribuição F no nível de confiança escolhido, com $f_1 = 1$ e $f_2 = N - 3$ graus de liberdade. Isto significa que se a razão $\Delta S^2 / S_{y2}^2 \leq F_{1,n-3}$, o ajuste linear é mais adequado. Se, no entanto $\Delta S^2 / S_{y2}^2 > F_{1,n-3}$, considera-se um ajuste quadrático mais apropriado¹⁵.

$$\Delta S^2 = (N-2) \cdot S_{y1}^2 - (N-3) \cdot S_{y2}^2 \quad (5)$$

$$\frac{\Delta S^2}{S_{y2}^2} \leq F_{1,n-3} \quad (6)$$

Sensibilidade do método: o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ)

A sensibilidade de um método é definida pelos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)^{6,8,15,17}. O LD é a menor concentração da espécie de interesse que pode ser detectada pela técnica instrumental, enquanto o LQ é a mais baixa concentração que pode ser quantificada dentro dos limites de precisão e exatidão do método durante as operações de rotina do laboratório, em condições usuais^{1,6,15,17}.

Há três formas de estimar os limites de detecção e de quantificação, e a escolha de uma delas deve levar em consideração a técnica analítica utilizada e o grau de confiabilidade estatística necessária: método visual, método da relação sinal-ruído, e método baseado em parâmetros da curva analítica^{3,4,7}.

Limite de detecção (LD)

Método visual

No método visual, realiza-se a análise de amostras contendo baixas concentrações conhecidas da espécie de interesse. Conside-

ra-se o LD como sendo a menor concentração que pode ser detectada e que seja distinta do sinal analítico do ruído^{3,7}.

Método da relação sinal-ruído

Este método pode ser aplicado em procedimentos analíticos que apresentem ruído da linha de base e é estimado a partir da comparação do sinal analítico obtido para uma amostra contendo baixas concentrações da espécie de interesse com o sinal de uma amostra do branco. Em geral, considera-se aceitável uma relação sinal-ruído de 3:1 ou 2:1^{3,7}.

Método baseado em parâmetros da curva analítica

Os dois métodos descritos acima são muito utilizados pela sua rapidez, mas apresentam como desvantagem o fato de basearem-se em parâmetros qualitativos. O método de estimativa do limite de detecção baseado-se em parâmetros da curva analítica apresenta maior confiabilidade estatística, pois leva em consideração o intervalo de confiança da regressão. O LD neste caso é definido como a concentração mínima de uma substância que pode ser medida e informada com 99% ou 95% de confiança^{3,6,8,17}. No entanto, devido à complexidade dos cálculos envolvidos nesta estimativa, este método tem sido menos utilizado que os dois métodos anteriores. Pela sua robustez, este foi o método escolhido para a estimativa do limite de detecção (LD) da planilha eletrônica.

A estimativa do sinal analítico a partir da equação de regressão apresenta um erro padrão, e o produto deste erro pelo valor apropriado de t da distribuição de Student²¹ permite calcular o intervalo de confiança da curva analítica (Figura 4a), que tem a forma de duas linhas hiperbólicas ao redor da curva. O intercepto do limite superior do intervalo de confiança é conhecido por y_c crítico (y_c) e a sua projeção no limite inferior é uma estimativa da concentração mínima que pode ser medida com um grau de confiança comprovado estatisticamente, ou seja, o limite de detecção do método (LD). As Equações 7 e 8 descrevem, respectivamente, o cálculo de y_c e LD^{3,4,15}.

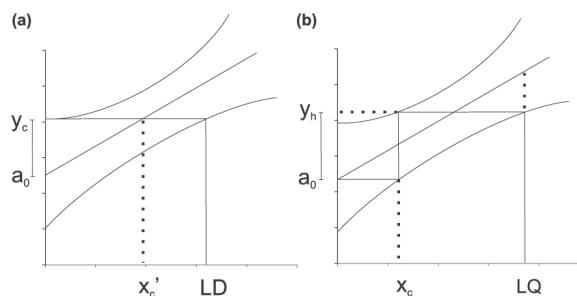


Figura 4. Curva de calibração com ilustração dos parâmetros utilizados no cálculo do LD (a) e LQ (b)

$$y_c = a_0 + s_y \cdot t \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (7)$$

$$LD = 2 \cdot \frac{s_y \cdot t}{a_1} \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{(y_c - \bar{y})^2}{a_1^2 \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (8)$$

Limite de quantificação (LQ)

Método visual

O limite de quantificação é determinado pela análise de amostras com concentrações conhecidas da espécie de interesse, e

corresponde à menor concentração que pode ser quantificada dentro dos limites de exatidão e precisão do método^{1,3,6,17}.

Método da relação sinal-ruído

Este método é adequado para procedimentos analíticos que apresentam ruído da linha de base. Neste caso, o LQ é estimado a partir da comparação do sinal analítico obtido para uma amostra contendo baixas concentrações da espécie de interesse com o sinal de uma amostra do branco e estabelecendo a concentração mínima em que a espécie de interesse pode ser quantificada com confiabilidade. Em geral, considera-se aceitável uma relação sinal-ruído de 10:1^{2,3,7}.

Método baseado em parâmetros da curva analítica

O LQ também é calculado a partir do intervalo de confiança da curva analítica, e sua estimativa pode ser observada na Figura 4b, em que x_c é o valor da concentração (x) no ponto em que o valor de a_0 intercepta a reta de regressão, e y_h é o valor de y para a projeção de x_c no limite de controle superior. As estimativas de y_h , x_c e LQ podem ser realizadas respectivamente, pela utilização das Equações 9, 10 e 11^{2,4,15}. Na Figura 4, x_c é a concentração no ponto em que y_c intercepta a reta de regressão e seu valor será igual ao de x_c somente no caso ideal de retas com inclinação igual a 45°.

$$y_h = a_0 + 2 \cdot s_y \cdot t \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{(x_c - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (9)$$

$$x_c = \left(\frac{s_y \cdot t}{a_1}\right) \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (10)$$

$$LQ = \left(\frac{y_h - a_0}{a_1}\right) + \left(\frac{s_y \cdot t}{a_1}\right) \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{(y_h - \bar{y})^2}{a_1^2 \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (11)$$

Precisão

O termo precisão fornece a dispersão dos valores medidos em torno de um valor médio, e seu valor numérico é estimado pelo desvio padrão relativo, ou DPR, para análises de amostras contendo a mesma quantidade das espécies de interesse^{1,4,6,15,17}. O DPR é ainda conhecido como CV (coeficiente de variação), ou ainda pela sigla RSD proveniente do inglês “relative standard deviation” e seu cálculo é realizado como descrito na Equação 12, em que s é o

desvio padrão ($s = \left[\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{N-1}\right]^{1/2}$) e \bar{x} é o valor médio ($\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{N}$)

do número total de medidas N , sendo x_i cada uma das medidas individuais.

$$DPR = \frac{100s}{\bar{x}} \quad (12)$$

A precisão pode ser estimada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. O termo repetibilidade, ou precisão intra-corridas, define a precisão dos resultados obtidos dentro do próprio laboratório, por um mesmo analista e com a mesma instrumentação^{6,17}. O guia ICH recomenda que sejam realizadas nove determinações contemplando toda a faixa de calibração, ou seja, três concentrações (baixa, média e alta) com amostras em triplicata, ou um mínimo de seis determinações em amostras contendo uma concentração equivalente à concentração média da faixa de calibração³.

A resolução 899 da ANVISA segue o guia ICH e determina que sejam realizadas nove determinações contemplando toda a faixa de calibração¹. O INMETRO recomenda que sejam realizadas de sete a nove replicatas para o cálculo do DPR⁵. A EPA não estabelece o número de amostras a serem analisadas para a estimativa da precisão em geral^{17,22,23}.

Cabe ressaltar que o termo utilizado em inglês é “repeatability”. No Brasil, o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental) adota o termo repetitividade e a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) adota o termo repetibilidade^{1,5}.

A precisão intermediária, ou precisão inter-corridas, define a precisão dentro de um mesmo laboratório para medidas obtidas por diferentes analistas, ou em diferentes dias, ou por equipamento diferentes^{17,22,23}. A ANVISA recomenda um mínimo de dois dias diferentes com analistas diferentes¹, e o ICH incentiva o uso de técnicas de planejamento experimental para este teste^{2,3}.

O termo reprodutibilidade define a precisão dos resultados obtidos para uma determinada análise realizada por laboratórios diferentes, mas seguindo a mesma metodologia^{1,5,7,17}.

Exatidão

A exatidão reflete a proximidade entre o valor medido (x_i) e um valor de referência considerado verdadeiro (x_v), e relaciona-se com o erro absoluto de uma medida^{1,3,6,17}. Pode ser estimada de duas formas: aplicando-se a metodologia proposta em uma substância de pureza conhecida, como por exemplo, padrões certificados; ou pela comparação com os resultados obtidos utilizando-se uma segunda metodologia, que seja bem estabelecida e com exatidão e precisão conhecidas. A EPA recomenda que a exatidão seja fornecida como a diferença (Equação 13) entre o valor predito e o valor considerado verdadeiro^{6,15,17}, enquanto a ANVISA recomenda que este parâmetro seja estimado como a razão destas duas concentrações (Equação 14)¹. A Planilha de Validação fornece a exatidão como descrito na Equação 13.

$$Exatidão = \left(\frac{x_i - x_v}{x_v}\right) \times 100 \quad (13)$$

$$Exatidão = \left(\frac{x_i}{x_v}\right) \times 100 \quad (14)$$

O guia ICH recomenda que a exatidão deverá ser estabelecida ao longo de toda a faixa de calibração especificada para o procedimento analítico somente após a precisão e a linearidade terem sido estimadas³. A ANVISA estabelece que a exatidão deverá ser verificada em três níveis de concentração, alta, intermediária e baixa, e no mínimo com determinações em triplicata¹.

Robustez

A robustez de um método é a sua capacidade de resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos sem alterar significativamente sua exatidão e precisão, portanto, é uma medida da quantidade de variabilidade que o método pode suportar, sem perder a confiabilidade, e sua estimativa depende do tipo de metodologia analítica utilizada^{1,3,5,7}.

A robustez de um método pode ser estimada variando-se os parâmetros analíticos e comparando a precisão obtida em cada determinação. A ANVISA¹ e o ICH³ indicam uma lista de parâmetros a serem avaliados nos testes de robustez de metodologias analíticas para as técnicas de preparo de amostras, espectrofotometria, cromatografia líquida e cromatografia gasosa¹. O INMETRO indica o teste de Youden⁵.

MATERIAIS E MÉTODOS

A Planilha de Validação foi elaborada no software Excel da Microsoft® Office 2003²⁴ e testada nas versões 98, 2000 e XP, e é compatível com a planilha eletrônica do pacote Open Office 2.0²⁵, de domínio público. A planilha pode ser obtida no endereço eletrônico <http://lqta.iqm.unicamp.br>²⁶.

Exemplo

A utilização da planilha será demonstrada por meio da estimativa das figuras de mérito para a implementação de uma metodologia para determinação de BTEX em amostras ambientais, utilizando o método padrão EPA8260B da Agência de Proteção Ambiental Americana¹⁷.

BTEX e a escolha da metodologia analítica

Os hidrocarbonetos voláteis benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos são constituintes dos produtos derivados do petróleo, e estão freqüentemente presentes no nosso modo de vida atual. Estes compostos, em especial o benzeno, atuam como substâncias depressoras do sistema nervoso central e dependendo da concentração e do tempo de exposição podem causar sonolência, tontura, fadiga, narcose e morte, além de apresentarem um potencial cancerígeno quando absorvidos em alta quantidade^{27,28}.

A contaminação de solo e águas subterrâneas por vazamentos de produtos derivados de petróleo, em especial os hidrocarbonetos voláteis, tem despertado cada vez mais a atenção dos órgãos de controle ambiental, devido ao risco que representam à saúde da população. Uma outra grande preocupação é a facilidade com que estes compostos se dispersam no meio ambiente, devido principalmente às suas características físico-químicas como baixo peso molecular e relativa solubilidade em água quando comparados com outros hidrocarbonetos maiores, que permitem a sua rápida difusão por corpos aquáticos e pela zona vadosa do solo²⁷⁻²⁹.

Os limites de potabilidade de água definidos pelo Ministério da Saúde (Portaria 518 de 25 de Março de 2004) para estes contaminantes são baixos, 5 µg/L para o teor de benzeno, 170 µg/L para tolueno, 200 µg/L para etilbenzeno e 300 µg/L para o teor total de xilenos³⁰, e a metodologia analítica para a sua quantificação deve ser robusta também para baixos teores.

A metodologia sugerida pela Agência de Proteção Ambiental americana¹⁷ para análise destes contaminantes em amostras de solo e água é a cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas (CG/MS), que permite a identificação e quantificação das espécies de interesse com apreciável confiabilidade¹⁷. Neste trabalho, utilizou-se esta metodologia com injeção de amostra por headspace. A identificação dos compostos foi feita empregando-se um detector de massas do tipo ion trap, e pela comparação com as análises de padrões certificados.

PARTE EXPERIMENTAL

Reagentes

Foram utilizados padrões Supelco (Bellefonte, PA) e Accustandard, Inc (New Haven, CT) contendo benzeno, tolueno, etilbenzeno e *o*-, *m*-, *p*-xilenos; padrão interno Supelco (Bellefonte, PA) contendo clorobenzeno-*d*₅, fluorobenzeno, 1,4-diclorobenzeno-*d*₄ e padrão interno Accustandard, Inc (New Haven, CT) contendo bromoclorometano, clorobenzeno-*d*₅, 1,4-diclorobenzeno. As soluções dos padrões foram preparadas em metanol grau pesticida (Tedia, Fairfield, OH), e para a solução modificadora de matriz foram utili-

zados cloreto de sódio p.a. (Merck), ácido orto-fosfórico 85% p.a.(Merck) e água ultra-purificada num sistema UHQ-OS Elga.

Soluções de calibração

As soluções de calibração foram preparadas em frascos headspace de 22 mL pela adição de 10 mL de solução modificadora de matriz (500 mL de água MilliQ, 180 g NaCl, pH 2,0 ajustado com ácido fosfórico 85%), com volumes apropriados das soluções de trabalho contendo os padrões de calibração e padrão interno utilizando microseringas "gas tight" (Hamilton, Reno, Nevada). Os frascos de headspace foram lacrados com selos de alumínio e septo de silicone.

As curvas de calibração foram construídas na faixa de concentração de 0,6 a 92,8 µg/L para benzeno, tolueno, etilbenzeno e *o*-xileno, e 1,3 a 184,8 µg/L para *m*- e *p*-xileno, pois estas espécies apresentam coeluição. As curvas foram construídas com 5 níveis de calibração e 5 replicatas de amostra, utilizando-se como padrão interno 52 µg/L de clorobenzeno-*d*₅.

Procedimento

As análises foram realizadas num sistema de GC/MS (Thermo Finnigan, ThermoQuest, Cincinnati, OH) com coluna capilar RTX-5MS de 30 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm (Restek, Corporation, Bellefonte, PA) e analisador de massas do tipo ion trap, equipado com um injetor de headspace automático Tekmar 7000 HT e um sistema de aquisição de dados XcaliburTM 31. A detecção cromatográfica foi feita no modo "Total Ion Current" (TIC). Para a corrida cromatográfica foi utilizado um fluxo de hélio de 1 mL/min, temperatura do injetor a 150 °C, temperatura da linha de transferência a 275 °C, temperatura final a 280 °C, e programa de aquecimento: 35 °C-2 min; 50 °C-0 min-6 °C/min; 100 °C-2 min-25 °C/min; 280 °C-1 min-25 °C/min. Para a aquisição dos espectros de massa utilizou-se uma variação de massa de 33-180 u, no modo "Full Scan" – 0.29 s e temperatura da fonte a 220 °C.

O uso da planilha

A planilha eletrônica possui, no total, nove planilhas para o gerenciamento dos dados e estimativa das figuras de mérito:

Instruções: esta planilha contém as instruções sobre como inserir os dados do método analítico e realizar os cálculos necessários para a estimativa das figuras de mérito (Figura 5). De maneira geral, os dados podem ser inseridos nos campos em branco e os resultados obtidos encontram-se nos campos em amarelo.

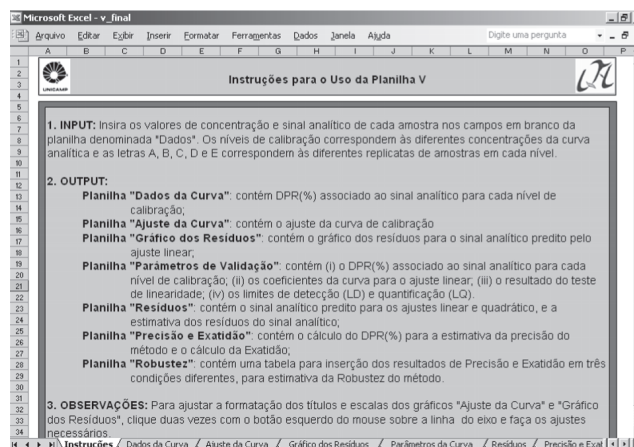


Figura 5. Planilha Instruções

Dados da Curva: esta planilha permite a inserção dos dados da curva de calibração, e a obtenção da média, desvio padrão e desvio padrão relativo (DPR) associado ao sinal analítico para cada nível de calibração (Figura 6). Os campos permitem inserir dados de até seis níveis de calibração e até cinco replicatas.

Ajuste da Curva: contém o gráfico dos ajustes linear e quadrático da curva de calibração.

Gráfico dos Resíduos: contém o gráfico dos resíduos para o sinal analítico predito pelo ajuste linear.

Parâmetros de Validação: apresenta o desvio padrão relativo (DPR) associado ao sinal analítico para cada nível de calibração, os coeficientes linear (a_0), angular (a_1) e de correlação (r) do ajuste linear, o resultado do teste de linearidade para 95, 99 e 99,9% de confiança e os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para a 95, 99 e 99,9% de confiança (Figura 7).

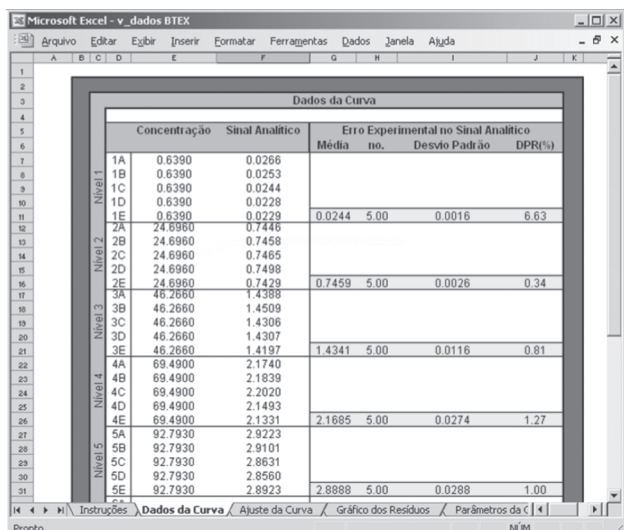


Figura 6. Planilha Dados da Curva

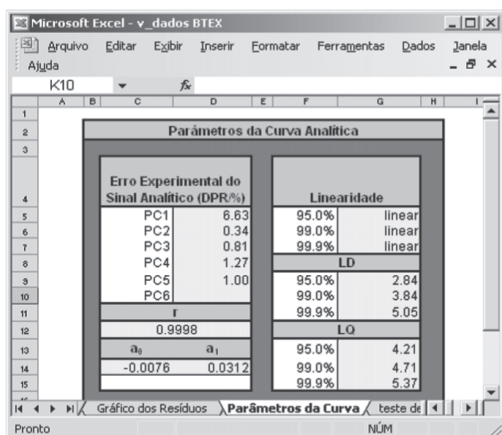


Figura 7. Planilha Parâmetros de Validação

Resíduos: contém o sinal analítico predito para os ajustes linear e quadrático, e a estimativa dos resíduos do sinal analítico, bem como a estimativa da média dos resíduos e da variância dos resíduos em cada nível de calibração.

Precisão e Exatidão: esta planilha permite a inserção dos resultados analíticos obtidos dos testes de repetibilidade, precisão inter-mediária e reprodutibilidade, e o cálculo da média, desvio padrão, desvio padrão relativo (%), resíduo absoluto e exatidão do método, que nada mais é do que o resíduo em porcentagem, em três níveis

de concentração e para até dez replicatas

Robustez: esta planilha permite a inserção dos resultados analíticos obtidos dos testes de robustez para até três diferentes condições e as respectivas estimativas da exatidão e da precisão em três níveis de concentração e para até dez replicatas.

As planilhas são protegidas, o que impossibilita que os campos referentes aos cálculos sejam alterados. O usuário poderá apenas ajustar a formatação dos títulos e escalas dos gráficos nas planilhas “Ajuste da Curva” e “Gráfico dos Resíduos”. Para tanto, basta clicar duas vezes com o botão esquerdo do mouse sobre a linha do eixo desejado e realizar os ajustes necessários.

Resultados: Estimativa das Figuras de Mérito

A estimativa das figuras de mérito necessárias à implantação do método para determinação de BTEX foi feita utilizando-se a planilha de validação. Os resultados encontram-se descritos abaixo.

Ajuste da curva e teste de linearidade

Utilizando o teste de significância descrito anteriormente foi possível determinar a faixa linear das curvas de calibração. As curvas para benzeno, tolueno, etilbenzeno e *o*-xileno apresentaram um comportamento linear para a faixa de concentração de 0,6 a 92,8 µg/L, enquanto para *m+p*-xileno esta faixa foi de 1,3 a 184,8 µg/L, com coeficientes de correlação acima de 0,999. Os coeficientes da regressão podem ser observados na Tabela 1 e na Figura 1S do material suplementar.

Tabela 1. Coeficientes da regressão linear das curvas de calibração para BTEX

compostos	coeficientes da equação linear ⁽ⁱ⁾			Linearidade
	a_0	a_1	r	Faixa Linear ⁽ⁱⁱ⁾
benzeno	-0,0076	0,0312	0,9998	0,6-92,8
tolueno	0,0046	0,0442	0,9997	0,6-92,8
etilbenzeno	-0,0504	0,0451	0,9992	0,6-92,8
<i>o</i> -xileno	0,0322	0,0488	0,9997	0,6-92,8
<i>(m+p)</i> -xileno	-0,0686	0,0434	0,9992	1,3-184,8

(i) a_0 = coeficiente linear; a_1 = coeficiente angular; r = coeficiente de correlação; (ii) valores em µg/L

Análise do gráfico dos resíduos

Os resíduos representam a parcela da variabilidade dos dados que não foi explicada pelo ajuste, e são interpretados com uma estimativa do erro do modelo. Os resíduos devem ser normalmente e independentemente distribuídos ao redor do zero, e devem apresentar média zero e variância constante. A análise do gráfico dos resíduos para os padrões BTEX apresentou este comportamento, como

Tabela 2. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) estimados para o método com 95, 99 e 99,9% de confiança

Compostos	LD (µg/L)			LQ (µg/L)		
	95%	99%	99,9%	95%	99%	99,9%
benzeno	2,8	3,8	5,1	4,2	4,7	5,4
tolueno	3,5	4,7	6,2	5,2	5,8	6,6
etilbenzeno	5,8	7,9	10,2	8,6	9,7	11,0
<i>o</i> -xileno	3,8	5,1	6,7	5,6	6,2	7,1
<i>(m+p)</i> -xileno ⁽ⁱ⁾	12,0	16,3	21,6	17,9	20,0	22,8

⁽ⁱ⁾ *(m+p)*-xileno coelum, e considerou-se a área total para quantificação.

pode ser observado na Figura 2S do material suplementar para o benzeno. As outras espécies apresentaram comportamento similar.

Sensibilidade: LD e LQ

A aplicação de um método analítico para análises ambientais

requer valores de LQ pelo menos 5% abaixo dos teores permitidos pela legislação para um composto em particular, para que se tenha uma margem de segurança na sua determinação^{6,17}. A margem de segurança de 5% abaixo dos limites regulatórios foi alcançada para todos os compostos para as estimativas do LQ realizadas com 95 e

Tabela 3. Precisão, exatidão e robustez do método

		Benzeno					Tolueno					
		C _{teórica} (µg/L)	C _{predita} (µg/L)	Exatidão (%)	Precisão Intermediária	Robustez		C _{teórica} (µg/L)	C _{predita} (µg/L)	Exatidão (%)	Precisão Intermediária	Robustez
Nível 1	1	24,7	23,6	-4,5	23,2	22,9	1	24,7	23,5	-4,9	23,3	23,1
	2	24,7	22,8	-7,7	24,8	24,6	2	24,7	22,9	-7,3	24,9	24,7
	3	24,7	23,3	-5,7	23,8	23,5	3	24,7	25,2	2,0	24,4	24,2
	\bar{x}		23,2		23,9	23,7	\bar{x}		23,9		24,2	24,0
	DPR		1,7		3,6	3,5	DPR		5,0		3,4	3,4
Nível 2	1	48,3	48,4	0,1	44,5	46,9	1	48,3	47,8	-1,1	46,1	48,4
	2	48,3	45,7	-5,5	47,0	49,6	2	48,3	47,6	-1,5	48,7	50,1
	3	48,3	45,8	-5,3	49,6	49,8	3	48,3	47,2	-2,4	50,3	51,0
	\bar{x}		46,6		47,0	48,8			47,5		48,4	49,8
	DPR		3,3		5,4	3,3	DPR		0,6		4,4	2,6
Nível 3	1	71,4	72,3	1,2	70,0	70,2	1	71,4	71,5	0,1	71,5	71,2
	2	71,4	72,0	0,8	70,0	70,2	2	71,4	74,7	4,6	71,9	71,6
	3	71,4	75,1	5,1	72,5	72,8	3	71,4	73,8	3,3	74,3	74,0
	\bar{x}		73,1		70,8	71,1			73,3		72,6	72,3
	DPR		2,3		2,0	2,1	DPR		2,3		2,1	2,1
		Etilbenzeno					o-xileno					
		C _{teórica} (µg/L)	C _{predita} (µg/L)	Exatidão (%)	Precisão Intermediária	Robustez		C _{teórica} (µg/L)	C _{predita} (µg/L)	Exatidão (%)	Precisão Intermediária	Robustez
Nível 1	1	24,7	24,0	-2,8	25,9	26,1	1	24,6	22,8	-7,5	23,8	23,7
	2	24,7	25,0	1,2	27,0	27,2	2	24,6	23,2	-5,8	25,3	25,2
	3	24,7	25,0	1,2	25,6	25,8	3	24,6	24,3	-1,4	24,9	24,8
	\bar{x}		24,7		26,2	26,4	\bar{x}		23,4		24,7	24,6
	DPR		2,3		2,8	2,8	DPR		3,3		3,2	3,2
Nível 2	1	48,3	48,9	1,2	49,0	47,2	1	48,2	46,0	-4,6	47,2	46,9
	2	48,3	49,6	2,6	46,7	51,8	2	48,2	46,5	-3,6	47,1	51,0
	3	48,3	47,8	-1,1	51,3	49,2	3	48,2	47,3	-1,9	51,3	51,5
	\bar{x}		48,8		49,0	49,4			46,6		48,5	49,5
	DPR		1,9		4,7	4,7	DPR		1,4		4,9	4,5
Nível 3	1	71,4	67,0	-6,2	72,8	73,7	1	71,2	72,9	2,3	70,3	70,0
	2	71,4	76,3	6,8	71,6	72,4	2	71,2	75,9	6,5	71,0	70,7
	3	71,4	75,8	6,1	79,7	80,7	3	71,2	71,7	0,6	74,3	74,0
	\bar{x}		73,0		74,7	75,6			73,5		71,9	71,6
	DPR		7,2		5,9	5,9	DPR		2,9		3,0	3,0
		(m+p) - xileno										
		C _{teórica} (µg/L)	C _{predita} (µg/L)	Exatidão (%)	Precisão Intermediária	Robustez						
Nível 1	1		49,1	46,3	-5,7	48,7						48,3
	2		49,1	46,5	-5,3	52,3						52,3
	3		49,1	49,7	1,2	52,3						52,3
	\bar{x}			47,5		51,1						51,0
	DPR			4,0		4,1						4,5
Nível 2	1		96,1	96,2	0,1	98,9						92,0
	2		96,1	94,8	-1,4	91,9						98,1
	3		96,1	98,0	2,0	98,1						100,2
	\bar{x}			95,3		96,3						96,8
	DPR			1,7		4,0						4,4
Nível 3	1		142,0	140,0	-1,4	147,9						148,0
	2		142,0	154,5	8,8	149,5						149,5
	3		142,0	148,1	4,5	148,3						148,3
	\bar{x}			147,5		148,6						148,6
	DPR			4,9		0,6						0,5

\bar{x} = média dos valores de concentração; DPR = desvio padrão relativo dos valores de concentração em %; a robustez foi avaliada pela determinação de BTEX em amostras de solo.

99% de confiança (Tabela 2). Com exceção do benzeno, todos os outros analitos apresentaram LD e LQ abaixo de 5% dos limites regulatórios para um nível de 99,9% de confiança. Os valores de LD foram sempre menores que os valores de LQ, como era esperado.

Precisão, exatidão e robustez

Os parâmetros precisão, exatidão e robustez foram estimados em três níveis de concentração, um para valores de concentração na primeira metade da curva de calibração, outro na região intermediária e outro na segunda metade, sempre em triplicata. A robustez foi testada pela quantificação do BTEX em duas matrizes diferentes, água e solo, previamente contaminadas com as espécies em estudo. Os resultados encontram-se na Tabela 3, em que é possível observar que, para todos os casos, o DPR não excedeu o limite de 15% estabelecido pela EPA para análise de compostos orgânicos voláteis por GC/MS utilizando injeção por headspace¹⁷.

A precisão foi estimada como repetibilidade e precisão intermediária. Para esta última, as medidas foram feitas uma semana após a primeira medida, e por um outro analista. Não foram feitos estudos de reprodutibilidade.

A robustez foi estimada variando-se a matriz estudada. O método foi desenvolvido para análises de água e solo contaminado por BTEX. Foram realizadas determinações em amostras de água e de solo, e o DPR obtido nos dois casos mostrou-se dentro dos limites estabelecidos pela EPA¹⁷.

CONCLUSÃO

O que moveu este trabalho foi a necessidade de estimar os limites de detecção, quantificação, e o teste de linearidade, utilizando-se as informações da curva de calibração, por se tratarem de estimativas baseadas em critérios estatísticos mais rígidos que as estimativas realizadas pelos métodos visual e da relação sinal-ruído. Os cálculos envolvidos nestas estimativas não são triviais, e faz-se necessário não somente o uso de planilhas de cálculo como o Excel®, mas também um conhecimento mais avançado das suas ferramentas estatísticas.

A estimativa dos outros parâmetros como ajuste da curva, exatidão, precisão e robustez é mais simples, mesmo para aquele usuário com pouca experiência no uso de planilhas. No entanto, estes parâmetros foram incluídos para que a planilha permitisse a estimativa de todas as figuras de mérito necessárias à validação de um método.

O desempenho da planilha eletrônica foi testado com um conjunto de dados real de determinação de BTEX em amostras ambientais, e todas as figuras de mérito foram estimadas com sucesso, cabendo ao usuário apenas inserir os dados referentes ao sinal analítico, às concentrações dos padrões de calibração, e no caso dos testes de exatidão, precisão e robustez, as concentrações preditas e de referência.

MATERIAL SUPLEMENTAR

As planilhas *Ajuste da Curva*, *Gráfico dos Resíduos*, *Precisão e Exatidão*, e *Robustez* poderão ser visualizadas no material suplementar do artigo, disponibilizado em <http://quimicanova.sbq.org.br>, na forma de arquivo PDF, com o acesso livre e gratuito.

AGRADECIMENTOS

Ao apoio financeiro do CTPETRO através da FINEP (6400046000 REHISOL), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ (S. C. Morano e L. R. Silva) e Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior – CAPES (F. A. L. Ribeiro).

REFERÊNCIAS

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução 899 de 29 de maio de 2003 – *Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos*.
2. International Conference on Harmonisation (ICH); *Guidance for Industry Q2A: Text on Validation of Analytical Procedures*, March 1995.
3. International Conference on Harmonisation (ICH); *Guidance for Industry Q2B: Text on Validation of Analytical Procedures*, November 1996.
4. Danzer, K.; Currie, L. A.; *Guidelines for Calibration in Analytical Chemistry, Pure Appl. Chem.* **1998**, *70*, 993.
5. Instituto Nacional de Metrologia. Normatização e Qualidade Industrial (INMETRO); *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*; DOQ-CGCRE-008, Revisão: 01 de março de 2003.
6. Maynard, A. W.; *Chemtech.* **1999**, *20*, 151.
7. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 771.
8. Baccan, N.; Andrade, J. C.; Godinho, O. E. S.; Barone, J. S.; *Química Analítica Quantitativa Elementar*, Ed. Edgard Blücher Ltda, 3ª. ed., 1998, p. 154-190.
9. <http://www.epa.gov>, acessada em Janeiro 2007.
10. <http://www.anvisa.gov.br>, acessada em Janeiro 2007.
11. <http://www.inmetro.gov.br>, acessada em Janeiro 2007.
12. www.fffchem.com, ac, acessada em Janeiro 2007.
13. www.chem.agilent.com, acessada em Janeiro 2007.
14. <http://pb.merck.de/servlet/PB/menu/1001794/index.html>, acessada em Janeiro 2007.
15. Funk, W.; Dammann, V.; Vonderheid, C.; Oehlmann, G., eds.; *Statistische Methoden in der Wasseranalytik*, VCH, 1985.
16. Pimentel, M. F.; Barros Neto, B.; *Quim. Nova* **1996**, *19*, 268.
17. US Environmental Protection Agency.; *Method 8260B - Volatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS)*, Revision 2, CD-ROM, 1996.
18. Custódio, R.; Andrade, J. C.; Augusto, F.; *Quim. Nova* **1997**, *20*, 219.
19. Draper, N. R.; Smith, H.; *Applied Regression Analysis*, 2nd ed., Ed. John Wiley & Sons: New York, 1981, Chapters 1 and 2.
20. Miller, J. N.; *Analyst* **1991**, *116*, 3.
21. Box, G. E. P.; Hunter, J. S.; Hunter, W. G.; *Statistics for Experimenters, Design, Innovation and Discovery*, Ed. John Wiley & Sons, USA, 2nd ed, 2005, p. 46.
22. US Environmental Protection Agency; *Method 8000B – Determinative Chromatography Separations*, CD-ROM, 1996.
23. US Environmental Protection Agency; *Test Methods SW846 - Test Methods for Evaluating Solid Wastes*, Chapter One: Quality Control, Revision 1, 2005. <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/main.htm>, acessada em Janeiro 2007.
24. Microsoft® Office 2003, www.microsoft.com, acessada em Janeiro 2007.
25. OpenOffice, <http://www.openoffice.org>, acessada em Janeiro 2007.
26. <http://lqta.iqm.unicamp.br>, acessada em janeiro de 2007.
27. Njobuenwu, D. O.; Amadi, S. A.; Ukpaka, P. C.; *Can. J. Chem. Eng.* **2005**, *83*, 985.
28. Costa, M. F. B.; Costa, M. A. F.; *Quim. Nova* **2002**, *3*, 384.
29. Newell, C. J.; Acree, S. D.; Ross, R. R.; Huling, S. G.; *Ground Water Issue*, EPA/540/S-95/500, U.S.EPA, R.S.Kerr Environ. Res. Lab., Ada, OK, 1995.
30. Portaria 518 de 25 de Março de 2004, Ministério da Saúde, <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2004/GM/GM-518.htm>, acessada em Janeiro 2007.
31. *Finnigan Xcalibur™ software*, version 1.2, Califórnia, (1998-2000).