

Espectrofotometria de Absorção Atômica

com chama ou com câmara de grafite para
determinação do Mg, Cu, Zn e Se

Sandra Isabel Costa

Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis
(DPSPDNT)

Unidade de Diagnóstico Laboratorial e Referência
(UDLR)

Lisboa, 29 de Novembro de 2013



- 1- Fundamentos teóricos da EAA-chama para a determinação do zinco, magnésio cobre e da EAA-câmara de grafite para a determinação do selénio.
- 2- Avaliar os resultados do novo programa de AEQ no qual começámos a participar em 2013 - *Trace elements*
- 3-Validação da metodologia de EAA para as determinações do Mg, Cu, Zn e Se

Espectroscopia de Absorção Atômica- EAA

Os três campos da Espectroscopia Atômica são:

- Emissão
- Absorção**
- Fluorescência

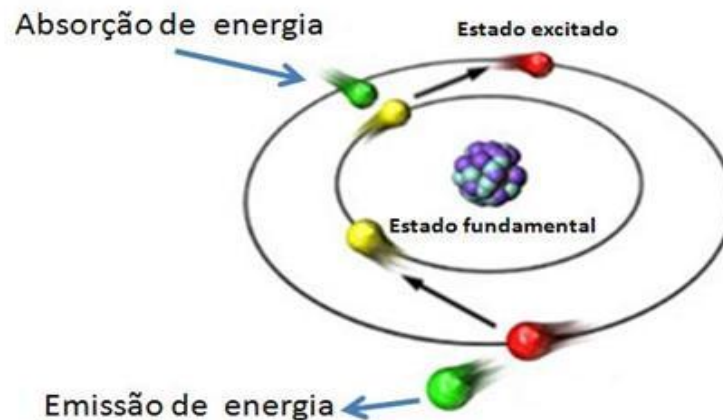
A EAA é uma técnica analítica de deteção qualitativa e determinação quantitativa de determinados elementos, recorrendo à absorção de radiação pelos átomos no seu estado gasoso.

A sua **elevada sensibilidade**, torna este método adequado para a análise **de microelementos ou elementos vestigiais**, presentes como impurezas ou como componentes normais de amostras.

Espectroscopia de Absorção Atômica- EAA

Quando a **radiação com um comprimento de onda adequado** incide num grupo de **átomos livres, no seu estado fundamental**, os átomos podem **absorver essa radiação**, passando estes para um **estado excitado- Absorção Atômica** .

Através da **medição da quantidade de radiação absorvida** pode-se determinar **quantitativamente o elemento presente**.



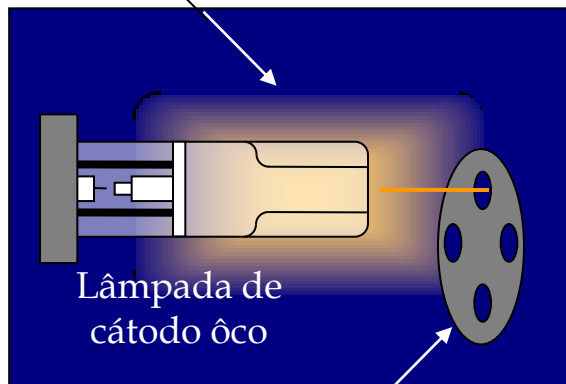
EAA por chama

Etapas do processo de atomização por chama:

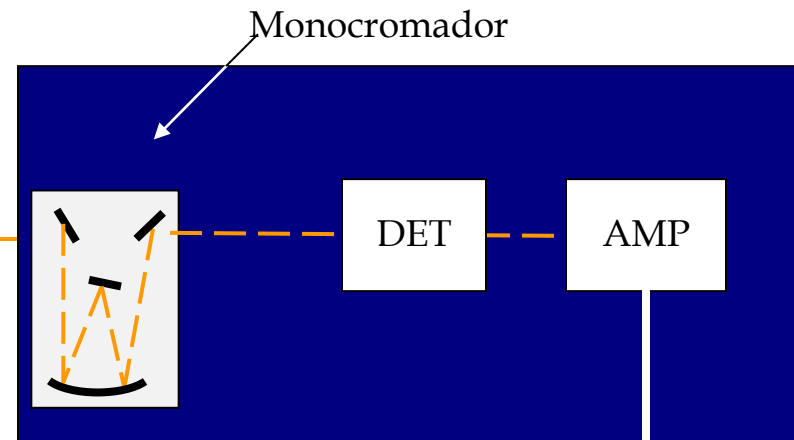
- ✓ **Aspiração da amostra**
- ✓ **Formação do aerossol**
- ✓ **Formação do “vapor atômico”**
- ✓ **Absorção da radiação eletromagnética**
- ✓ **Transições energéticas**

Os átomos mantêm-se no **estado fundamental** podendo absorver radiação de comprimento de onda conveniente.

o átomo no estado fundamental passa para um estado energético mais elevado (excitado)

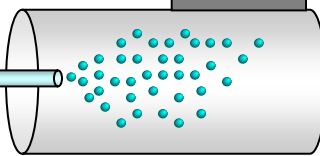


chama onde é convertida em átomos livres.



Modulador

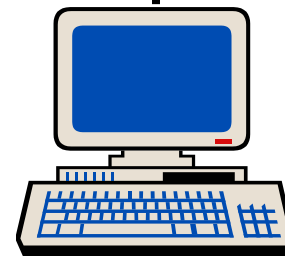
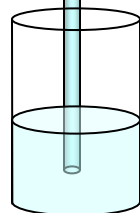
Passa para um nebulizador, onde se forma uma neblina fina (aerossol).



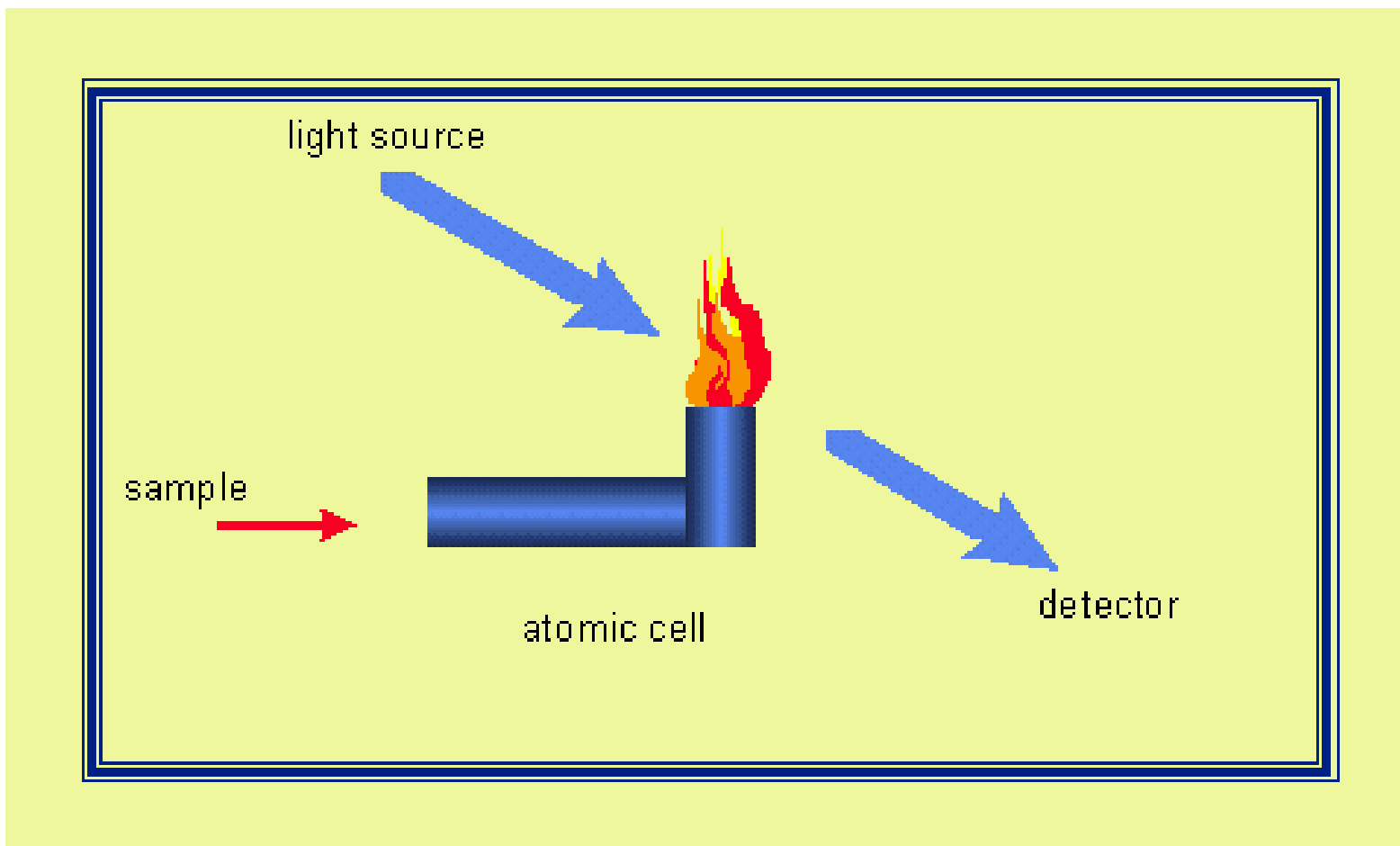
Queimador

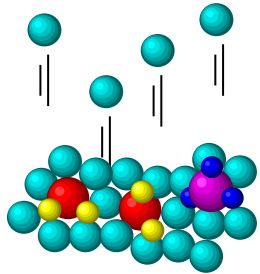
Nebulizador

A amostra em solução é aspirada

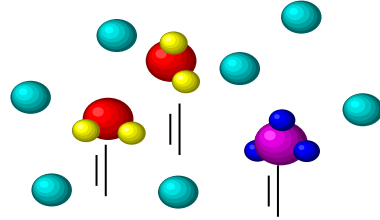


$$T = I/I_0$$
$$Abs = \log I_0/I$$

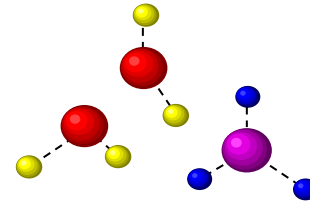




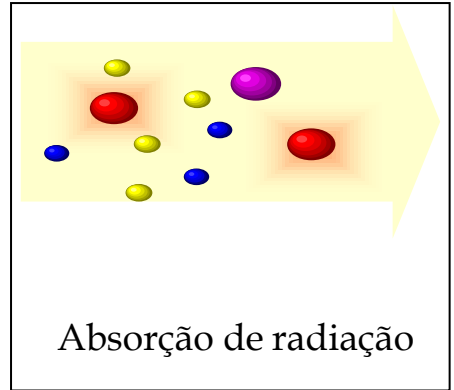
Evaporação do solvente



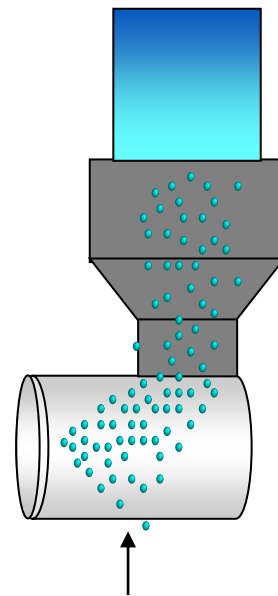
Evaporação dos solutos



Quebra de ligações



Absorção de radiação



Queimador

Nebulizador

EAA por chama

Componentes básicos de um EAA por chama

- ❖ **Atomizador**
- ❖ **Fonte emissora de radiação**
- ❖ **Monocromador**
- ❖ **Detetor de radiação**
- ❖ **Sistema de amplificação e medição do sinal**

Fonte emissora de radiação

Lâmpada de cátodo ôco

Lâmpada de descarga de vapor

Lâmpada de descarga sem eléctrodo

Lâmpada de cátodo de intensidade elevada

EAA por chama

Fonte emissora de radiação

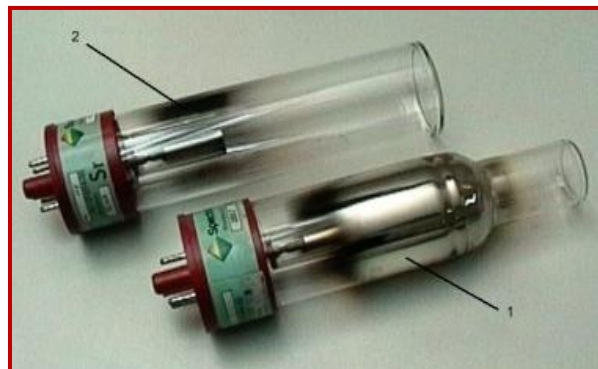
Lâmpada de cátodo ôco

Constituída por um **ânodo** e um **cátodo** que contêm o **elemento ao qual a lâmpada se destina**.

Os eléctrodos estão hermeticamente fechados numa atmosfera de um gás monoatômico ultra puro, néon ou árgon.

Só é possível analisar um elemento de cada vez (substituir a lâmpada sempre que se analisam elementos diferentes.)

Requerem uma fonte de tensão muito estável.



EAA - Interferentes

A absorção atómica é conhecida como uma técnica muito específica com poucas interferências.

Interferências em absorção atómica podem ser divididas em duas categoriais:

1-Espectrais

resultam da **absorção de radiação característica por outros elementos presentes.**

2-Não espectrais

afetam a formação dos átomos do analito, e podem ser devidas a:

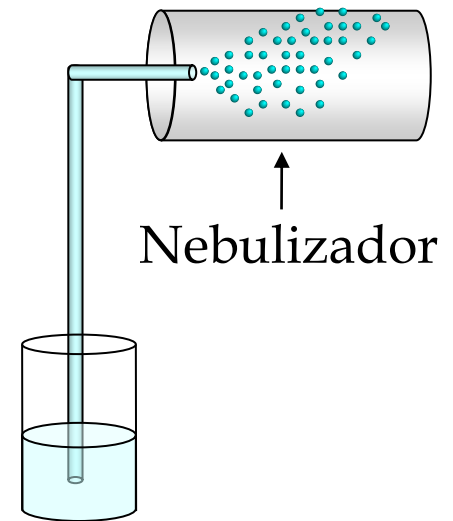
- ❖ efeito matriz
- ❖ interferências químicas
- ❖ interferências de ionização

EAA - Interferentes

Efeito matriz

A eficiência de nebulização pode ser diferente entre amostras e padrões.

se a amostra é mais viscosa,
e/ou se a tensão superficial é diferente dos padrões



Compensar este tipo de interferência:

- ajustar o mais possível a matriz dos padrões à matriz das amostras.

Ex **glicerol**

- ácido ou outro reagente adicionado às amostras durante a preparação, deverá ser adicionada aos padrões e ao branco nas mesmas concentrações.

- método de adição padrão

desvantagem: aplicado amostra a amostra (cada amostra implica uma calibração analítica).

EAA - Interferentes

Interferência química

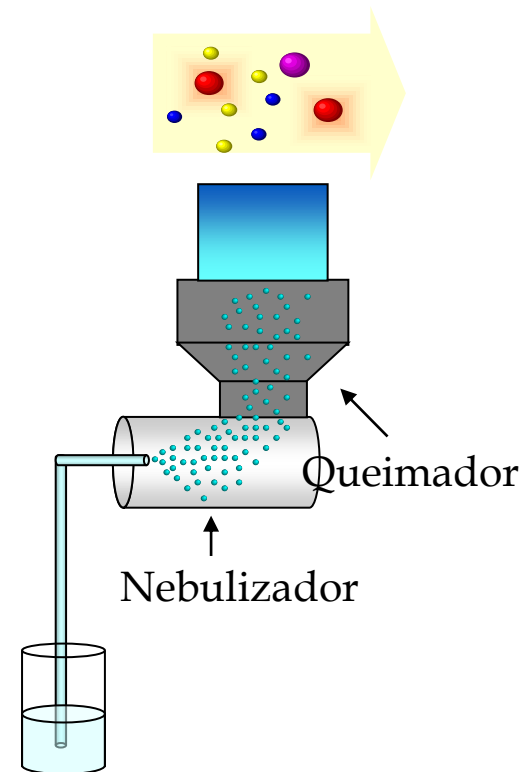
Formação de **compostos termicamente mais estáveis** com o analito, não sendo este totalmente decomposto pela energia disponível na chama

Existem duas maneiras de abordar o problema:

- Adicionar em excesso um outro elemento que irá formar preferencialmente um composto termicamente estável com o interferente

-Ex. óxido de lantânio (determinação do Mg)

- aumentar a energia da chama, através do uso de outra combinação de oxidante/combustível (nem sempre é possível porque o elemento a analisar pode decompôr-se)



EAA - Interferentes

Interferência de ionização

Estas interferências devem-se à perda de um ou mais electrões dos átomos excitados.

Ex chamas de elevada temperatura (protóxido de azoto/acetileno).

Este tipo de interferências minimizam-se:

➤ adição de um elemento facilmente ionizável

(a presença de um excesso de electrões livres faz diminuir a ionização da amostra, aumentando assim a sensibilidade do elemento em estudo.

EAA com atomização electrotérmica

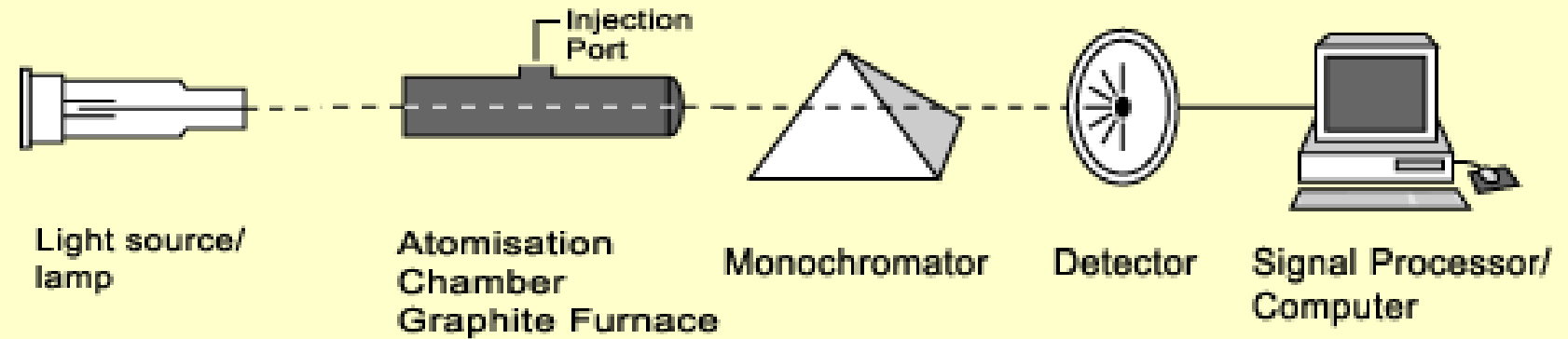


EAA com atomização eletrotérmica é também conhecida por “**em forno de grafite**”, ou “**em câmara de grafite**”, por ser habitualmente um pequeno tubo de grafite, o dispositivo onde ocorre a atomização.

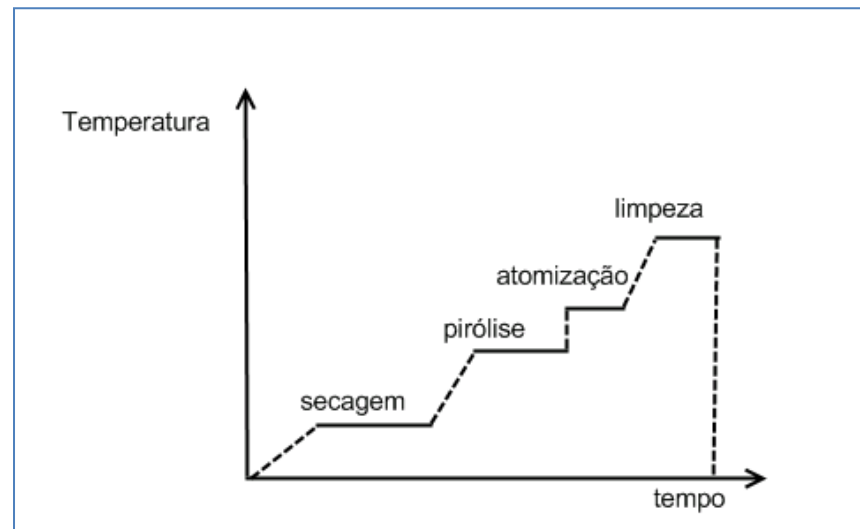
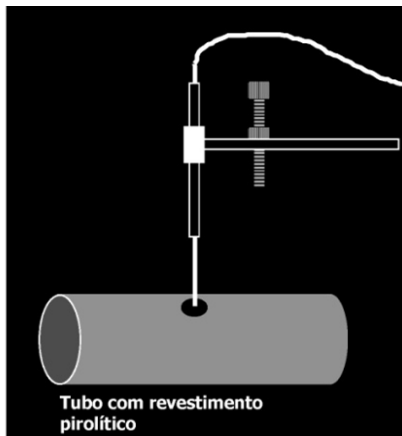
A **amostra no estado líquido, suspensão ou sólida**, é introduzida num forno ou câmara de grafite, a qual é sujeita a um aquecimento progressivo previamente programado.

O **programa de temperaturas** aplicado à câmara **depende do elemento a analisar e da matriz da amostra**.

A **precisão e exactidão** dos resultados obtidos por esta técnica estão relacionados com o **tempo e temperatura programados**.



Um programa típico de temperaturas compreende quatro patamares

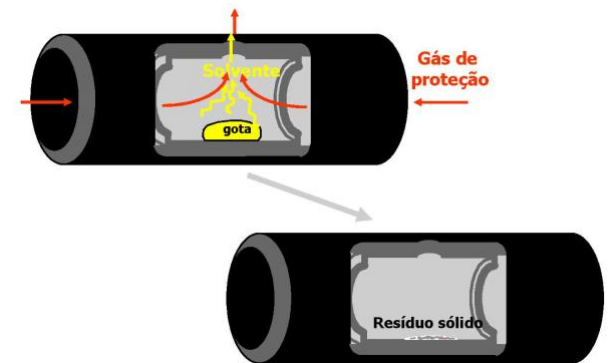


EAA com atomização electrotérmica

Etapa de secagem

Evaporação do solvente, deve ser feita de modo suave para que não ocorram projecções da amostra (decisivo para a precisão).

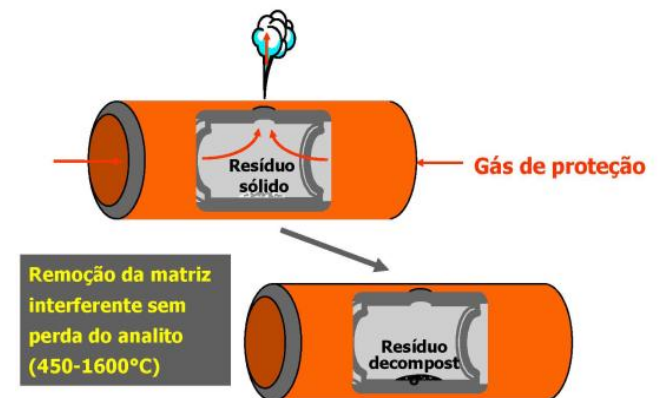
Nesta etapa faz-se passar um **fluxo de gás inerte através do tubo** para uma **secagem rápida e suave** da amostra.



Etapa da pirólise

Mineralização dos componentes da matriz, deve ser feita a uma temperatura tão alta quanto possível sem que haja perda do elemento a analisar.

Nesta etapa também se faz **passar um fluxo de gás inerte** através do tubo para eliminar vapores de constituintes da matriz ou fumos.

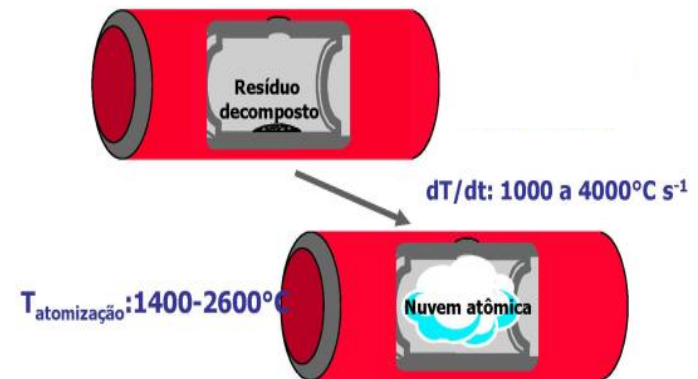


EAA com atomização electrotérmica

Etapa de Atomização

Produção do **vapor atómico**, deve ser feita à temperatura mais baixa que conduza à máxima atomização do elemento a analisar (máxima sensibilidade).

Nesta etapa, em geral, **o fluxo de gás inerte é interrompido**, uma vez que reduz o tempo de residência dos átomos no tubo de grafite, e conseqüentemente a sensibilidade do método.



Etapa de Limpeza

Eliminação de vapores constituintes da matriz.

Nesta etapa há passagem de fluxo de gás inerte.

EAA com atomização eletrotérmica

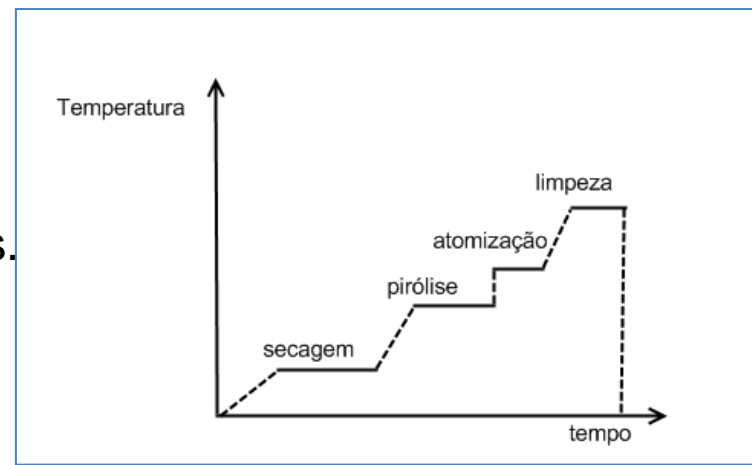
Modificadores de matriz

Substâncias que têm como função **alterar as propriedades do analito ou da matriz.**

Objetivo

Estabilizar (tornar menos volátil) o analito de modo a permitir efetuar a pirólise a temperaturas mais elevadas:

- maior eliminação dos componentes da matriz
- menor probabilidade de ocorrerem interferências.



Nitrato de Pd, Nitrato de Mg, Dihidrogenofosfato de amónio,...

EAA com atomização eletrotérmica

Background

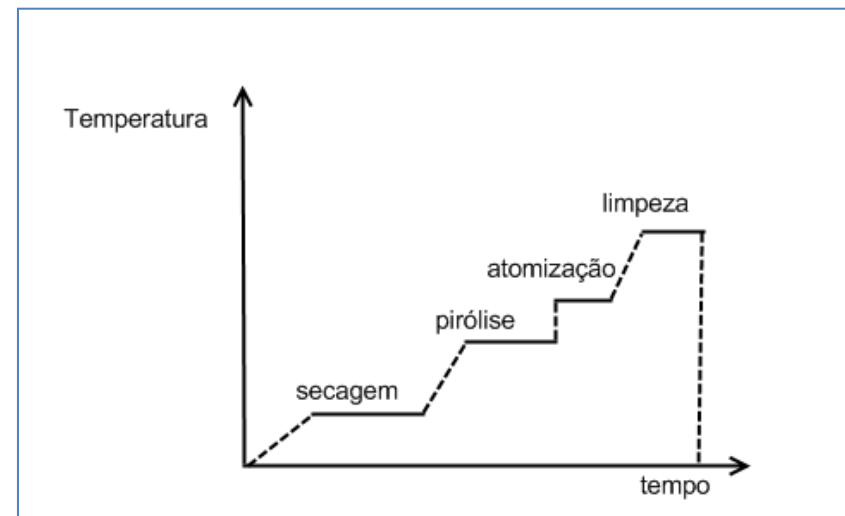
Pode ocorrer uma **atenuação adicional do feixe de absorção específico, ao nível da nuvem atômica** – devido a uma **absorção molecular** e a uma **dispersão da radiação**

Processos/Sistemas de correção do background:

Uso de lâmpadas de deutério

Com base no efeito de Zeeman

Com base no efeito de Smith-Hiettje

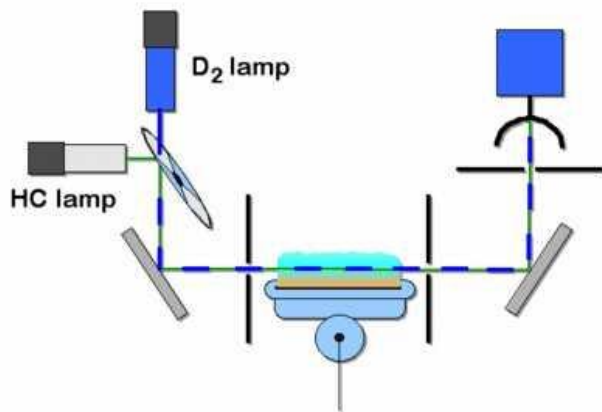


EAA com atomização eletrotérmica

Background

Lâmpadas de deutério

Background correction



1º Quando o “chopper” (modulador rotatorio) dá passagem à radiação da lâmpada de deutério D2, mede-se o Background

2º Quando o “chopper” dá passagem à radiação da lâmpada de cátodo oco mede-se a atenuação total do feixe (AA+Bkg)

3º Subtraindo o primeiro valor ao segundo, temos a Abs. Atómica (AA) específica.

EAA com atomização electrotérmica

Efeito de Zeeman

Ocorre quando a amostra é colocada num campo magnético.

A existência de uma interacção do campo magnético com os momentos magnéticos orbital de *spin* do átomo, leva à divisão da linha espectral em três ou mais.

O campo magnético é alternadamente ligado e desligado (numa frequência de frações de segundo durante a atomização).

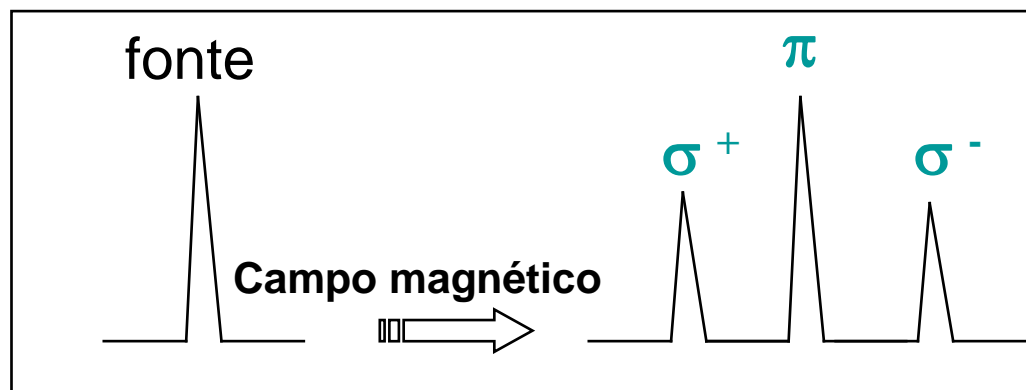
Com o campo magnético desligado mede-se a atenuação total (Amostra + Bkg)

Com o campo magnético ligado mede-se o Bkg.

EAA com atomização electrotérmica

Efeito de Zeeman

Quando o vapor atómico é submetido a um forte campo magnético os níveis electrónicos são desdobrados.



π : amostra + background

σ^+ : background

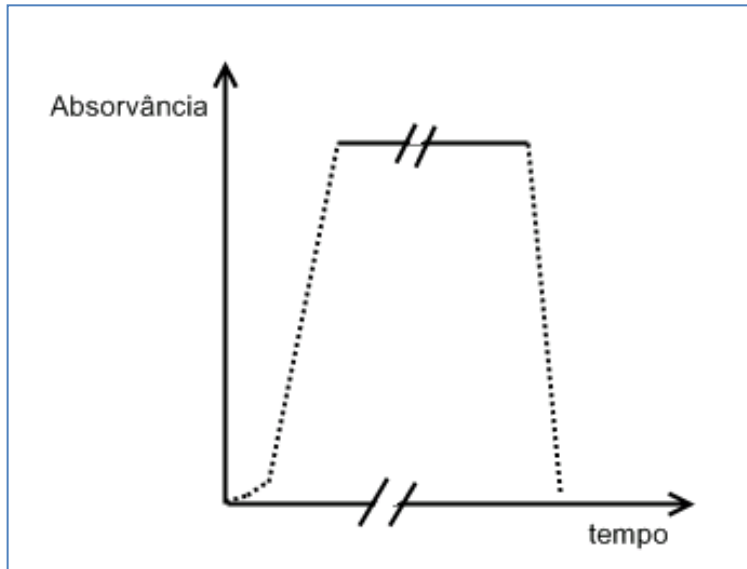
$$\pi - \sigma^+$$



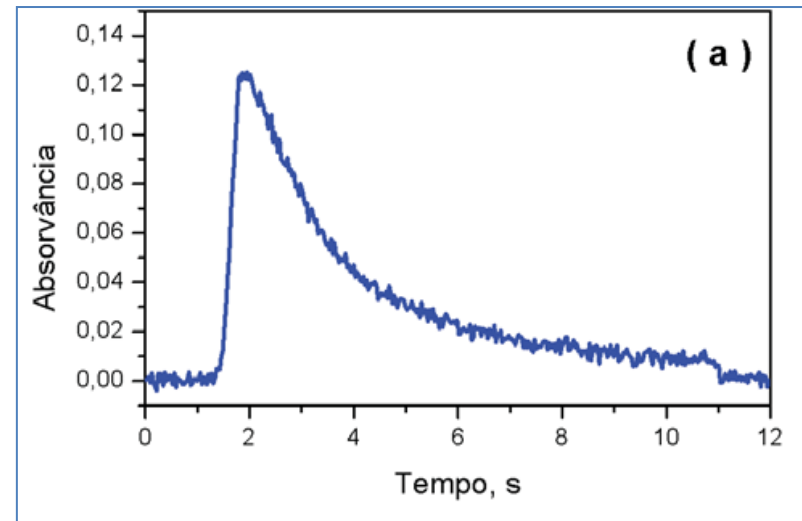
Sinal analítico

Espectroscopia de Absorção Atômica

Sinal da Chama vs Eletrotérmica



Na EAA/ chama, o **sinal é contínuo**: inicialmente sobe, correspondendo à chegada da solução à chama; depois permanece mais ou menos **constante durante o tempo em que a solução estiver a ser aspirada**.



Na EAA/ grafite, o **sinal é um pico**. A produção dos átomos e o aparecimento dos mesmos no percurso óptico, levam ao aparecimento de um sinal de absorvância. **O sinal vai ser avaliado em termos da sua área (absorvância integrada)**.

EAA com chama vs EAA câmara de grafite

Chama

Só se poder aplicar em soluções

É necessário um volume de amostra superior ao utilizado na câmara de grafite

Mais rápido

Boa precisão

Câmara de grafite

Sensibilidade cerca de 100 a 1000 vezes maior.

Permite efectuar as determinações com volumes de amostra muito mais pequenas (10 – 20 μ L).

Permite fazer determinações diretamente em amostras sólidas

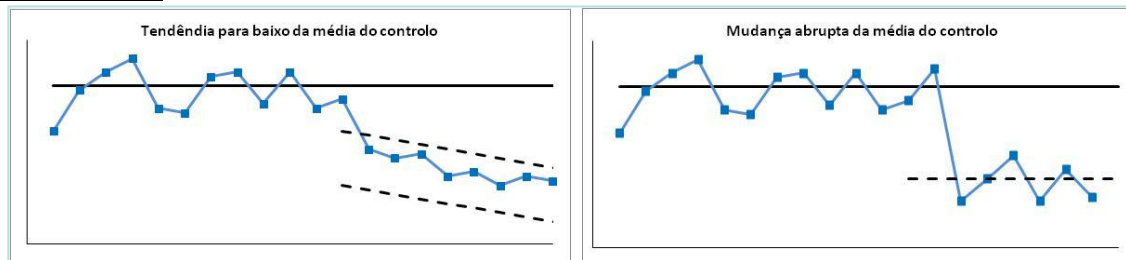
Equipamento mais dispendioso

- 1- Fundamentos teóricos da EAA-chama para a determinação do zinco, magnésio cobre e da EAA-câmara de grafite para a determinação do selénio.
- 2- Avaliar os resultados do novo programa de AEQ no qual começámos a participar em 2013 - *Trace elements*
- 3-Validação da metodologia de EAA para as determinações do Mg, Cu, Zn e Se

Tipos de erros

Erros sistemáticos:

ocorrem sempre no mesmo sentido, mas quando **identificados podem ser corrigidos ou eliminados**. Existe um desvio que assume sempre a mesma direção (positivo ou negativo) em relação ao valor esperado, interferindo assim na exatidão.



Causas mais frequentes :

- Deterioração do equipamento
- Deterioração gradual dos materiais de controlo/calibradores e reagentes
- Balança mal calibrada
- Erros sistemáticos na pipetagem
- Erros de operação

Tipos de erros

Erros aleatórios: são erros que resultam de imprecisões em medições e portanto **inevitáveis**. Afetam a reprodutibilidade e precisão dos resultados e podem ser avaliados através da repetição de medições sobre a mesma amostra.



Causas mais frequentes :

- Variações das condições ambiente do laboratório (temperatura)
- Limitações dos instrumentos de medida
- Má homogeneização dos reagentes/amostras
- Bolhas de ar no sistema

Avaliação Externa da Qualidade

O parâmetro **Bias** permite ao laboratório avaliar a sua **inexatidão**, sendo que esta corresponde ao desvio entre o valor obtido ou a média de muitos valores em repetição e o valor verdadeiro ou esperado que deveria ter sido encontrado.

$$Bias(\%) = \frac{\bar{X}_{Lab} - X_{alvo}}{X_{alvo}} \times 100$$

Avaliação Externa da Qualidade

O **erro total (ET)** é a combinação linear de erros aleatórios e erros sistemáticos, a qual origina um intervalo de valores associado a um determinado nível de confiança, que caracteriza o erro da medição.

Os dados necessários para o seu cálculo podem ser obtidos através do tratamento dos dados de **controlo interno** e da **avaliação externa da qualidade**.

$$ET = |Bias| + z * CV$$

Avaliação Externa da Qualidade

Índice de Desvio - usado para a avaliação do desempenho individual.

Estima a **exatidão** comparativamente à média ponderada/calculada pelo laboratório organizador.

$$ID = (x_{Lab} - \bar{x}_{Grupo}) / S_{Grupo}$$

A apreciação é feita seguindo os seguintes critérios:

$ID \leq 0,5$	Excelente
$0,5 < ID \leq 1,0$	Bom
$1,0 < ID \leq 2,0$	Satisfaz
$ID > 3,0$	Não satisfaz

Determinações realizadas no DPSPDNT por EAA (chama e câmara de grafite)

Microelementos	Tipo de amostra
Zn (10,7 – 18,4 $\mu\text{mol/L}$)	Soro
Se (0,58 – 1,82 $\mu\text{mol/L}$)	Soro
Cu (10,99 – 21,98 $\mu\text{mol/L}$)	Soro
Cu (0,03 – 1,26 $\mu\text{mol/L}$)	Urina
Mg (0,7 – 0,91 mmol/L)	Soro
Mg(1,0 – 3,0 mmol/L)	Sangue
Mg*	Urina

*em 2014

Avaliação Externa da Qualidade

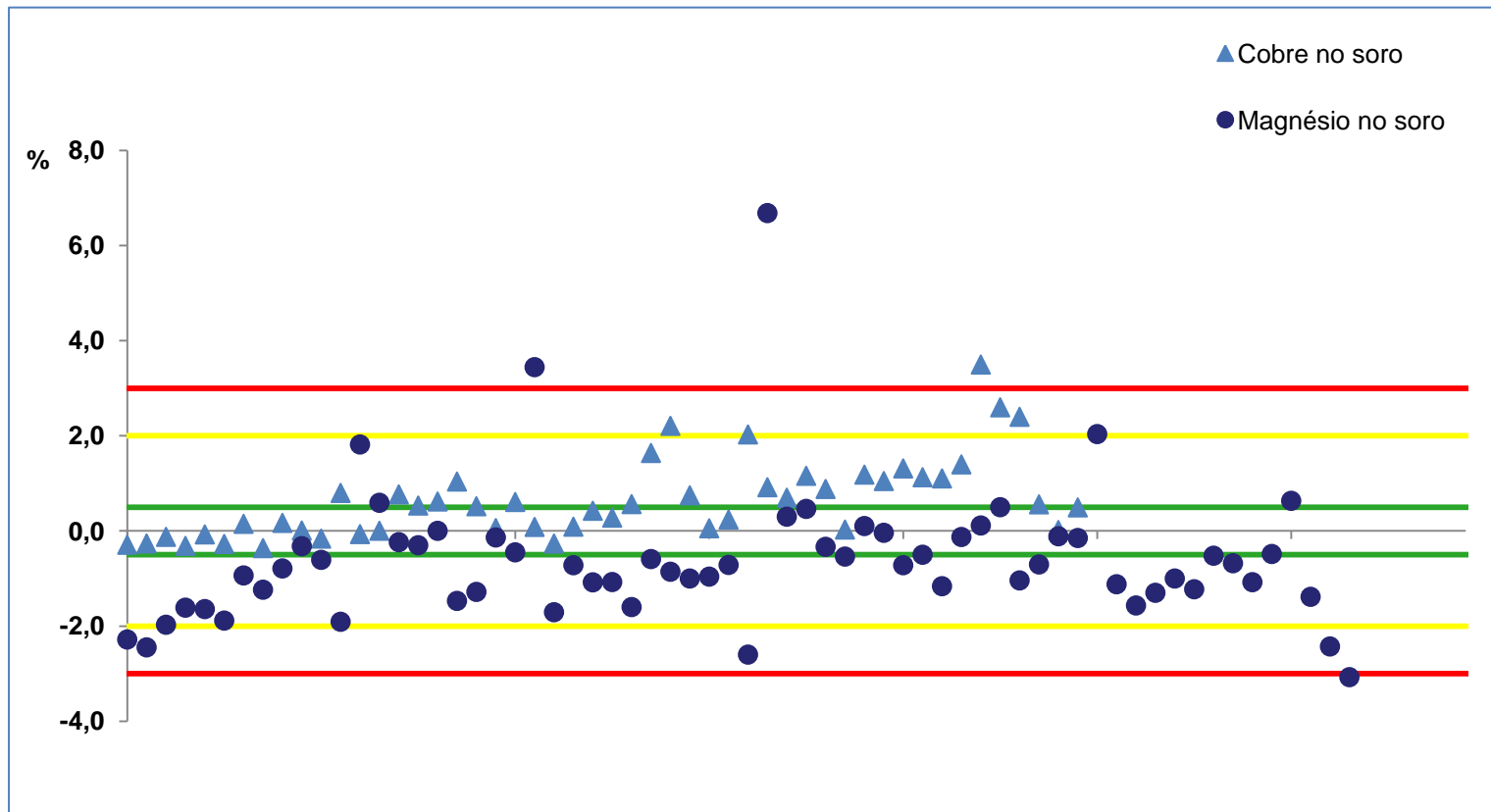
NEQAS -Programa de Química Clínica-2013

	Cu (soro)		Mg (soro)	
	Nº Ensaios	%	Nº Ensaios	%
	50		64	
Excelentes	24	48,0	18	28,1
Bom	21	42,0	38	59,4
Satisfaz	4	8,0	5	7,8
Não Satisfaz	1	2,0	3	4,7

Participámos em 114 ensaios:

- Cu (50 ensaios - soro) – 90% de desempenho bom ou excelente
- Mg (64 ensaios - soro) – 88% de desempenho bom ou excelente

Avaliação Externa da Qualidade



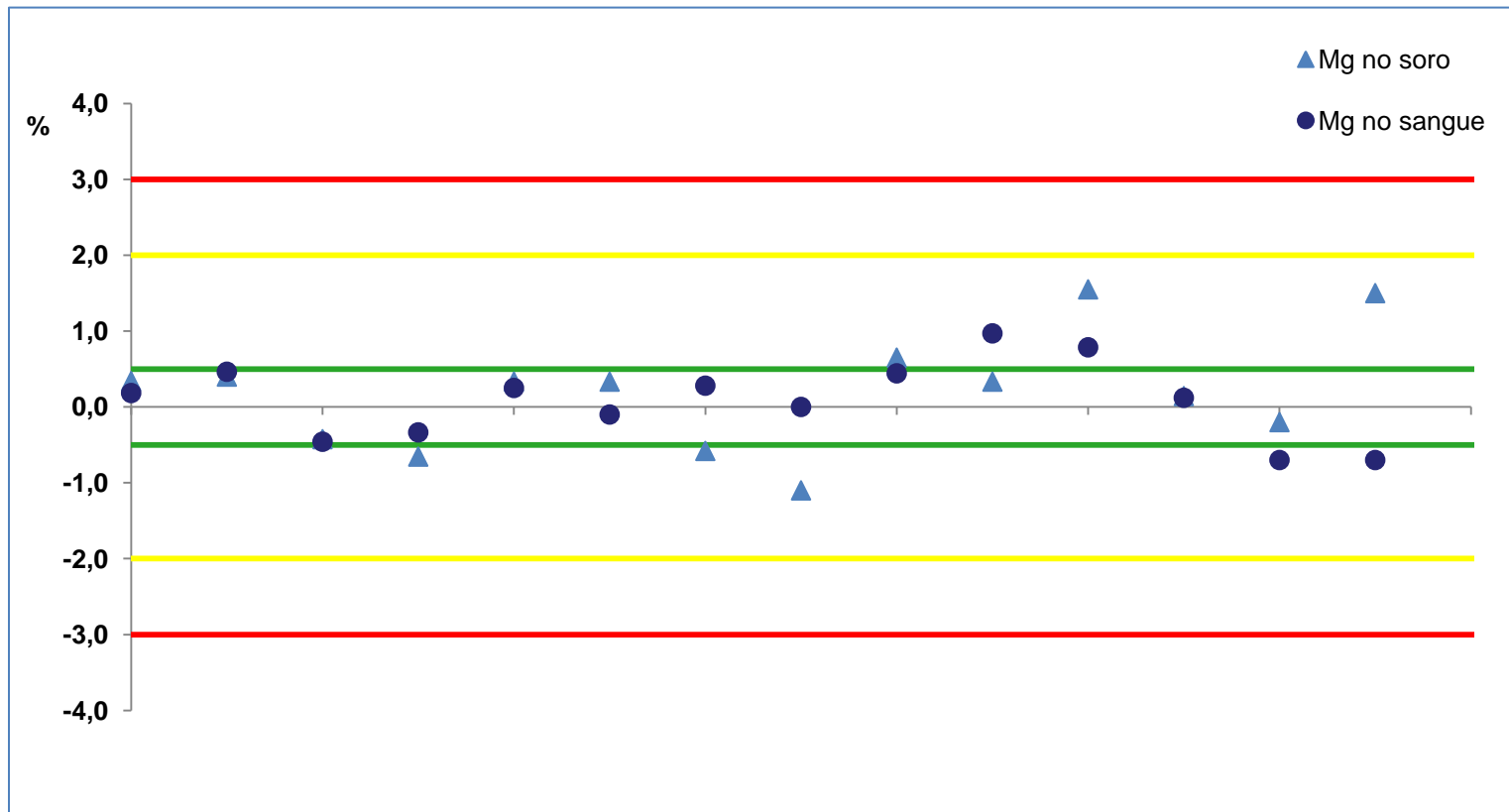
Representação gráfica dos ID calculados a partir da média de resultados obtidos com todos os métodos e o respectivo desvio padrão, para a determinação do Cu e o Mg, no soro, NEQAS- Química Clínica, 2013

Avaliação Externa da Qualidade



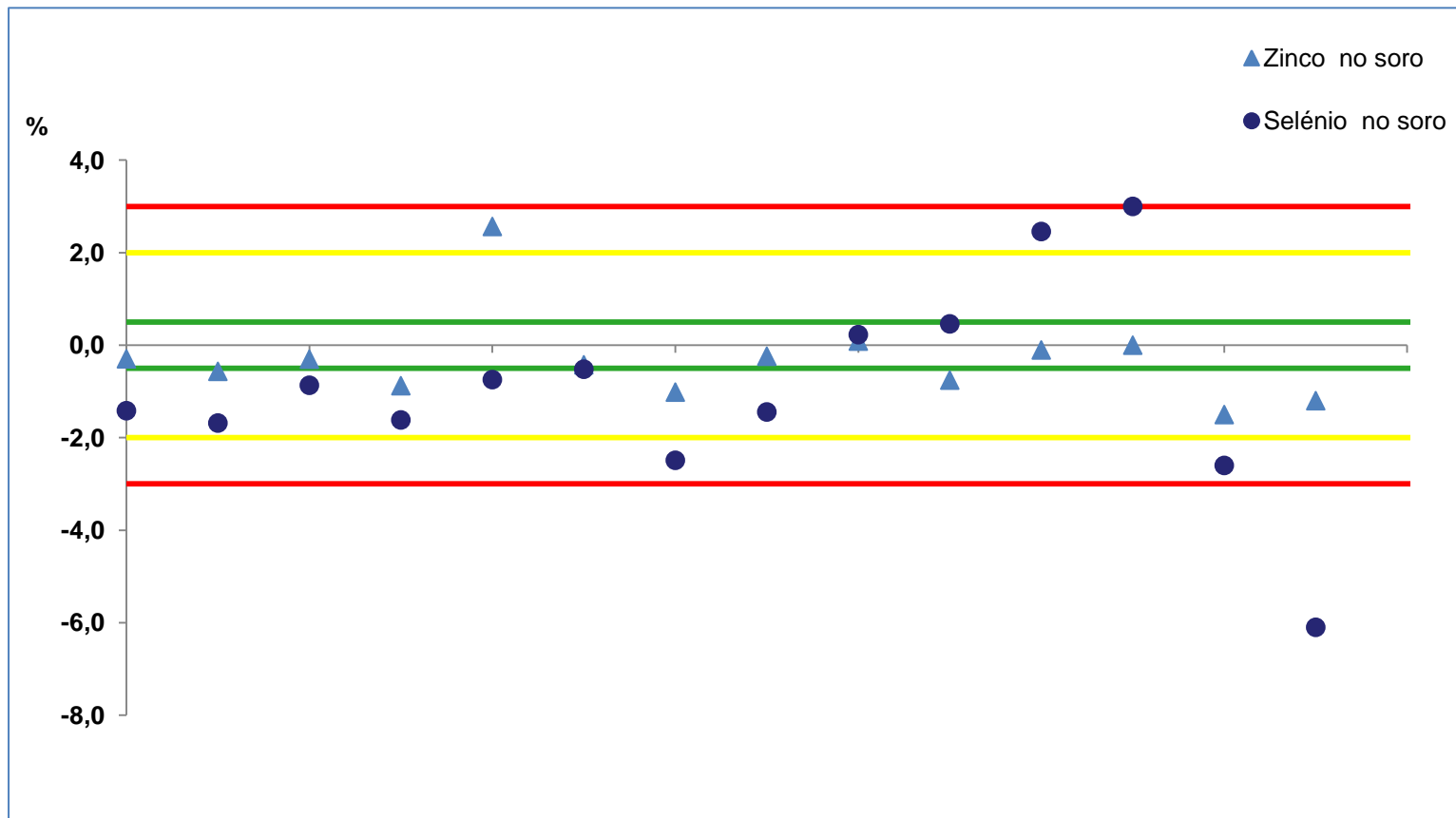
Representação gráfica dos ID calculados a partir dos resultados obtidos para os laboratório que utilizam o mesmo método que nós, para a determinação do ião Cu no soro e urina, NEQAS – *Trace Elements*, 2013

Avaliação Externa da Qualidade



Representação gráfica dos ID calculados a partir dos resultados obtidos com todos os métodos, para a determinação do ião Mg no soro e no sangue, NEQAS – *Trace Elements*, 2013

Avaliação Externa da Qualidade



Representação gráfica dos ID calculados a partir dos resultados obtidos para os laboratório que utilizam o mesmo método que nós, para a determinação do ião Zn e ião Se no soro, NEQAS – *Trace Elements*, 2013

Avaliação Externa da Qualidade

	Cu (soro) Química clínica		Cu (soro) Trace Elements	
	Nº Ensaios	%	Nº Ensaios	%
	50		14	
Excelente	24	48,0	8	57,1
Bom	21	42,0	6	42,9
Satisfaz	4	8,0	0	0,0
Não Satisfaz	1	2,0	0	0,0



Avaliação Externa da Qualidade

	Mg (soro) Química clínica		Mg (soro) Trace Elements	
	Nº Ensaios	%	Nº Ensaios	%
	64		14	
Excelente	18	28,1	8	57,1
Bom	38	59,4	6	42,9
Satisfaz	5	7,8	0	0,0
Não Satisfaz	3	4,7	0	0,0

Avaliação Externa da Qualidade

	Zn (soro) Química clínica		Zn (soro) Trace Elements	
	Nº Ensaios	%	Nº Ensaios	%
	35		14	
Excelente	5	14,3	7	50,0
Bom	27	77,1	6	42,9
Satisfaz	1	2,9	1	7,1
Não Satisfaz	0	0,0	0	0,0

Avaliação Externa da Qualidade

NEQAS –Programa *Trace elements* (soro, urina, sangue) – início no ano de 2013

Durante este ano participamos em **84 ensaios** com um desempenho de **93% de Bom ou Excelente**, 6 % de Satisfaz e 1% de Não satisfaz

Zn (14 ensaios - soro) – 93% de desempenho bom ou excelente

Mg (28 ensaios – soro e sangue) – 100% de desempenho bom ou excelente

Cu (28 ensaios – soro e urina) – 100% de desempenho bom ou excelente

Se (14 ensaios - soro) – 64% de desempenho bom ou excelente

Vantagens Participação na AEQ - *Trace Elements*

Incluir o Selénio

Inclui as naturezas de amostra: soro, urina e sangue

Maior nº de participantes com o mesmo método e/ou utilizando métodos comparáveis ex. ICP

Melhor desempenho na AEQ

Desvantagens Participação na AEQ - *Trace Elements*

Acréscimo no custo das determinações

- 1- Fundamentos teóricos da EAA-chama para a determinação do zinco, magnésio cobre e da EAA-câmara de grafite para a determinação do selénio.
- 2- Avaliar os resultados do novo programa de AEQ no qual começámos a participar em 2013 - *Trace elements*
- 3-Validação da metodologia de EAA para as determinações do Mg, Cu, Zn e Se

Guia Relacre - “Validação de Métodos internos de ensaio em análise química”

Sempre que um Laboratório utiliza **métodos internos de ensaio** terá que realizar um **processo de validação** desses métodos, que inclua todos os registos obtidos.

A validação dos métodos internos deve ser adaptada a cada caso, sendo progressivamente mais exigente para as situações indicadas:

- 1 - Uma modificação menor da técnica relativamente à norma . Neste caso as alterações não levantam dúvidas sobre a equivalência técnica dos resultados
- 2 - Uma modificação maior da técnica relativamente à norma . Neste caso as alterações levantam dúvidas sobre a equivalência técnica dos resultados.
- 3 - **Método baseado em técnica de ensaio conhecida, cuja aplicação ao ensaio pretendido venha descrita em literatura científica, não existindo uma norma de ensaio correspondente.**
- 4 - Método baseado em técnica de ensaio conhecida, mas cuja aplicação ao ensaio pretendido não venha descrita em literatura científica.
- 5 - Método baseado em técnicas de ensaio inovadoras e não descritas na literatura científica.

A situação 1,2 e 3 são mais frequentes.

A situação 4 e 5 encontram-se mais em laboratórios de investigação.

Validação da metodologia

Os requisitos mínimos para a validação de métodos internos de ensaio são:

- 1 - Gama de Trabalho/ Linearidade
- 2 - Limiares analíticos
- 3 - Sensibilidade
- 4 - Precisão
- 5 - Exatidão

Validação da metodologia

1 - Gama de trabalho/ Linearidade

Metodologia que envolve o traçado de uma curva de calibração

Curva de calibração- norma ISO 8466-1 são recomendados dez pontos de calibração, **não devendo ser um número inferior a cinco**, distribuindo-se de igual modo na gama de concentrações.

Nos processos lineares deve-se **garantir a linearidade.**

Para **processos lineares a precisão deve ser constante ao longo da gama de trabalho** – Verificar a **Homogeneidade de Variâncias**

1 - Gama de Trabalho - Verificação da Linearidade

Análise visual – Funciona bem:

- é evidente a ausência de linearidade
- quando $|R| > 0,995$ é linear

Modelo estatístico de acordo com a norma ISO 8466-1:

Teste de Mandel

A partir de um conjunto de pares ordenados, calcula-se a **função de calibração linear** (ISO 8466-I) e a **função de calibração não linear** (ISO 8466- II), bem como os respetivos **desvios padrão residuais**, $S_{y/x}$ e S_{y^2} .

Determina-se a **diferença das variâncias (DS²)** pela seguinte equação:

$$DS^2 = (N - 2)S_{y/x}^2 - (N - 3)S_{y^2}^2$$

Em que N é o número de padrões de calibração.

1 - Gama de Trabalho - Verificação da Linearidade

Calcula-se então o valor teste, VT

$$VT = \frac{DS^2}{S_{Y2}^2}$$

Compara-se este valor de **VT** com o valor tabelado da distribuição de **F de Snedecor/Fisher**:

Se $VT \leq F$ a função de calibração é linear

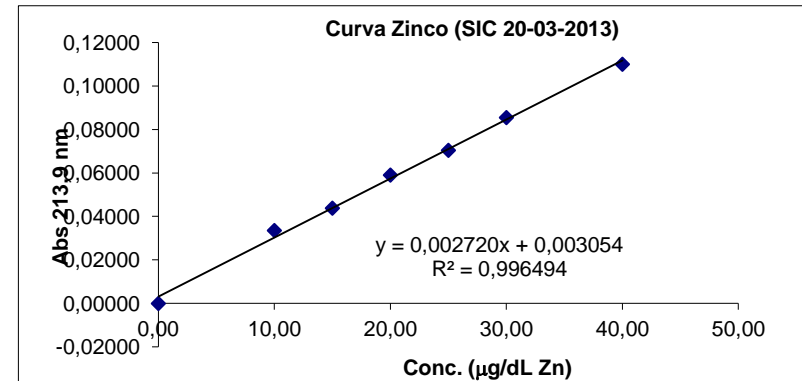
Se $VT > F$ a função de calibração não é linear

No caso de $VT > F$, deve-se avaliar a possibilidade de reduzir a gama de trabalho. Caso se justifique recorre-se à ISO 8466-2 ou a uma função susceptível de bom ajuste.

1 - Verificação da Linearidade

Exemplo Ião Zinco

Padrão	Conc (µg/dL)	Conc ² (µg/dL)	Abs experimental	Abs calculada
P0	0,0000	0,00	-0,00010	0,00305
P1	10,000	100,00	0,03350	0,03025
P2	15,000	225,00	0,04379	0,04385
P3	20,000	400,00	0,05902	0,05745
P4	25,000	625,00	0,07041	0,07105
P5	30,000	900,00	0,08548	0,08465
P6	40,000	1600,00	0,11004	0,11184



Resultados da função linear

R=	0,998245321
R2=	0,99649372
Erro - Padrão (Sy/x ou S ² _{Y1})	0,002337862
=	
ordenada na origem=	0,003054286
declive=	0,002719714
Nº	7

Resultados da função quadrática

-8,664E-06	3,066E-03	8,883E-04
4,291E-06	1,808E-04	1,710E-03
9,983E-01	0,001839	#N/D
1,150E+03	4,000E+00	#N/D
7,780E-03	1,353E-05	#N/D

2 - Teste Mandel á linearidade

Este teste só avalia qual dos dois métodos (linear ou quadrático) é melhor

DS ² =	1,3793E-05
VT=	4,076247579
F _{ctabelado} =	21,19768958

1 - Teste Visual de Linearidade

R: R² é maior que 0,995 então estamos perante uma recta.

VT ≤ F a função de ajuste linear é adequada

1 - Gama de Trabalho- Verificação da Homogeneidade de Variâncias

A **homogeneidade** pode ser avaliada através de um **modelo estatístico de acordo com a norma ISO 8466-1**.

✓ O **primeiro padrão e o último padrão** são analisados em **10 réplicas independentes**.

✓ Determina-se as **variâncias** associadas ao primeiro e último padrão do seguinte modo:

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_{i,j} - \bar{y})^2}{n_i - 1}$$

i - o n^o do padrão

j - o n^o de repetições efetuadas para cada padrão

1 - Gama de Trabalho- Verificação da Homogeneidade de Variâncias

As variâncias são testadas para examinar se existem diferenças significativas entre elas nos limites da gama de trabalho, efetuando o cálculo do valor teste (VT):

$$VT = S^2_{10} / S^2_1 \quad \text{quando } S^2_{10} > S^2_1$$

$$VT = S^2_1 / S^2_{10} \quad \text{quando } S^2_1 > S^2_{10}$$

Compara-se este valor de VT com o valor tabelado da distribuição de F de Snedecor/ Fisher, para n-1 graus de liberdade:

Se $VT \leq F$: As diferenças de variâncias não são significativas e a gama de trabalho está bem ajustada.

Se $VT > F$: As diferenças de variâncias são significativas e a gama de trabalho deve ser reduzida até que a diferença entre variâncias relativas ao 1º e último padrão permitam obter o $VT \leq F$

Caso se justifique, recorre-se à ISO 8466/2 ou a outra função susceptível de um bom ajuste.

1 - Verificação da Homogeneidade de Variâncias

Exemplo Ião Zinco

	P (10µg/dL)	P (40µg/dL)
	10,9544	38,8241
	9,9471	39,8711
	10,6068	39,0578
	10,4337	39,5146
	10,9039	40,3465
	10,1441	40,1784
	10,4866	39,7612
	10,7568	39,8464
	10,2239	40,0215
	9,8491	39,9234
nº	10	10
média	10,43	39,73
S	0,39	0,48
CV(%)	3,69	1,20
Variância	0,1484110	0,2285161
gL	9	9

Avaliação da variância

VT = 1,5398
 $F_{\text{tabelado}} (99\%) = 5,3511$
 gl 18

R: $VT < F_{\text{tabelado}}$ **Variâncias iguais. Existe Homogeneidade de Variâncias**

2 – Limiares analíticos

Limite de deteção

Teor mínimo medido, a partir do qual é possível detetar a presença do analito com uma certeza estatística razoável.

Este limiar analítico corresponde à mais pequena quantidade de substância que pode **ser detetada numa amostra, mas não pode ser quantificada com um valor exato.**

Uma leitura inferior ao limite de deteção não significa, obviamente, a ausência do analito a medir. Apenas se pode afirmar com uma probabilidade definida, que a concentração do componente em causa será inferior a um certo valor.

Em termos qualitativos, o conceito de limite de deteção corresponde à concentração mínima que é possível distinguir do branco, ou seja, de uma amostra que contém a mesma matriz mas não contém o analito.

2 – Limiares analíticos

Limite de deteção

Em termos quantitativos o limite de deteção é obtido por:

a) Caso geral

$$LD = X_0 + K S_0$$

X_0 - é a média aritmética do teor medido de uma série de brancos ou padrões vestígios (entre 10 e 20 ensaios), preparados de forma independente e lidos ao longo de vários dias de trabalho, isto é, reproduzindo o mais possível a situação de rotina.

S_0 - representa o desvio padrão associado a X_0

A lei de probabilidade de X_0 é suficientemente conhecida e partindo do princípio que é gaussiana (distribuição normal) então toma-se o valor de $K \approx 3,3$ para um nível de confiança de 99,7%.

Assim

$$LD = X_0 + 3,3 S_0$$

2 – Limiares analíticos

Limite de deteção

b) Caso em que o método envolve a utilização de uma calibração linear

$$LD = \frac{[3,3 \cdot S_{y/x}]}{b}$$

$S_{y/x}$ – é o desvio padrão residual da curva de calibração
 b – declive da reta

2 – Limiares analíticos

Limite de quantificação

Corresponde à menor quantidade de analito presente numa amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão.

Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco).

Este limiar, após ter sido determinado, deve ser testado para averiguar se a exatidão e precisão conseguida é satisfatória.

Segundo recomendações IUPAC o coeficiente de variação (desvio padrão a dividir pela média dos valores encontrados) para estes padrões não deve exceder 10%.

2 – Limiares analíticos

Limite de quantificação

Em termos quantitativos o limite de quantificação é obtido por:

a) Caso geral

$$LQ = X_0 + 10 S_0$$

X_0 - é a média aritmética do teor medido de uma série de brancos ou padrões vestígios (entre 10 e 20 ensaios), preparados de forma independente e lidos ao longo de vários dias de trabalho, isto é, reproduzindo o mais possível a situação de rotina.

S_0 - representa o desvio padrão associado a X_0

2 – Limiares analíticos

Limite de quantificação (LQ)

b) Caso do Padrão vestígio ou Branco fortificado

- padrões vestígio ou brancos fortificados independentes
- estudar exatidão e precisão

níveis aceitáveis $\leq 10\%$

c) Caso em que o método envolve a utilização de uma calibração linear

Neste caso ter-se-á:

$$LQ = \frac{[10 \cdot S_{y/x}]}{b}$$

Em que:

$S_{y/x}$ – é o desvio padrão residual da curva de calibração

b – declive da reta

2 – Limiares analíticos

Limite de Detecção/ Quantificação

Existe uma relação teórica entre o limite de deteção e o limite de quantificação (ISO/TS 13530:2009)

Para a validação do método, o limite de quantificação pode ser estimado da seguinte forma:

$$LD = \frac{LQ}{3}$$

Exemplo Zinco

LQ – (1º Padrão da CC) =10 µg/ dL

LD – 3,3 µg/ dL

3 - Sensibilidade

Quociente entre o acréscimo do valor lido ΔL e a variação da concentração ΔC correspondente aquele acréscimo.

$$Sensib. = \frac{\Delta L}{\Delta C}$$

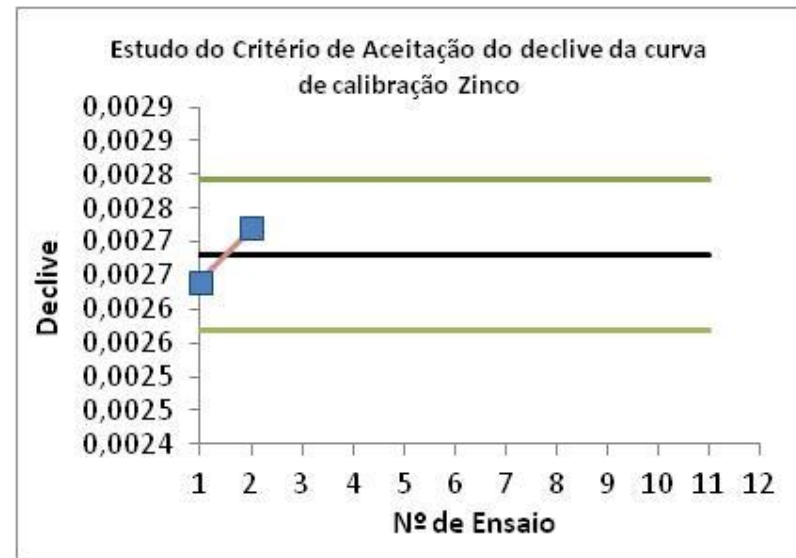
Esta característica avalia a capacidade de um método (ou equipamento) de **distinguir pequenas diferenças de concentração de um analito.**

Se a curva de calibração for definida por **um modelo linear**, a sensibilidade será constante ao longo de toda a gama de trabalho e igual ao **declive da reta de calibração.**

3 - Exemplo do estudo da Sensibilidade – ião zinco

Estudo do critério de aceitação do declive da reta de calibração analítica

Data	Referência	Nº	Declive
20-03-2013	01/2013	1	0,002641
21-03-2013	02/2013	2	0,002720
		3	
		4	
		5	
		6	
		7	
		8	
		9	
		10	
		11	
		Média	0,002681
		S	0,000056
		n-1	1
		CV(%)	2
		Média + 2xS	0,002792
		Média - 2xS	0,002569



4 - Precisão

Numericamente:

- **desvio padrão,**
- **variância**
- **coeficiente de variação**

Repetibilidade

Condições tão estáveis quanto possível (**mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo equipamento e num curto intervalo de tempo**).

Reprodutibilidade

Condições de ensaio diferentes, utilizando o mesmo método de ensaio, sobre uma mesma amostra, fazendo-se variar as condições de medição, tais como, **diferentes laboratórios, diferentes operadores, diferentes equipamentos**

Precisão intermédia

Condições intermédias **no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como:**

Diferentes analistas

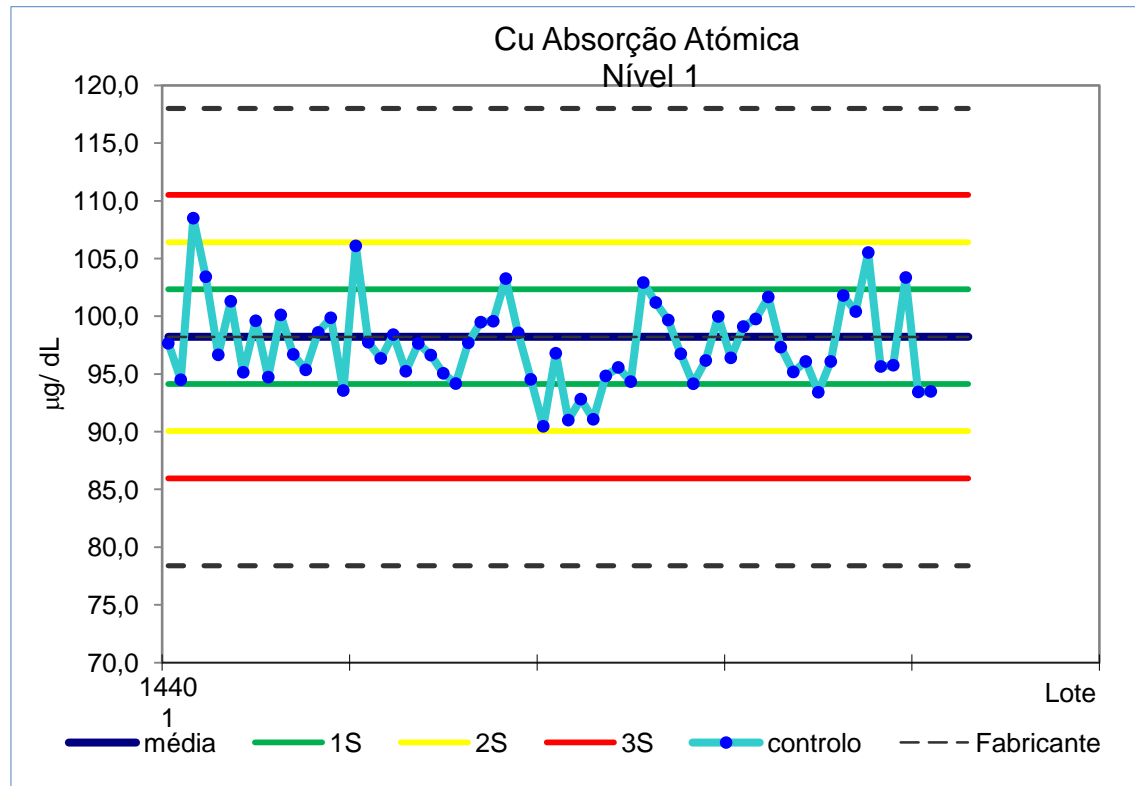
Diferentes equipamentos

Diferentes épocas

4 - Precisão

Precisão intermédia

Cu- Nível 1 Lote 14401	
Data	µg/dL
09-03-2012	97,66
14-03-2012	94,50
19-03-2012	108,50
28-03-2012	108,43
30-03-2012	96,66
18-04-2012	101,30
24-04-2012	95,15
04-05-2012	99,61
08-05-2012	94,73
16-05-2012	100,12
25-05-2012	96,70
29-05-2012	95,36
06-06-2012	98,60
06-06-2012	99,87
19-06-2012	93,57
25-06-2012	106,10
09-07-2012	97,75
17-07-2012	96,35
25-07-2012	98,41
03-08-2012	95,24
29-08-2012	97,65
31-08-2012	96,64
13-09-2012	95,06
17-10-2012	94,17
23-10-2012	97,70
Contar	25
média	98,23
sd	4,09
2s	8,19
3s	12,28
C.V. (%)	4,17



$$Si_{(T.O)} = 4,09 \mu\text{g/dL}$$

5 - Exatidão

Mede a concordância de vários resultados obtidos, por meio da comparação do seu valor médio, com o valor verdadeiro.

A **exatidão** é afetada diretamente pelos **erros sistemáticos**

Parâmetros estatísticos:

Bias

ID – índice de desvio

Bibliografia

Guia Relacre 3 - Validação de Resultados em Laboratórios químico

Guia Relacre 13 - Validação de Métodos internos de ensaio em análises química

ISO 5725-3:1994 –Accuracy (trueness and precision)of measurement methods and results- Part 3
– Intermediate measures of the precision of a standard measurement method

ISO 8466-1:1990 –Water quality – Calibration and evaluation of analytical methods and stimation of performance characteristics
Part 1 – Statistical evaluatin of the linear calibration funcion

ISO 8466-2:2001 –Water quality – Calibration and evaluation of analytical methods and stimation of performance characteristics
Part 2 – Calibration strategy for non-linear second-order calibration funcions

NCCLS, “Estimation of Total Analytical Error for Clinical Laboratory Methods; Approved Guideline”; EP21-A; Vol 23; N° 20, 2009