INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**DESENVOLVIMENTO DE SOFTWARE COMO FERRAMENTA DE
CONFIABILIDADE PARA A ANÁLISE DA ÁGUA SUBTERRÂNEA
DO IPEN**

RENAN DE AZEVEDO SILVA

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear – Materiais.**

**Orientadora:
Dra. Elaine Arantes Jardim Martins**

**SÃO PAULO
2012**

*Aos meus pais, por
todo o conhecimento,
pelo amor e confiança.*

AGRADECIMENTOS

À minha família, principalmente aos meus pais, pois sem eles eu não teria o apoio moral, o apoio educacional, o apoio financeiro e o discernimento para julgar a importância das etapas em minha vida, e sendo assim, eu não teria nada. Obrigado por tudo.

À Dra. Elaine Arantes Jardim Martins por todo carinho, amizade, atenção, disponibilidade, pelo ótimo convívio, pela descontração nos momentos complicados e pela contribuição valiosa no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Hélio Akira Furusawa por disponibilizar o conhecimento de forma tão clara que tornou a elaboração deste trabalho tranquila, pelo ótimo convívio nesse período, pelo ótimo auxílio no surgimento de novas ideias (todas idealizáveis), além de contribuir na minha formação pessoal, profissional e metrológica.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP e ao Centro de Química e Meio Ambiente, CQMA, pela infraestrutura disponibilizada para a realização deste projeto.

À Lucilena Ribeiro pelo conhecimento fornecido, por todo o auxílio e atenção dispensada.

À companheira de laboratório Juliana Ikebe pelo trabalho em equipe e pelo valiosíssimo auxílio no laboratório.

À Gisela Martini pelos momentos de descontração, chocolates, piadas, amizade e pelo auxílio nos momentos de stress.

Aos grandes amigos Rafael Marques e Alessandro Marques pela contribuição valiosa para a execução deste trabalho, pelos momentos de amizade, compreensão e colaboração no desenvolvimento de projetos paralelos, que sem esses, essa jornada teria sido muito mais difícil.

À família nipo-brasileira Takaki um muito obrigado. Para Julia, Eduardo e D. Cris e em especial ao grande amigo Jacques pelos momentos de descontração, auxílio no desenvolvimento do software e suporte no desenvolvimento e elaboração de novas ideias.

Aos amigos “acadêmicos” Caroline Lima, Juliana Silva, Flávia Junqueira, Juliana Isidoro, Carlos F. Brito, Douglas Batista, Gabriela Muchon, Patrícia Cunico, Joaquim, Tarcila, Rafael Argentino. Em especial aos amigos Fabio Pusceddu, Renata Sousa e Camila Lange pelos bons momentos vividos nesse período.

À Carla Albuquerque Garcia pelo incentivo no início do desenvolvimento deste projeto. E um muito obrigado a Clenes Rodrigues pela amizade e cumplicidade.

A todos os funcionários da pós-graduação do IPEN e do CQMA, pela disponibilidade e cortesia. Em especial: Wagner Terazan pelo auxílio nas coletas e Elias pelos assuntos aleatórios.

Ao CNPq pela bolsa concedida e apoio financeiro.

*“Conhecimento não é
aquilo que você sabe,
mas o que você faz
com aquilo que você
sabe.”*

Aldous Huxley

DESENVOLVIMENTO DE SOFTWARE COMO FERRAMENTA DE CONFIABILIDADE PARA A ANÁLISE DA ÁGUA SUBTERRÂNEA DO IPEN

RENAN DE AZEVEDO SILVA

RESUMO

Neste estudo foi proposto o desenvolvimento de um *software* para automatizar o processo de estimativa da incerteza de medição pelo método descrito no Guia EURACHEM. Com a finalidade de testar a eficácia do *software*, foi desenvolvido um procedimento analítico para a determinação de compostos fenólicos na água subterrânea do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares a fim de se obter dados reais de um processo. Para tanto, a determinação dos compostos foi realizada por cromatografia gasosa acoplada ao detector de espectrometria de massas, GC/MS. Para garantir a qualidade dos dados gerados, o procedimento analítico foi submetido ao processo de validação, onde foram avaliados os parâmetros: seletividade/especificidade, faixa de trabalho e faixa linear de trabalho, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão, recuperação e robustez. A estimativa da incerteza da medição foi realizada pelo *software* desenvolvido e manualmente, confirmando que o mesmo é adequado para o processo. Além disso, o *software* foi testado utilizando dados da literatura, o que confirmou sua eficácia. Os resultados da análise da água subterrânea demonstraram que não há a presença de compostos fenólicos nos níveis estudados. A utilização de sistemas automatizados para a estimativa da incerteza diminui ou minimiza erros sistemáticos e permite trabalhar com mais organização e controle do processo.

SOFTWARE DEVELOPMENT AS A TOOL FOR RELIABILITY ANALYSIS OF GROUNDWATER OF IPEN

RENAN DE AZEVEDO SILVA

ABSTRACT

A software development to automate the process of uncertainty measurement by the method described by the Guide EURACHEM is proposed. In order to test the effectiveness of the software, an analytical procedure for phenolic compounds determination in the ground water was developed. Water samples were collected at Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN, São Paulo, Brazil) campus area. The determination of compounds was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry detector (GC / MS). To ensure the quality of the generated data, the analytical procedure was submitted to a validation process. The evaluated parameters were: selectivity / specificity, working range and linear range, linearity, detection limit, quantification limit, precision, recovery and robustness. The uncertainty measurements were performed by the software and manually, confirming that it is suitable for the process. Moreover, the software was tested using literature data, which confirmed its effectiveness. The results of the ground water analysis showed that there are no phenolic compounds within the studied levels. The use of automated systems for the uncertainty estimation is very promising because it reduces or minimizes systematic errors and allows working in a more organized way and with the process under control.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVO.....	20
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1	AUTOMATIZAÇÃO DO PROCESSO DE ESTIMATIVA DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO	23
3.2	INCERTEZA DE MEDIÇÃO NO PROCESSO DE DETERMINAÇÃO DE UM MENSURANDO	24
4	PARTE TEÓRICA	25
4.1	INCERTEZA DE MEDIÇÃO.....	25
4.1.1	Diagrama de Causa e Efeito (Ishikawa ou Espinha de Peixe)	26
4.1.2	Incerteza Padrão	28
4.1.3	Incerteza Padrão Combinada	30
4.1.4	Incerteza Expandida	31
4.1.5	Relatando a Incerteza de Medição	32
4.2	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE ENSAIOS QUÍMICOS.....	33
4.2.1	Seletividade/Especificidade.....	34
4.2.2	Faixa de trabalho e faixa linear de trabalho	35
4.2.3	Linearidade	36
4.2.4	Limite de detecção.....	38
4.2.5	Limite de quantificação	40
4.2.6	Exatidão	41
4.2.7	Precisão	43
4.2.8	Robustez	44
4.3	COMPOSTOS FENÓLICOS.....	45
4.3.1	Fenol.....	46
4.3.2	Clorofenóis	47
4.3.3	Nitrofenóis.....	50
4.3.4	Metilfenóis	51
4.4	LEGISLAÇÕES SOBRE COMPOSTOS FENÓLICOS EM ÁGUA.....	52
4.5	METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS	54
4.5.1	Extração dos analitos	54

4.5.2	Análise instrumental	55
5	ÁREA DE ESTUDO	58
6	DESENVOLVIMENTO DO <i>SOFTWARE</i>	59
6.1	A LINGUAGEM DE PROGRAMAÇÃO VISUAL BASIC	60
6.2	ESTRUTURA DO SOFTWARE.....	61
6.2.1	Declaração das grandezas de entrada	63
6.2.2	Solução padrão e solução trabalho.....	65
6.2.3	Curva analítica	67
6.2.4	Recuperação	70
6.2.5	Relatório de análise	70
6.3	CONFIGURAÇÃO MÍNIMA EXIGIDA PELO <i>SOFTWARE</i>	71
7	PARTE EXPERIMENTAL.....	72
7.1	REAGENTES, MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	72
7.2	METODOLOGIA ANALÍTICA.....	73
7.2.1	Preparo das amostras	74
7.2.2	Condições cromatográficas	75
7.3	ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DA METODOLOGIA ANALÍTICA	77
7.3.1	Ensaio para avaliação da seletividade.....	78
7.3.2	Ensaio para avaliação da linearidade e da faixa linear de trabalho.....	79
7.3.3	Ensaio para avaliação do limite de detecção	81
7.3.4	Ensaio para avaliação do limite de quantificação.....	81
7.3.5	Ensaio para avaliação da precisão	81
7.3.6	Ensaio para avaliação da recuperação	81
7.3.7	Ensaio para avaliação da robustez	82
7.3.8	Avaliação da incerteza.....	82
7.4	QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS	86
7.4.1	Coleta	86
8	RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
8.1	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	88
8.1.1	Seletividade	88
8.1.2	Linearidade e faixa linear de trabalho	91
8.1.3	Limite de detecção.....	95
8.1.4	Limite de quantificação.....	95

8.1.5	Precisão	96
8.1.6	Recuperação	97
8.1.7	Robustez	98
8.1.8	Resultados Quantitativos e a Estimativa da incerteza de medição	101
8.1.9	Eficiência do <i>software</i>	104
9	CONCLUSÕES.....	105
10	CONSIDERAÇÕES FINAIS/ TRABALHOS FUTUROS	107
11	APÊNDICE 1	108
12	APÊNDICE 2	124
13	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores máximos permissíveis para a presença de compostos fenólicos.....	53
Tabela 2: Identificação dos padrões analíticos utilizados.	72
Tabela 3: Configuração do modo de aquisição <i>SIM</i>	76
Tabela 4: Níveis de concentração da curva analítica para os compostos estudados. ..	77
Tabela 5: Equações gerais para análise da variância (ANOVA).	80
Tabela 6: Parâmetros selecionados para o ensaio de robustez e as variações.	82
Tabela 7: Resultados dos testes estatísticos aplicados para avaliação da seletividade em água subterrânea (matriz, AS) e no solvente de eluição (sem matriz).	89
Tabela 8: Valores do teste ANOVA aplicado aos compostos estudados.	92
Tabela 9: Valores obtidos no teste <i>t</i> de <i>Student</i> para avaliação da linearidade. ($t_{\text{tab}} = 2,4$; 95%, 12 graus de liberdade).....	93
Tabela 10: Valores obtidos no teste <i>t</i> de <i>Student</i> para avaliação da linearidade (ensaio sem matriz).	93
Tabela 11: Equações da reta e coeficiente de determinação, r^2 , dos compostos avaliados. Curva analítica com matriz de água subterrânea.	93
Tabela 12: Limites de detecção calculados.....	95
Tabela 13: Coeficiente de variação (%) nos níveis de concentração avaliados.	96
Tabela 14: Valores de recuperação obtidos e as concentrações avaliadas.....	97
Tabela 15: Valores de concentração dos compostos.	101
Tabela 16: Incertezas estimadas para o procedimento proposto.	102
Tabela 17: Comparação dos valores da literatura com os valores gerados pelo software para o mesmo processo.....	104

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Etapas envolvidas em um processo de estimativa da incerteza de medição (adaptado do Guia EURACHEM/ CITAC, 2012).....	25
Figura 2: Diagrama de Ishikawa do procedimento analítico desenvolvido no presente trabalho.	27
Figura 3: Distribuição de probabilidade retangular.	29
Figura 4: Distribuição de probabilidade triangular.....	30
Figura 5: Diagrama (Corneta) de Horwitz (Fonte: Horwitz, 2006)	41
Figura 6: Variação dos parâmetros no ensaio de robustez.....	45
Figura 7: Estrutura do fenol.....	46
Figura 8: Fórmula estrutural geral dos clorofenóis. (n - nº de átomos de cloro).	47
Figura 9: Estrutura do pentaclorofenol.....	48
Figura 10: Estrutura do 2,4-diclorofenol.....	48
Figura 11: Estrutura do 2,4,6-triclorofenol.	49
Figura 12: Estrutura do 4-cloro-3-metilfenol.	50
Figura 13: Estrutura geral dos nitrofenóis (n - nº de grupos nitro).....	50
Figura 14: Estrutura do 4-nitrofenol.....	51
Figura 15: Estrutura do 3-metilfenol.	52
Figura 16: Etapas do processo de extração SPE (Fonte: Souza, 2011).	55
Figura 17: Esquema dos componentes de um cromatógrafo gasoso.....	56
Figura 18: Localização dos pontos de coleta de água subterrânea no IPEN (Fonte: PQMA, 2012).....	58
Figura 19: Representação da estrutura básica do <i>software</i> desenvolvido.	60
Figura 20: Documentos ".txt" gerados em ordem numérica crescente.	62
Figura 21: Organização das telas de declaração das grandezas de entrada.	63
Figura 22: Tela de seleção da estimativa a ser realizada (completa ou parcial).	64
Figura 23: Tela de seleção das fontes de análise para análise parcial.	65
Figura 24: Tela de declaração das grandezas de entrada da incerteza das soluções..	66
Figura 25: Tela de ajuda sobre incerteza das soluções.	66
Figura 26: Tela de declaração das incertezas dos instrumentos utilizados na elaboração da curva analítica.	67
Figura 27: Tela de declaração das grandezas de entrada relacionadas às soluções de calibração.....	68
Figura 28: Tela de declaração das grandezas de entrada da incerteza do equipamento.	68

Figura 29: Tela de ajuda da incerteza da curva analítica.....	69
Figura 30: Tela na qual são apresentadas as incertezas padrão e combinada da curva analítica.....	69
Figura 31: Tela de declaração das grandezas de entrada da incerteza da recuperação.	70
Figura 32: Exemplo de relatório de análise.	71
Figura 33: Sistema de extração em fase sólida.	73
Figura 34: Procedimento de extração.	74
Figura 35: Gráfico representativo da programação da temperatura.	76
Figura 36: Local dos pontos de coleta (AP01 a AP06).	86
Figura 37: Amostrador do tipo <i>bailer</i> , utilizado na coleta.	87
Figura 38: Cromatograma obtido na análise do padrão de concentração $1 \mu\text{g mL}^{-1}$	88
Figura 39: Tabela ANOVA para o ajuste do modelo linear do fenol.....	91
Figura 40: Representação gráfica da linearidade para os compostos estudados.	94
Figura 41: Gráfico de avaliação do desvio padrão relativo para a determinação do limite de quantificação.	96
Figura 42: Comportamento dos compostos no ensaio de robustez.	98
Figura 43: Comportamento individual dos compostos no ensaio de robustez.	99
Figura 44: Representação gráfica das incertezas individuais.....	103
Figura 45: Tela com as grandezas de entrada da incerteza da solução trabalho e pureza do padrão.	124
Figura 46: Tela opcional para o cálculo da diluição da solução trabalho.	125
Figura 47: Tela cadastramento dos instrumentos volumétricos utilizados e suas respectivas incertezas.	125
Figura 48: Tela de declaração das grandezas de entrada das soluções utilizadas no preparo da curva analítica.....	126
Figura 49: Tela de declaração das grandezas de entrada relacionadas ao equipamento utilizado.	127
Figura 50: Incertezas da curva de calibração.....	127
Figura 51: Tela de declaração das grandezas de entrada para a estimativa da incerteza no ensaio de recuperação.	128
Figura 52: Tela de emissão do resultado da incerteza expandida do processo avaliado.	129
Figura 53: Relatório final do processo de estimativa da incerteza realizado pelo software.....	129

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-DCP	2,4-diclorofenol
2,4,6-TCP	2,4,6-triclorofenol
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (Análise de variância)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	<i>Atmospheric pressure chemical ionization</i> (ionização química à pressão atmosférica)
APEs	Alquilfenóis etoxilados
APPI	<i>Atmospheric pressure photo ionization</i> (Fotoionização à pressão atmosférica)
ASI	Electrospray Ionization (Ionização por electrospray)
BIPM	Bureau International dês Poids et Mesures (Bureau Internacional de Pesos e Medidas)
CAS	<i>Chemical Abstract Service</i>
CE	Comunidade Européia
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CI	<i>Chemical ionization</i> (Ionização química)
CIPM	Comitê Internacional de Pesos e Medidas
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CV	Coeficiente de Variação
DCM	Diclorometano
DPR	Desvio padrão relativo
ECD	<i>Electron capture detector</i> (Detector por captura de elétrons)
EI	<i>Electron impact</i> (Ionização por elétrons)
ESI	<i>Electrospray ionization</i> (Ionização por electrospray)
FID	<i>Flame ionization detector</i> (Detector por ionização em chamas)
GC	Gas Chromatography (Cromatografo gasosa)
GC/MS	<i>Gas chromatography with mass spectrometry</i> (Cromatografia gasosa acoplado ao espectrômetro de massas)
GUM	<i>Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement</i> (Guia para a Expressão da Incerteza de Medição)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia líquida de alta performance)
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> (União Internacional de Química Pura e Aplicada)
LC	Liquid Chromatography (Cromatografo líquida)

LD	Limite de detecção
LC/MS	<i>Liquid chromatography with mass spectrometry</i> (Cromatografia líquida acoplado ao espectrômetro de massas)
LQ	Limite de quantificação
ME	Multiplicador de elétrons
MeOH	Metanol
MS	<i>Mass spectrometry</i> (espectrometria de massas)
m-cresol	3-metilfenol
NIOSH	National Institute for Occupational Safety and Health (Instituto Americano de Segurança Ocupacional e Saúde)
p-cloro-m	4-cloro-3-metilfenol
p-nitrofenol	4-nitrofenol
PCP	Pentaclorofenol
PID	Photo Ionization Detector (Detector de fotoionização)
PMQA	Programa de Monitoramento Químico Ambiental
PMRA	Programa de Monitoramento Radiológico Ambiental
SIM	Single Ion Monitoring
SPE	<i>Solid phase extraction</i> (extração em fase sólida)
TOF	Time of Flight (Tempo de voo)
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i> (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos)
VIM	Vocabulário Internacional de Metrologia

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a qualidade dos dados gerados em laboratórios de análise química está em evidência e tem sido discutida em diversos estudos, e muito se deve às conclusões tiradas em relação a estes, que encadeiam uma série de decisões. Pode-se exemplificar a verificação da conformidade de determinadas substâncias em relação à especificação ou a verificação do atendimento dos limites estabelecidos por determinada legislação em relação à presença de substâncias.

Apesar disso, não são suficientes apenas boas técnicas analíticas para garantir a qualidade dos dados gerados e a confiabilidade dos resultados. Visando atender determinações de legislação de órgãos e agências regulamentadoras, normas nacionais e internacionais ou simplesmente para garantir a confiabilidade, o método ou um novo método deve passar pelo processo denominado de validação de ensaio químico (Souza, 2011; INMETRO, 2010; ANVISA, 2003).

Apesar de não existir uma norma que padronize o processo de validação, no Brasil, as entidades que regulamentam e fornecem guias para validar um ensaio químico são a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, o INMETRO (Souza, 2011; INMETRO, 2010; Brito, 2009).

A validação de métodos analíticos é uma prática considerada indispensável para a realização de análises em laboratórios químicos, sendo inclusive exigida para a acreditação destes segundo os requisitos da Norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 (ABNT, 2005). A adoção e o comprometimento internacional com tal norma fortaleceram a ideia de uma análise química que apresentasse resultados com mais qualidade e que, seguindo seus requisitos, esses resultados pudessem ser compreendidos e comparados por qualquer instituição que adote essa Norma. Não só entre empresas que se relacionam comercialmente, mas também as instituições de pesquisa compreenderam que era necessária a validação dos procedimentos

analíticos que praticavam, pois tradicionalmente mantêm o *status* de referência para a sociedade.

O ato de validar um procedimento analítico é quase um ritual. Inicia-se com uma demanda que impõe um objetivo a ser alcançado. Planeja-se mais detalhadamente possível, averiguando-se as necessidades (pessoal, material, recursos, ferramentas de suporte, entre outros) e estabelecendo etapas para a execução com metas factíveis e prazos. Para cada uma dessas etapas/metaspõem-se indicadores de desempenho que deverão ser avaliados criticamente durante ou no final de cada etapa e/ou no final do processo de validação. Ao final do processo, avaliam-se os resultados para verificar se o objetivo foi alcançado e a demanda suprida. Todo esse ritual, deve ser executado utilizando-se os conhecimentos formais, referências legais e técnicas, competência e habilidade, recursos e ferramentas de suporte disponíveis, registrando-se tudo sistematicamente.

Não há nada de novo no ato da validação, a não ser manter organizadas práticas que já são realizadas normalmente e adicionar alguns detalhes formais.

Em análises químicas, validar um método é dar confiança e credibilidade analítica ao método escolhido ou desenvolvido e ao laboratório (Lanças, 2004), e por meio da utilização de ferramentas estatísticas, garantir que os resultados estejam próximos do “valor verdadeiro” (Leite, 2008). Vale ressaltar que não existe modelo pronto para validação, pois todo procedimento a ser validado está inserido em um que, mesmo semelhante a outros existentes, apresenta características próprias, únicas e limitações. Contudo, o importante na validação é conhecer essas limitações e assegurar que o sistema analítico tenha um bom desempenho, dentro dos parâmetros determinados na metodologia selecionada para a validação e que atenda a demanda a qual teve origem (Brito, 2009; Harris, 2005; Lanças, 2004).

Entretanto, mesmo que um laboratório utilize procedimentos de análise validados, ainda há a possibilidade de que esses métodos gerem resultados incompletos em base metrológica, fazendo-se necessária a adição de um atributo quantitativo (um valor) que indique o grau de certeza da medição ou do procedimento analítico utilizado. Tal valor atribuído ao resultado de medição é denominado incerteza da medição.

A incerteza de medição não é um atributo exigido por legislação ao se expressar um resultado analítico, porém a declaração de tal valor tornou-se indispensável em determinadas análises como, por exemplo, a determinação da concentração de matéria prima para a indústria farmacêutica (análise que exige alta precisão e não admite alta incerteza).

A avaliação da incerteza exige que o analista conheça e tenha domínio de todas as etapas do processo. Este deve observar atentamente todas as possíveis fontes de incerteza (das grandezas de entrada), tornando exaustiva a elaboração desse estudo. Além disso, a sequência dos cálculos envolvidos, que possuem certa complexidade para os iniciantes aumenta a possibilidade de erro e eventuais sub ou super estimação do valor da incerteza.

Visando diminuir a possibilidade de erro nesta etapa, muitos laboratórios têm informatizado/automatizado tal processo, seja esta automatização utilizando-se planilhas do *Microsoft Excel®* ou utilizando-se programas específicos para laboratórios. Essa é, aliás, uma prática recomendável, uma vez que a quantidade de dados manipulados é grande.

Ao automatizar os cálculos, algumas vezes, notam-se erros na computação dos resultados, como por exemplo, o erro numérico devido ao emprego de fórmula de desvio-padrão inadequada, erro ao estabelecer o número de algarismos significativos ou erros em simplificações ou omissões devido à utilização de formulações copiadas de material de pesquisa, como livros e apostilas de cursos, em que não se consideram as diferenças entre o modelo de aplicação original e a situação na qual se deseja aplicar tal modelo (Stempniak, 2005).

Entretanto, independente do número de algarismos significativos ou da complexidade do cálculo, um programa especialmente direcionado para o cálculo da incerteza não necessita realizar simplificações significativas para atender a metodologia do Guia para a Expressão da Incerteza de Medição (Guia EURACHEM, 2012). Pode-se utilizar nos cálculos intermediários todos os dígitos, diminuindo os erros de aproximação, que podem tornar-se significativos e provavelmente, sem a ferramenta adequada, passariam despercebidos e se propagariam ao longo do processo. Cálculos matemáticos (incluindo os arredondamentos de valores fracionados) não têm impacto sobre o fenômeno físico. Assim, o simples ato de “arredondar” (ou não) um valor não gera uma alteração no fenômeno físico, mas sim

na sua interpretação. Cabe ao profissional avaliar o alcance dessa interpretação em cada etapa do processo como um todo. Daí a recomendação de se arredondar os valores somente no cálculo final, pois assim, diminuem-se os erros de interpretação.

Mesmo possuindo a vantagem de realizar os cálculos de forma lógica, o programa, assim como um procedimento analítico, deve ser validado a fim de assegurar que o procedimento realizado nele possua qualidade comprovada.

A validação de um programa elaborado para a realização de cálculos numéricos depende essencialmente da comparação dos dados obtidos com outras formas/rotas de cálculo automatizado ou não e da literatura. Tais dados devem ser obtidos de fontes confiáveis, e comparando-se os resultados parciais e finais, pode-se assegurar a confiabilidade do tratamento de dados realizado pelo mesmo. A decisão é sempre do analista, ou seja, uma pessoa treinada e com competência comprovada.

Sendo assim, um programa desenvolvido para realizar a avaliação da incerteza em análises químicas necessita de dados para ser validado e para testar a eficácia do seu uso. Os dados que serão utilizados para testar a eficácia devem ser obtidos por meio de um processo completo de análise, que compreende o desenvolvimento do método e a análise de amostras reais.

Com a finalidade de obter dados para testar tal eficácia, no presente trabalho foi desenvolvido um método de análise para amostras ambientais.

Já há muito tempo que as preocupações ambientais não são tratadas como assuntos de promoção pessoal ou de entidades “ecológicas”. Pode-se dizer que as questões ambientais se profissionalizaram a partir de uma conscientização generalizada, tanto das pessoas quanto das organizações. As referências técnicas das normas e da legislação ambiental tornaram-se cada vez mais restritivas e importantes para cidadãos e empresas, já que devem ser discutidas partindo-se de um entendimento comum e confiável.

Devido à preocupação crescente com a qualidade da água, pois esta desempenha papel fundamental na manutenção da vida, no crescimento social e desenvolvimento econômico da sociedade, o método de análise desenvolvido visou determinar a presença de compostos fenólicos em água.

Os compostos fenólicos estão largamente presentes na natureza como componentes naturais da madeira (lignina e tanino) e são responsáveis pelas propriedades organolépticas e cores de muitas frutas e flores (Kubota *et al.*, 2001). Porém, para determinados fenóis, a principal fonte de contribuição na água é atividade antrópica e se origina principalmente da atividade industrial na produção de plásticos, corantes, tintas, antioxidantes, polímeros sintéticos, resinas, pesticidas, detergentes, desinfetantes, refinaria de óleo, produção de papel e celulose (Kubota *et al.*, 2001) e da ação direta do homem como descarte inadequado de lixo e acidentes nas atividades de produção e transporte.

Mesmo em pequenas concentrações os compostos fenólicos afetam o gosto e odor de águas potáveis, podendo apresentar efeitos tóxicos interferindo no metabolismo de animais, plantas e peixes (Kubota *et al.*, 2001).

Assim, fenóis, e especialmente seus derivados, clorados, nitrados e alquilados têm sido definidos como poluentes perigosos devido a sua alta toxicidade e persistência no ambiente, estando presentes na lista de substâncias perigosas e poluentes prioritários da Comunidade Européia, CE, e da Agência de Proteção Ambiental Norte Americana, *USEPA* (Kubota *et al.*, 2001).

Nesse contexto, é essencial que sejam desenvolvidos procedimentos analíticos para a determinação dessas substâncias nos lençóis freáticos. Procedimentos esses que envolvam desde a etapa de preparo das amostras até a quantificação e interpretação dos resultados.

Dentre as técnicas de preparação de amostras, a extração em fase sólida (*solid phase extraction, SPE*) ganha destaque entre as demais pela simplicidade, rapidez, seletividade e níveis de recuperação compatíveis com a necessidade. As técnicas de cromatografia gasosa (*gas chromatography, GC*) e cromatografia líquida (*liquid chromatography, LC*), usadas na determinação dos analitos, podem ser acopladas a diferentes detectores como *Flame Ionization Detector* (FID), *Photo Ionization Detector* (PID), *Electron Capture Detector* (ECD), entretanto, o detector por espectrometria de massas (*mass spectrometry, MS*) se destaca por apresentar alta seletividade, sensibilidade e recursos que os outros não oferecem como auxílio no desenvolvimento de métodos através de bibliotecas dos compostos de interesse e alta precisão (Souza, 2011; Richardson, 2009; Petrovic *et al.*, 2002).

Sendo assim, no presente trabalho foi desenvolvido um programa de computador para realizar a avaliação da incerteza de medição e tal programa foi validado utilizando dados da literatura. Com a finalidade de gerar dados para demonstrar a eficácia desse programa, um método de análise para a determinação de compostos fenólicos em água foi desenvolvido utilizando a técnica de extração *SPE* seguida de determinação por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas (GC/MS).

2 OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo desenvolver um programa de computador para automatizar cálculos para estimar a incerteza em análises químicas, além de desenvolver metodologia analítica para a determinação de compostos fenólicos em água subterrânea no *campus* do IPEN para testar a eficácia do programa.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um programa de computador, utilizando a linguagem de programação Visual Basic para estimar incerteza baseado no método do Guia EURACHEM;
- Validar o programa desenvolvido utilizando dados da literatura;
- Desenvolver e validar a metodologia analítica para a extração e quantificação de compostos fenólicos utilizando a técnica de extração SPE e determinação por GC/MS;
- Aplicar a metodologia desenvolvida em amostras de água bruta coletadas nos poços do IPEN;
- Utilizar os dados obtidos para testar a aplicação do programa de computador desenvolvido.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Segundo o Guia EURACHEM (2012) o conceito de incerteza de medição é relativamente novo na história da metrologia química. Entretanto, a importância da obtenção desse valor já é evidenciada, tanto que alguns autores afirmam que a estimativa da incerteza de medição de um processo é fundamental em diversas situações, como a interpretação do resultado de uma medição, a verificação de conformidade e a calibração de equipamentos, demonstrando assim, a qualidade de um resultado analítico (Guia EURACHEM, 2012; Souza, 2011; INMETRO, 2010; Jornada, 2007; EA, 2003; NPL, 2001; Sommer e Kochsiek, 2002).

Apesar de ser considerado um conceito relativamente novo, Kessel (2003) descreve a problemática em torno da confiança de um resultado de medição como uma ideia que é discutida há centenas de anos, tendo inclusive, a aplicação de métodos estatísticos e o estudo da propagação de erros utilizados desde o século 18. Porém, os resultados obtidos nessas estimativas eram inconsistentes ou não aceitos por não terem um método padronizado e utilizarem uma abordagem baseada em uma visão de erro centralizada.

Reconhecendo a falta de consenso internacional sobre a estimativa e emissão do resultado da incerteza de medição, em 1977 o Comitê Internacional de Pesos e Medidas (CIPM) solicitou ao *Bureau International des Poids et Mesures* (BIPM) que tratasse o problema em conjunto com os laboratórios a fim de homogeneizar a utilização desse conceito. Em 1980, como resultado dessa solicitação, surgiu a Recomendação INC-1 para a Expressão de Incertezas Experimentais, que foi aprovada em 1981 e ratificada em 1986. Baseada nessa Recomendação, em 1993 o ISO *Technical Advisory Group on Metrology* (ISO TAG 4) elaborou o “*Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*” (GUM) estabelecendo as bases para um consenso internacional em torno dos critérios para a expressão da incerteza de medição. Dessa forma, o GUM demonstrou que a incerteza global do ensaio ou calibração incorpora diversos componentes de incerteza que surgem de efeitos sistemáticos e aleatórios, alterando a abordagem de erro centralizado utilizada anteriormente e harmonizando as metodologias utilizadas pelos laboratórios de metrologia (Jornada, 2009).

Todo esse trabalho em relação à adequação do processo de estimativa da incerteza se fez necessário, pois atribuir o valor de incerteza ao resultado de uma análise traz informações importantes sobre o procedimento. Hardock (2007) e Hibert (2001) citam que a determinação do valor de incerteza da medição fornece informações valiosas necessárias para tomar decisões a fim de aperfeiçoar o processo de medição. Já o Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM, 2012) estabelece que a emissão do resultado de incerteza da medição é fundamental para se promover a rastreabilidade de um resultado analítico (nesse contexto, pode-se entender rastreabilidade como comparabilidade).

Atualmente, a incerteza de medição é também um dos requisitos observados pelos organismos de avaliação de laboratórios, sendo exigida para a acreditação destes pela norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 (2005). Desse modo, além de expressar o grau de dúvida associado ao resultado da medição (ABNT, 2005), a incerteza de medição passou a ser um diferencial competitivo, já que o cliente tende a buscar o laboratório que tenha melhor qualidade na sua medida, ou seja, um laboratório acreditado com baixo valor de incerteza em seus procedimentos analíticos (Jornada, 2009).

Além do método proposto pelo Guia EURACHEM (2012), a incerteza de medição pode ser avaliada por métodos que adotam outra abordagem. O método de Monte Carlo, descrito em JCGM (2008), diferentemente do Guia EURACHEM, utiliza o conceito de propagação das distribuições de probabilidade das grandezas de entrada ao invés de propagar somente as incertezas padrão das grandezas de entrada. Contudo, Willink (2007) aponta que o método é deficiente para medições práticas quando há correlações, além de exigir mais tempo para a realização de tal procedimento e ser mais difícil de ser implementado devido à complexidade dos cálculos.

Ainda em relação a métodos alternativos para a estimativa da incerteza de medição, segundo Oliveira (2009), como o número de situações no dia a dia de um laboratório não é trivial, a identificação e quantificação de todas as fontes de incertezas fizeram com que surgisse a abordagem *top-down*, baseada em estudos interlaboratoriais. Esse método é mais prático porque a maioria dos dados necessários é obtida na validação do método analítico. Além desse método, Jornada (2009) propõe a utilização de um método baseado na integração numérica via Transformadas de Fourier e de Mellin, porém, afirma também que o método é mais complexo de ser

implementado do que o método de Monte Carlo e, conseqüentemente, do que o método GUM.

Apesar de todas essas abordagens terem o mesmo objetivo, o método do Guia EURACHEM (2012) se destaca, pois estabelece um método padronizado e detalhado aceito internacionalmente, não requer o conhecimento completo da distribuição de probabilidade das grandezas de entrada e não requer a distinção entre os componentes de incerteza de origem aleatórias dos componentes de incerteza de origem sistemática (Jornada, 2009).

Entretanto, apesar de haver um guia para se realizar o procedimento de estimativa da incerteza de medição, diversos trabalhos na literatura apontam esta como uma das maiores dificuldades na implantação da norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 (Jornada *et al*, 2008; Stempniak, 2006; Carvalho, 2003; Paiva, 2003). Essa dificuldade é observada também na rotina de laboratórios, pois o processo de estimativa da incerteza de medição demanda tempo e atenção do analista, já que se não for quantificada de uma maneira adequada, a interpretação do resultado também será prejudicada.

3.1 Automatização do processo de estimativa da incerteza de medição

Uma das maneiras encontradas para evitar a estimativa equivocada do resultado da incerteza de medição é promover a utilização de softwares. De acordo com Kessel (2003), se o software possuir uma interface gráfica simples e realizar os cálculos de maneira consistente, esse será capaz de auxiliar o usuário na avaliação de suas medidas facilmente.

Segundo Reznik (2004), o desenvolvimento de um software para a avaliação da incerteza de um processo específico seria de grande utilidade para o analista, já que o desenvolvimento e a especificação de um modelo para a medição requer experiência considerável do processo. Além disso, Stempniak (2005) afirma que o uso de um software especializado para metrologia pode empregar automaticamente as melhores metodologias de cálculo, sem a necessidade de mudança nos equipamentos disponíveis, ou necessitando de pequenos custos que diante dos benefícios proporcionados por tal ferramenta, são insignificantes. Dessa forma, é possível além realizar a estimativa em menor tempo, reduzir possíveis erros de cálculo na obtenção do valor de incerteza da medição.

Porém, o software desenvolvido deve atender alguns requisitos. De acordo com Kessel (2003), o software deve operar utilizando um modelo claro e definido para todos os cálculos internos, deve ser possível inspecionar todos os dados de entrada, as regras de cálculo devem ser conhecidas, possuir uma interface simples para evitar enganos, deve armazenar os dados sem que haja perdas de informações e estes devem gerar um relatório com informações importantes sobre a análise.

Nesse contexto, fica evidenciado que a automatização do processo de estimativa da incerteza de medição, caso seja possível, torna a avaliação mais rápida, eficaz e minimiza a aparição de erros originados da realização dos cálculos manualmente.

3.2 Incerteza de medição no processo de determinação de um mensurando

Como descrito no item anterior, o valor de incerteza da medição demonstra a qualidade de um resultado analítico. Segundo Ribani (2004), em análises ambientais, é de fundamental importância que a qualidade do resultado analítico seja comprovada já que na maioria dos casos, o resultado da medição é utilizado para verificar a conformidade com valores estabelecidos em legislações e que dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis.

De acordo com Namiésnik (2009), a incerteza na determinação de um mensurando tem como fonte os erros provenientes do método de análise, os erros provenientes do instrumento de medição e os erros pessoais. Esse recomenda que a estimativa da incerteza seja realizada por um analista que tenha conhecimento de todo o procedimento analítico e que seja utilizado um diagrama de Ishikawa (que será apresentado no item 4.1.1) a fim de visualizar melhor os fatores que poderão influenciar no valor da incerteza.

Porém, para que a análise de um determinado composto tenha sua qualidade comprovada, não basta apenas promover a estimativa da incerteza, deve-se também validar o método utilizado e trabalhar as informações obtidas em conjunto, garantido desse modo uma análise confiável.

4 PARTE TEÓRICA

4.1 INCERTEZA DE MEDIÇÃO

De acordo com o Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM, 2012), a incerteza de medição é um parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas. Portanto, a declaração da incerteza nada mais é do que a estimativa (quantitativa) dos limites dentro dos quais os desvios do valor de um mensurando são previstos de se situar (Guia CITAC/EURACHEM, 2012).

A incerteza de medição compreende, em geral, muitos componentes. Na prática, um resultado pode ser obtido de muitas fontes possíveis, como por exemplo, amostragem, efeitos da matriz e interferências, condições ambientais, incerteza das massas e equipamentos volumétricos, valores de referência, aproximações e suposições incorporadas ao método e ao procedimento de medição, e a variação aleatória (Guia CITAC/EURACHEM, 2012).

Por isso, em um processo de estimativa da incerteza de medição devem-se avaliar atentamente todas as possíveis fontes de incerteza a fim de contemplar todos os possíveis desvios de um procedimento de análise, atribuir um valor a essas fontes, quantificar o valor de cada uma e combiná-las para obter um valor que represente a incerteza total do processo. De uma maneira geral, as etapas envolvidas em um processo de estimativa da incerteza estão representadas na FIG 1.

Figura 1: Etapas envolvidas em um processo de estimativa da incerteza de medição (adaptado do Guia EURACHEM/ CITAC, 2012).

No contexto da estimativa da incerteza, a especificação do mensurando requer tanto o estabelecimento claro e não ambíguo do que está sendo medido, quanto uma expressão quantitativa relacionando o valor do mensurando aos parâmetros dos quais ele depende (Guia EURACHEM, 2012). Mas essa é uma condição óbvia, pois se não fosse atendida, o valor associado ao mensurando (resultado da análise química, por exemplo) não estaria sendo calculado corretamente.

Porém é o processo de análise das fontes de incerteza que requer maior cautela. Assim, é necessário estabelecer uma lista de fontes de incerteza relevantes de cada uma das grandezas de entrada do método analítico e estruturar esse processo, tanto para assegurar uma cobertura abrangente quanto para evitar contagem em excesso (Guia EURACHEM, 2012).

A melhor maneira de evitar possíveis duplicações e identificar, simplificar e agrupar as incertezas envolvidas em um processo de medição é elaborando um Diagrama de Causa e Efeito (Diagrama de Ishikawa ou espinha de peixe).

4.1.1 Diagrama de Causa e Efeito (Ishikawa ou Espinha de Peixe)

O Diagrama de Causa e Efeito, além de organizar visualmente o processo, fornece uma análise adequada e estruturada das contribuições de incerteza desse processo. Dessa forma, o diagrama auxilia a identificação dos efeitos sobre um resultado e assegura que os efeitos não sejam duplicados, como mencionado anteriormente.

Na FIG. 2 é apresentado o Diagrama de Causa e Efeito para a metodologia proposta no presente trabalho com o objetivo de identificar e determinar compostos fenólicos clorados em amostras de água subterrânea.

Figura 2: Diagrama de Ishikawa do procedimento analítico desenvolvido no presente trabalho.

4.1.2 Incerteza Padrão

Determinar a incerteza padrão é o passo inicial no processo da estimativa da incerteza. Essa nada mais é do que a quantificação da variabilidade de cada fonte, representada como desvio padrão, por exemplo.

O desvio padrão é a forma mais simples da representação da incerteza calculada e é classificada como incerteza tipo A. A incerteza do tipo B é obtida por outros meios que não estatísticos.

A incerteza do tipo A baseia-se em preceitos estatísticos relacionados a processos onde se podem obter média e desvios padrão de medidas repetitivas da amostra de interesse (Leite, 2008).

A incerteza tipo A é calculada a partir da média aritmética de um conjunto de dados quando “n” observações independentes forem obtidas sob a mesma condição. A média aritmética é calculada de acordo com a equação 1.

$$\bar{x}_l = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n x_{l,k} \quad (\text{eq. 1})$$

A partir do resultado da média aritmética, é obtida o desvio padrão, que mede a dispersão de um conjunto de resultados experimentais e é calculada de acordo com a equação 2.

$$s(x_i) = \sqrt{\frac{1}{(n-1)} \sum_{k=1}^n (x_{i,k} - \bar{x}_l)^2} \quad (\text{eq. 2})$$

Calcula-se então o desvio padrão da média que é a medida de dispersão dos resultados da amostragem em relação à média das séries de medições, de acordo com a equação 3.

$$s(\bar{x}_l) = \frac{s(x_i)}{\sqrt{n}} \quad (\text{eq. 3})$$

O valor obtido como o desvio padrão da média, $s(\bar{x}_l)$, é o valor da incerteza tipo A.

A incerteza do tipo B baseia-se em dados já conhecidos como histórico de medidas, certificados de calibração, especificações do equipamento e manuais técnicos (Leite, 2008). O uso adequado de tais informações exige conhecimento e discernimento sobre os fatores que podem influenciar na medida.

Assim, para a estimativa de uma grandeza de entrada que não tenha sido obtida de observações repetidas, a incerteza padrão é avaliada pelo julgamento específico baseado em todas essas informações fornecidas variando-se de acordo com suas características.

Em alguns casos, é possível estabelecer limites para a grandeza de entrada, como por exemplo, a variação da temperatura. Ao estabelecer um limite, há a probabilidade de o valor estar dentro desse intervalo como é igualmente provável encontrá-lo em toda parte dentro desse intervalo (Guia EURACHEM, 2012). Desse modo, a incerteza é calculada por " $a/\sqrt{3}$ " estabelecendo-se uma distribuição uniforme ou retangular, conforme apresentado na FIG.3.

Figura 3: Distribuição de probabilidade retangular.

Quando não há informações sobre os valores da grandeza de entrada e nem limites de probabilidade para esses valores, assume-se que os valores de distribuição perto dos limites especificados são menos prováveis do que os valores próximos ao centro. Dessa forma, a incerteza é calculada por " $a/\sqrt{6}$ " assumindo-se uma distribuição triangular (Guia EURACHEM, 2012), conforme a FIG. 4.

Figura 4: Distribuição de probabilidade triangular.

4.1.3 Incerteza Padrão Combinada

Após todas as fontes de incerteza serem expressas com um valor quantitativo, essas incertezas são combinadas com o objetivo de gerar um resultado único que represente a incerteza total do processo. Sendo assim, a incerteza padrão combinada é a combinação de todas as incertezas padrão individuais obtidas por meio da avaliação das fontes de incerteza que interferem no método em questão.

Partindo-se do princípio que todas as incertezas padrão foram normalizadas e são independentes (relação observada nas incertezas do presente trabalho), a relação entre as incertezas padrão dos parâmetros independentes e a incerteza padrão combinada é dada pela equação 4.

$$u_c(y(x_1, x_2, \dots)) = \sqrt{\sum_{i=1,n} u(y, x_i)^2} \quad (\text{eq. 4})$$

onde:

$u_c(y(x_1, x_2, \dots))$ = incerteza padrão combinada de um valor y e x_1, x_2 e x_n são os fatores dos quais ela depende;

$\sum_{i=1,n} u(y, x_i)^2$ = somatória do quadrado das incertezas independentes.

Como a incerteza combinada de qualquer método analítico é calculada com base nas incertezas padrão de cada grandeza de entrada, o nível de confiança de tal incerteza é de 68%, o que correspondente a 1 desvio padrão na distribuição normal (Ramos, 2003). Portanto, há a necessidade de aumentar esse intervalo de confiança para valores em torno de 95% ou 99%, que são valores mais representativos e usuais em análises químicas. Portanto, a incerteza combinada deve ser expandida para atingir esses valores de confiança.

4.1.4 Incerteza Expandida

Embora a incerteza combinada possa ser usada para expressar a incerteza de um resultado de medição, é necessário apresentar uma medida que defina um intervalo sobre esse resultado.

Existem recomendações de que as incertezas de qualquer medida sejam apresentadas de forma a abranger uma fração maior da distribuição de valores que estariam sendo atribuídas ao mensurando (Ramos, 2003). Nesse contexto, a incerteza expandida é a informação sobre o processo de estimativa da incerteza que satisfaz essa recomendação.

A estimativa da incerteza expandida sugerida pelo Guia EURACHEM (2012) parte da hipótese de que a distribuição resultante do mensurando é uma distribuição do tipo T (representada pela tabela t de *Student*) e para determiná-la é necessário estimar o número de graus de liberdade efetivos da medição. Este número é o resultado das contribuições individuais de incerteza individuais de cada variável e do número de medições realizadas.

Desse modo, o número de graus de liberdade que está relacionado ao conjunto de medições realizadas é dado pela equação 5.

$$v_i = n - 1 \quad (\text{eq. 5})$$

onde:

v_i = número de graus de liberdade;

n = número de medidas do conjunto.

Combinando-se o número de medições realizadas com as incertezas individuais de cada variável, tem-se o número de graus de liberdade efetivos é calculado através da equação de *Welch-Satterthwaite*, apresentada na equação 6:

$$v_{eff} = \frac{[u_c(y)]^4}{\sum_{i=1}^n \frac{[u_i(y)]^4}{v_i}} \quad (\text{eq. 6})$$

onde:

$u_c(y)$ = incerteza padrão combinada do método;

$u_i(y)$ = incerteza padrão da componente i ;

v_i = número de graus de liberdade da componente i .

Neste processo, quanto maior o número de medições, maior os graus de liberdade efetivos e menor a incerteza expandida. Porém, na prática, esta observação é geralmente ignorada já que realizar um número de medições maior que o mínimo necessário gera maior custo e despende de mais tempo, o que geralmente é inviável para os laboratórios.

O valor obtido no cálculo do número de graus de liberdade efetivos representa o intervalo de confiança do processo, o qual é utilizado para a escolha do fator k por meio de consulta a tabela t de *Student*. O fator de abrangência k é multiplicado pelo valor da incerteza padrão combinada e isso faz com que o resultado da incerteza expandida represente um intervalo maior da distribuição dos valores que estão sendo atribuídos ao mensurando.

O cálculo da incerteza expandida é realizado por meio da equação 7.

$$U = u_c \cdot k \quad (\text{eq. 7})$$

4.1.5 Relatando a Incerteza de Medição

O resultado da estimativa da incerteza de medição deve ser relatado de forma que não gere interpretações equivocadas. O Guia EURACHEM recomenda que se reporte o resultado de maneira padronizada a fim de se obter a universalidade da informação metrológica.

Desse modo, um relatório completo de um procedimento de medição deve conter ou referir-se a documentos que contenham a descrição dos métodos usados para calcular o resultado da medição e sua incerteza, valores e fontes de todas as correções usadas no cálculo e na estimativa da incerteza, todos os componentes da estimativa da incerteza e a forma como foram avaliados (Guia EURACHEM/CITAC, 2002).

Para reportar a incerteza padrão combinada, o mesmo Guia recomenda 4 formas de apresentação. A mais usual não utiliza o símbolo “ $\pm$ ”, pois esse sinal está relacionado a altos níveis de confiança, ou seja, a incerteza expandida, podendo ser

confundido os dois conceitos. Portanto, o resultado da incerteza padrão pode ser reportado na seguinte forma:

“Resultado: x (valor)”

onde:

x = valor do mensurando;

(valor) = incerteza padrão combinada.

O valor do mensurando, y , é declarado acompanhado da respectiva incerteza expandida, U , deve ser reportado de acordo com o esquema a seguir:

“Resultado: $(y \pm U)$ ”

A incerteza expandida é obtida pela multiplicação da incerteza combinada pelo fator de abrangência k . O valor de k é obtido normalmente com um intervalo de confiança de aproximadamente 95% (tabela t) para os graus de liberdade efetivos, ν_{eff} , calculados para o processo.

4.2 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE ENSAIOS QUÍMICOS

A rotina de um laboratório de metrologia química necessita de um processo de avaliação que estime sua eficiência. A validação de um procedimento analítico avalia a relação entre os resultados experimentais e as questões que o método se propõe a responder.

Por definição, a validação de um método analítico é a comprovação por meio de testes e apresentação de evidências objetivas de que o método desenvolvido é adequado para o uso pretendido (INMETRO, 2003). Esse é um processo que começa na demanda pelo resultado, passa pelo planejamento da estratégia analítica, continua ao longo de sua execução e termina somente após a avaliação dos resultados (Ribani *et al*, 2004).

Existem razões legais, técnicas e comerciais que justificam a implantação da validação de métodos analíticos, apesar de não haver uma norma estabelecida. Atualmente, para demonstrar competência técnica, os laboratórios que executam análises devem submeter-se a um credenciamento ou acreditação junto a um órgão específico de âmbito

nacional ou internacional. No Brasil, há duas agências para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA e o INMETRO (Ribani *et al*, 2004).

A ANVISA regulamenta por meio da resolução nº 899 de 2003 o processo de validação de métodos bioanalíticos, voltados exclusivamente para análises farmacêuticas e bioequivalências. Já o INMETRO fornece orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos por meio do documento “Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos - DOQ-CGCRE-008 de 2010”; e é seguindo as orientações desse documento que a validação do método desenvolvido no presente trabalho foi realizada.

Segundo o INMETRO (2010), os parâmetros que podem ser avaliados no processo de validação são seletividade/especificidade, faixa de trabalho e faixa linear de trabalho, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão, recuperação e robustez.

4.2.1 Seletividade/Especificidade

Os termos especificidade e seletividade são frequentemente utilizados indistintamente ou com diferentes interpretações (INMETRO, 2003). Porém, a atualização do documento DOQ-CGCRE-008 de 2010 não traz mais o termo especificidade como um parâmetro para a realização da validação de um procedimento analítico.

Um método analítico que produz resposta para um único composto químico, elemento, íon, complexo ou qualquer espécie química é chamado de específico; enquanto que um método que produza respostas para vários compostos químicos, com característica(s) em comum (formando um grupo ou classe), porém, que tenha a capacidade de distinguir e/ou discriminar a resposta de um composto da resposta de outros é chamado de seletivo (INMETRO, 2010).

A *International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC e outras organizações científicas afirmam que a especificidade é o termo correto para se usar quando um método está livre de impurezas e esse, tem a capacidade de determinar apenas o analito de interesse. Porém, como em alguns casos a presença de interferentes influencia na análise, não sendo possível eliminar os interferentes ou limitar essa influência, o uso do termo especificidade fica limitado a algumas situações (Persson, 1998), o que leva muitos autores a afirmarem que a utilização do termo especificidade é errônea.

Ambos os conceitos diferem também na forma como são avaliados. Ainda que não seja usual, a seletividade pode ser expressa por meio da determinação da porcentagem de interferência, utilizada para estimar a interferência de analitos e desse modo, a seletividade passa a possuir uma escala de classificação (o método pode ser muito, parcialmente ou pouco seletivo) enquanto que a especificidade é uma condição do método; ou seja, ou o método é específico ou não (Persson, 1998).

Assim, em cromatografia gasosa, determina-se a especificidade de um método observando as respostas obtidas de injeções realizadas com o analito de interesse e averiguando-se o efeito da matriz na determinação desses analitos. Para determinar se um método é seletivo, além de observar as respostas obtidas pela injeção dos compostos de interesse, como na determinação da especificidade, pode-se também avaliar a porcentagem de interferência dos analitos por meio de cálculos realizados com respostas obtidas pela utilização de detectores modernos (como espectrômetro de massas com arranjo de diodos).

Avaliar o parâmetro seletividade é o primeiro passo para o desenvolvimento e validação de um método analítico. O grau de seletividade está diretamente relacionado com as interações do analito e outros compostos injetados, com a fase estacionária e com as propriedades da matriz. Ou seja, não basta apenas o método ser seletivo, há a necessidade também da técnica utilizada fornecer a qualidade necessária para que a seletividade seja evidenciada.

O método tido como seletivo produzirá respostas sem influência das impurezas e livre de produtos de degradação que afetem a detecção do analito de interesse. Por isso, se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão não produzirão respostas satisfatórias, comprometendo a validação do método.

4.2.2 Faixa de trabalho e faixa linear de trabalho

Em métodos analíticos não absolutos é utilizada uma faixa de concentração especificada dentro da qual o método é capaz de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito em amostras, denominada faixa de trabalho.

Essa faixa é estabelecida de acordo com as características do equipamento utilizado e a capacidade do método em gerar respostas para o analito de interesse, e assim, são estabelecidos os limites da faixa. Esses limites podem sofrer interferência tanto na parte inferior (concentrações menores) quanto na parte superior (concentrações maiores).

Alguns parâmetros de validação auxiliam na detecção dos fatores limitantes, como o limite de detecção, o limite de quantificação e a baixa sensibilidade (para limites inferiores) assim como algumas características do equipamento limitam a parte superior da faixa, como a saturação do detector; além disso, há a possibilidade de eventuais reações e interações químicas interferirem e/ou alterarem o meio, o que tornará o estabelecimento dos valores da faixa equivocado.

Ao estabelecer a faixa de trabalho, existe uma faixa de resposta linear (faixa linear de trabalho) específica para a concentração do analito de interesse, que representa o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração, estabelecidos após a averiguação de todos os fatores limitantes, no qual foi demonstrado ser possível a determinação com a precisão e exatidão exigidas, sob as condições especificadas para o ensaio (INMETRO, 2003).

4.2.3 Linearidade

Em um sistema de análise quantitativa, ao analisar uma amostra, o processo consiste na determinação dos dados de entrada, x (obtido em grande parte das vezes pela leitura de amostras por equipamentos, como por exemplo, no presente trabalho no qual a leitura de amostras é realizada pelo GC/MS) e a conversão do resultado obtido das leituras das amostras para a resposta esperada da análise, y .

Nesse contexto, espera-se que a relação entre a entrada, x , e a saída, y , seja linear e o valor da resposta obtida seja diretamente proporcional ao valor de entrada, como por exemplo, em termos de concentração, pois se espera que o método produza resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras (INMETRO, 2011). Essa relação de conversão dos dados e a proporcionalidade da resposta obtida de um processo de análise química quantitativa são avaliadas por meio da linearidade de um método analítico.

A linearidade de um método analítico é estabelecida fixando-se a faixa linear de trabalho ideal para determinada substância de acordo com o interesse do analista e elaborando-se a respectiva curva analítica, a qual fornecerá subsídios para que a relação “sinal analítico/concentração do analito na amostra” seja representada matematicamente.

A curva analítica é elaborada baseada na faixa linear de trabalho. Supondo que a faixa linear de trabalho estabelecida para determinada substância possua o intervalo de

0,05 mg L⁻¹ a 0,5 mg L⁻¹, os níveis de concentração irão variar dentro dessa faixa. Segundo o INMETRO (2011), deve haver no mínimo cinco níveis de concentração para a elaboração de uma curva analítica e o número de replicatas deve ser o mais próximo possível daquele empregado na rotina do laboratório.

Ao realizar o ensaio para a determinação da curva analítica, a distribuição dos níveis de concentração estabelecidos gera um conjunto de dados que é avaliado por meio da regressão linear. A regressão linear é um método de se estabelecer, por meio de uma equação matemática linear (uma reta), a relação entre duas variáveis, nesse caso, as variáveis x (variável independente, sinal do equipamento) e y (variável dependente, concentração do analito na amostra).

Essa equação matemática linear que descreve a relação entre as variáveis (x e y) é chamada de equação da reta e é apresentada na equação 8.

$$y = ax + b \quad (\text{eq. 8})$$

onde:

y = resposta do equipamento de medição;

x = concentração do analito;

a = inclinação da curva analítica (coeficiente angular);

b = interseção da curva no eixo y (coeficiente linear).

A análise do coeficiente angular, a , revela a sensibilidade da resposta do sistema de medição frente às variações do analito. Como mencionado anteriormente, dependendo da faixa de trabalho escolhida, a sensibilidade pode ser diferente entre concentrações baixas e altas. É necessário, dessa forma, cautela quando se deseja realizar uma extrapolação. Mudando a faixa de concentração, o comportamento pode ser diferente.

O coeficiente linear, b , representa o valor de y na interseção da reta com o eixo y . Os desvios que ocorrem nos pontos de medição influenciam diretamente em b .

Porém, o nível de relação entre as variáveis é estabelecido por meio do coeficiente de correlação, r . O valor do coeficiente r é calculado por meio da avaliação do comportamento de cada ponto subtraindo-se o valor destes pela média dos pontos, que

nesse caso, representa o comportamento do conjunto. Dessa forma, r mede o grau da relação entre as variáveis e o sentido em que ela ocorre. Quando r é igual a +1 ou -1, diz-se que a correlação é perfeita; tendo o sinal como um indicativo do sentido da correlação que se positiva, indica que y aumenta quando x aumenta; e se negativa, y decresce quando x aumenta.

Elevando-se r ao quadrado, obtém-se o coeficiente de determinação, r^2 , que indica a variação de y em relação à x passível de ser explicada. Por exemplo, se $r = 0,999$; $r^2 = 0,998$; dessa forma, 99,8% da variação de y em relação a x pode ser explicada por esse método.

Apesar de ser comum a utilização do valor do r^2 como uma forma de verificação da linearidade, alguns autores afirmam que esta não é a forma ideal de avaliá-la. Segundo Araujo (2009), o valor de r pode ser interpretado apenas em termos de graus de desvio da linearidade e a forma correta de avaliar a linearidade é pela utilização do teste F . Nesse teste, são calculadas as variâncias e os desvios padrão de cada nível de concentração da curva analítica de acordo com o número de replicatas levando em consideração o número de graus de liberdade. O valor obtido, denominado $F_{\text{calculado}}$, é comparado com o valor de F_{tabelado} ; e se $F_{\text{calculado}}$ for menor que F_{tabelado} , o método é considerado como linear.

4.2.4 Limite de detecção

O limite de detecção, também chamado de limite inferior de detecção, representa a menor concentração do analito que pode ser detectada pelo método com um nível de confiabilidade aceitável (para análises químicas 99,5%), mas que não necessariamente será quantificada.

Esse limite pode ser estabelecido por inspeção visual, analisando-se cromatogramas obtidos pela injeção de soluções de concentrações conhecidas diluídas até um nível de concentração no qual os analitos não são detectados visualmente, e dessa forma, é estabelecido o limite. Porém, o estabelecimento do limite de detecção por esse método só é possível em análises sem interferentes na matriz, com ruído baixíssimo e livre de interferentes.

Outro método para estimar o limite de detecção é por meio do cálculo da relação “sinal/ ruído”, método mais comum de estimativa do limite de detecção sendo inclusive citado pelo INMETRO (2011).

O sinal em relação ao ruído é determinado pela comparação dos sinais analíticos observados em baixas concentrações com os sinais obtidos na análise da amostra em branco até uma concentração que produza um sinal equivalente a duas ou três vezes o desvio padrão da análise (desvio padrão obtido pela análise em replicata da amostra em branco). Adequando o método ao nível de confiança desejado, a equação 9 apresenta o cálculo do limite de detecção por esse método.

$$LDM = \bar{X} + t_{(n-1, n-\alpha)} \cdot (s) \quad (\text{eq. 9})$$

onde:

LDM = Limite de detecção do método;

$\bar{X}$ = média dos valores da amostra em branco;

$t_{(n-1, n-\alpha)}$ = valor t – de *Student* para $(1-\alpha)$ x nível de confiança e $(n-1)$ graus de liberdade;

α = nível de confiança (normalmente 95%);

s = desvio padrão das análises em replicata.

Um método menos usual descrito por Sabin (2007), também utilizado para a estimativa do limite de detecção relaciona o coeficiente angular da curva analítica, a , com o desvio padrão da amostra em branco. O mínimo sinal detectável (y_{ID}) por um equipamento é estimado de acordo com a equação 10.

$$y_{ID} = y_{branco} + 3s \quad (\text{eq. 10})$$

onde:

y_{ID} = mínimo sinal detectável (limite de detecção);

y_{branco} = valor médio do sinal de n amostras em branco;

s = desvio padrão de n medidas da amostra em branco.

O sinal corrigido de uma análise é apresentado na equação 11.

$$y_{amostra} - y_{branco} = a * \text{concentração na amostra} \quad (\text{eq. 11})$$

onde:

y_{amostra} = sinal observado para a amostra;

y_{branco} = valor médio do sinal de n amostras em branco;

a = coeficiente angular da curva analítica.

Substituindo-se y_{ID} por y_{amostra} , já que o teste do branco visa determinar a mínima concentração detectável, tem-se a equação 12, para a determinação do limite de detecção.

$$\text{Concentração mínima detectável (LD)} = \frac{3s}{a} \quad (\text{eq. 12})$$

4.2.5 Limite de quantificação

Limite de quantificação representa a menor concentração do analito que pode ser quantificada pelo método com um nível de confiabilidade aceitável. Diferentemente do limite de quantificação, o limite de detecção não pode ser estimado visualmente já que a sensibilidade do equipamento influencia na determinação.

Uma das formas mais diretas de se estabelecer o limite de quantificação é tomá-lo como o ponto mais baixo da curva analítica. Nesse contexto, a quantificação de valores abaixo desse ponto não possui confiabilidade analítica e, portanto, não faz sentido estabelecer um valor de limite de quantificação abaixo do primeiro ponto.

Entretanto, o INMETRO (2003) indica duas maneiras de realizar a estimativa do limite de quantificação. O primeiro método consiste na injeção de sete ou mais brancos da amostra (matriz sem a presença das substâncias de interesse) e a realização de um cálculo de acordo com a equação 10.

$$LQ = \bar{X} + 10s \quad (\text{eq. 13})$$

onde:

LQ = Limite de quantificação;

$\bar{X}$ = média dos valores do branco obtida pela injeção de sete ou mais amostras;

s = desvio padrão do branco.

Já o segundo método consiste na medição de sete replicatas a cada nível de concentração estipulado em torno do valor do limite de detecção calculando-se o desvio padrão do valor do analito, para cada concentração. Os desvios padrão obtidos são utilizados para elaborar um gráfico desvio padrão “s” pela concentração do analito e o valor do limite de detecção é atribuído por inspeção escolhendo-se o ponto com menor concentração do analito para o menor valor de desvio padrão aceitável.

Para afirmar que determinado desvio padrão é aceitável para a análise, é utilizado como parâmetro a relação de Horwitz. A relação de Horwitz é um parâmetro de desempenho simples que demonstra a aceitabilidade de um método analítico em relação a sua precisão (Horwitz, 2006).

Esta é representada por um diagrama, também conhecido como corneta de Horwitz, que foi obtido experimentalmente e apresenta a faixa de aceitabilidade do desvio padrão em relação a concentração do analito. Este diagrama é apresentado na FIG. 5.

Figura 5: Diagrama (Corneta) de Horwitz (Fonte: Horwitz, 2006)

4.2.6 Exatidão

A exatidão de um método está relacionada com a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro. Esta é avaliada pela utilização

de materiais de referência, participações em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação (INMETRO, 2003). A avaliação da exatidão de um procedimento analítico traz como benefício a possibilidade de estimar o grau em que os erros sistemáticos afetam o método.

Como estratégia de avaliação da exatidão no processo de validação de um método é imprescindível que o analito seja medido em um material de referência e comparado com o valor certificado. É necessário que seja realizada a determinação da porcentagem de recuperação do analito na amostra, comparados os resultados do método em processo validação com os de um método de referência e determinada a concentração na amostra por meio da técnica de adição de padrão (Araujo, 2009).

Outra estratégia utilizada para avaliar a exatidão de um método é promover a participação em ensaios de proficiência com a intenção de comparar os resultados de um método em processo de validação com resultados obtidos em laboratórios com método já validados. Nesses ensaios, o desempenho e a competência dos laboratórios são monitorados assegurando que os resultados obtidos nas análises são coerentes.

4.2.6.1 Recuperação

O ensaio de recuperação, método mais usual, representa a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na amostra, que é extraída e passível de ser quantificada. Na prática o estudo de recuperação é realizado por meio de *spike* (fortificação), isto é, adicionando-se concentrações conhecidas do analito na amostra (Ribani *et al*, 2004; Souza, 2011).

As amostras podem ser adicionadas com o analito em três níveis de concentração (próximo ao limite de detecção, próximo à concentração máxima permissível e próxima à média da faixa de uso do método). Entretanto, a limitação na utilização desse procedimento pode ocasionar avaliações excessivamente positivas já que os analitos adicionados estão em uma forma mais facilmente detectáveis (INMETRO, 2003).

O cálculo da recuperação é realizado utilizando-se a equação 14.

$$R(\%) = \left(\frac{c_1 - c_2}{c_3} \right) \times 100 \quad (\text{eq. 14})$$

onde:

C_1 = concentração determinada na amostra com adição do padrão;

C_2 = concentração determinada na amostra sem adição do padrão;

C_3 = concentração do padrão adicionado.

As medições de recuperação são expressas em termos de porcentagem, tendo como intervalo aceitável para a análise de resíduos, recuperação de 70 a 120% com precisão de $\pm 20\%$. Dependendo da complexidade analítica e da amostra, esse valor pode ser de 50 a 120% com precisão de até $\pm 15\%$ (Ribani *et al*, 2004).

4.2.7 Precisão

A precisão é um parâmetro que avalia o grau de concordância entre os valores obtidos pela análise de um determinado número de replicatas em condições especificadas. A avaliação desse parâmetro é um modo de expressar numericamente a dispersão de um conjunto de dados obtidos em análise ou o erro aleatório por meio de medições do desvio padrão, da variância ou do coeficiente de variação (Araujo, 2009). Esse parâmetro garante que a resposta do equipamento esteja sempre em concordância com o valor que se está medindo.

Usualmente, a precisão é expressa em forma de desvio padrão e é avaliada de acordo com a equação 15.

$$DPR(\%) \text{ ou } CV(\%) = \left(\frac{s}{\bar{x}} \right) \times 100 \quad (\text{eq. 15})$$

onde:

$DPR(\%)$ ou $CV(\%)$ = desvio padrão relativo ou coeficiente de variação;

s = desvio padrão das medições;

$\bar{x}$ = média aritmética das medições.

Esse termo é normalmente confundido com os termos repetitividade, reprodutibilidade e precisão intermediária. O termo repetitividade refere-se à estimativa de um desvio que provém de determinada propriedade da amostra ao analisá-la mais de uma vez sem alterar os fatores globais (analista, preparo, equipamento, local) em um curto espaço de tempo. O termo reprodutibilidade refere-se também à estimativa de um desvio que provém de determinada propriedade da amostra, porém, alterando-se os fatores globais

(um ou mais) e o tempo de avaliação (curto ou longo). A precisão intermediária se refere à mesma propriedade que os outros termos, porém, esta avaliação ocorre em um longo espaço de tempo (Araujo, 2009).

De certa forma, todos esses parâmetros visam elucidar quais fatores contribuem significativamente para a variação dos resultados. O ensaio de repetitividade garante que a variação dos resultados se mantém constante em condições idênticas e que os fatores (analista, procedimento, condições instrumentais, laboratórios, tempo) têm contribuição insignificante. O ensaio de reprodutibilidade garante que a variabilidade do resultado permanece constante em condições diferentes e que a variação de um ou mais fatores não contribuem significativamente. Vale ressaltar que em ambos os casos o cálculo para avaliação de tais parâmetros é realizado pela equação 15, variando-se apenas as condições do ensaio.

4.2.8 Robustez

A robustez é um parâmetro que avalia a constância dos resultados frente a pequenas variações que o procedimento analítico pode sofrer, como influência do meio na análise (temperatura, umidade), variações do equipamento difíceis de serem percebidas durante a corrida (sinal analítico, fluxo do gás, volume de injeção) ou influência da matriz.

Por meio de um planejamento experimental o ensaio de robustez avalia as influências de pequenas, mas deliberadas e controladas alterações, nos parâmetros do método a fim de detectar fatores não robustos, ou seja, com grande influência sobre a resposta (Dejaegher *et al*, 2008).

O teste de Youden é muito utilizado para determinar a robustez de métodos analíticos. Este é um teste mais amplo que permite não só avaliar a robustez do método, mas também apontar a influência de cada parâmetro analítico nos resultados finais.

A ideia do teste não é estudar a alteração dos parâmetros um de cada vez, mas introduzir diversas alterações de uma vez só de tal maneira que os efeitos das variações individuais possam ser identificados (INMETRO, 2003; Dejaegher *et al*, 2008).

Sendo assim, no teste de Youden, sete parâmetros analíticos são selecionados para serem avaliados e são realizados oito ensaios com planejamento fatorial combinado para determinar a influência desses parâmetros no resultado final. As análises são

realizadas com o valor nominal de cada parâmetro e com uma pequena variação (Cesar, 2009).

A combinação entre os ensaios realizados e a variação dos parâmetros selecionados é demonstrada na FIG. 6.

Valor do Fator	Combinação Ensaída							
	1	2	3	4	5	6	7	8
a ou A	A(+)	A(+)	A(+)	A(+)	a(-)	a(-)	a(-)	a(-)
b ou B	B(+)	B(+)	b(-)	b(-)	B(+)	B(+)	b(-)	b(-)
c ou C	C(+)	c(-)	C(+)	c(-)	C(+)	c(-)	C(+)	c(-)
d ou D	D(+)	D(+)	d(-)	d(-)	d(-)	d(-)	D(+)	D(+)
e ou E	E(+)	e(-)	E(+)	e(-)	e(-)	E(+)	e(-)	E(+)
f ou F	F(+)	f(-)	f(-)	F(+)	F(+)	f(-)	f(-)	F(+)
g ou G	G(+)	g(-)	g(-)	G(+)	g(-)	G(+)	G(+)	g(-)

Figura 6: Variação dos parâmetros no ensaio de robustez.

Os efeitos podem ser estimados de acordo com a equação 16.

$$E_x = \frac{\sum Y(+1) - \sum Y(-1)}{\frac{N}{2}} \quad (\text{eq. 16})$$

onde:

$\sum Y(+1)$ = soma das respostas dos parâmetros com valor nominal;

$\sum Y(-1)$ = soma das respostas das variações dos parâmetros;

N = número de ensaios.

4.3 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos geram preocupações devido à presença no ambiente, pois mesmo em pequenas concentrações determinam um valor de toxicidade considerável e por serem, atualmente, produtos de muitas atividades antrópicas, tendo assim maior possibilidade de serem descartados no meio ambiente.

Entre os compostos fenólicos, os fenóis substituídos como clorofenóis, nitrofenóis e alquilfenóis, são altamente tóxicos para o Homem e organismos aquáticos (Kubota *et al.*, 2001). Deste modo, a necessidade de monitorar continuamente o teor desses contaminantes nos cursos das águas naturais e em efluentes industriais descarregados no sistema hídrico se mostra muito importante.

No presente trabalho, os compostos estudados foram o 2,4,6-triclorofenol; 2,4-diclorofenol; 3-metilfenol; 4-cloro-3-metilfenol; 4-nitrofenol; pentaclorofenol e o fenol, sendo o último precursor de todos os outros citados. Os compostos selecionados para o presente estudo representam o grupo de contaminantes mais utilizados na indústria e, conseqüentemente, os fenóis mais encontrados nos efluentes industriais.

4.3.1 Fenol

O fenol foi um dos primeiros compostos inscrito na lista de poluentes prioritários pela *USEPA*. Livre de impurezas, o fenol é um sólido branco, incolor, com odor característico, solúvel em água e em solventes orgânicos (Michalowicz, 2007), e tem sua estrutura molecular apresentada na FIG. 7.

Figura 7: Estrutura do fenol.

Por ser precursor de muitos outros compostos, o fenol possui um vasto campo de aplicação, e é utilizado na indústria química em processos de produção de compostos químicos (alquilfenóis, cresóis, xilenóis, resinas fenólicas, anilina e outros derivados), desinfetantes, loções anticépticas, explosivos, agrotóxicos e corantes. Além disso, ocorre através da combustão do carvão de madeira, combustão de resíduos sólidos urbanos e como produto da exaustão dos combustíveis em automóveis (Michalowicz, 2007).

Estudos demonstram que o ser humano pode sobreviver à ingestão de até 30 gramas de fenol, porém, segundo a *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ASTDR, 2008), a dose letal para a ingestão de fenóis é de 70 mg kg⁻¹. Entretanto, o contato com a pele, até mesmo em pequenas concentrações, pode levar a morte já que este composto é absorvido rapidamente. A inalação dos vapores de fenol, quando aguda, causa

dor de cabeça, nos músculos e fraqueza, além de provocar acúmulo deste nos rins, fígado, músculos e cérebro (Michalowicz, 2007).

4.3.2 Clorofenóis

Os clorofenóis (compostos fenólicos clorados) representam o maior e mais difundido grupo de fenóis. Estes se destacam por possuírem alta toxicidade e serem largamente empregados na indústria como conservantes de madeira e solventes (DHHS, 1999). A fórmula estrutural geral dos clorofenóis é apresentada na FIG. 8.

Figura 8: Fórmula estrutural geral dos clorofenóis. (n - nº de átomos de cloro).

Por penetrarem facilmente pela pele e membranas celulares, os clorofenóis apresentam um amplo espectro de genotoxicidade, mutagenicidade e efeitos hepatóxicos. Além disso, estes são produtos de degradação de pesticidas organofosforados e fenoxiácidos clorados, cuja presença no ambiente afeta gosto e odor de águas potáveis e peixes já que pequenas concentrações são suficientes para uma possível contaminação (Kubota, 2001).

4.3.2.1 Pentaclorofenol

Um dos derivados mais conhecidos do fenol, o pentaclorofenol é uma substância tóxica persistente que foi muito utilizado como conservante de madeira e biocida. Porém, devido a sua alta toxicidade e por gerar impurezas em sua formulação, que podem apresentar toxicidade mais elevada que a própria substância, seu uso entrou em declínio chegando a ser banido em diversos países (Souza, 2011).

Na temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C), o pentaclorofenol apresenta-se como um sólido cristalino de coloração cinza, praticamente insolúvel em água e solúvel na maioria dos solventes orgânicos. Sua estrutura pode ser observada na FIG. 9.

Figura 9: Estrutura do pentaclorofenol.

Este organoclorado é facilmente absorvido por qualquer via, porém, as intoxicações em seres humanos ocorrem devido à exposição ocupacional ao vapor do composto, fato este que ocorre principalmente em sua produção. A absorção do composto presente no ar (vias aéreas) ou o consumo de água representa uma pequena parcela de contaminação (DHHS, 2008b).

A intoxicação por elevadas concentrações pode provocar alterações no metabolismo que pode levar a morte, enquanto que a intoxicação por baixas concentrações provoca náuseas, vômitos e cefaléia (DHHS, 2008b).

4.3.2.2 2,4-diclorofenol

Assim como o pentaclorofenol, o 2,4-diclorofenol (2-DCP) é um composto tóxico obtido pela cloração do fenol em presença de catalisadores. Utilizado principalmente como catalisador na produção de herbicidas, este é um sólido cristalino (Dow AgroSciences, 2000) e tem sua estrutura é apresentada na FIG. 10.

Figura 10: Estrutura do 2,4-diclorofenol.

Além de ocorrer no ambiente devido à atividade antrópica, este também pode ser originado por degradação microbiana ou fotodegradação de pesticidas derivados de fenóis (como o p-nitrofenil éter) ou por cloração da água de abastecimento (DHHS, 1989).

Por possuir baixa solubilidade em água, a presença deste composto nas águas de abastecimento em áreas urbanas é baixa (em torno de $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$). Sendo assim, a exposição humana a esse composto se dá basicamente por atividades ocupacionais ou

contato com pesticidas, tendo como principal via de contaminação o contato com a pele (DHHS, 1989).

Ao entrar em contato com a pele, a ação do 2,4-DCP é semelhante a dos clorofenóis em geral; a qual provoca deterioração do tecido e pode levar a morte (dependendo da concentração do composto e do tempo de exposição) (DHHS, 1989).

4.3.2.3 2,4,6-triclorofenol

O 2,4,6-triclorofenol (2,4,6-TCP) é considerado um composto com alto potencial carcinogênico pela USEPA. Utilizado principalmente como matéria prima de muitos pesticidas, conservante de madeira e fungicida de produtos têxteis, o 2,4,6-TCP é, a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C), um sólido cristalino amarelado, praticamente insolúvel em água (DHHS, 2001) e tem sua estrutura apresentada na FIG. 11.

Figura 11: Estrutura do 2,4,6-triclorofenol.

Em seres humanos, assim como os outros clorofenóis, a exposição do 2,4,6-TCP se dá principalmente devido à atividades ocupacionais, porém, pode ocorrer por inalação, ingestão e contato dérmico (DHHS, 2001).

4.3.2.4 4-cloro-3-metilfenol

O 4-cloro-3-metilfenol (p-cloro-m-cresol) foi registrado a primeira vez em 1968 como um biocida, porém seu uso industrial foi difundido devido a sua propriedade de agir como conservante de produtos orgânicos. Utilizado como conservante em colas, na produção de tintas e adesivos industriais, este teve sua aplicação estendida à indústria farmacêutica com o propósito de evitar a degradação por micro-organismos de compostos orgânicos presentes em cremes para o corpo (DHHS, 2008a).

O 4-cloro-3-metilfenol apresenta-se a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C) como um sólido branco solúvel água (DHHS, 2008a) e tem sua estrutura molecular apresentada na FIG. 12.

Figura 12: Estrutura do 4-cloro-3-metilfenol.

Estudos demonstraram que o contato com a pele e olhos pode causar sérios danos à saúde. A possibilidade de ocorrer exposição por inalação é praticamente nula já que este composto possui partículas que são dificilmente vaporizadas a temperatura ambiente (nesse caso, entre 20°C e 30 °C). A maior exposição ao composto relatada é através da contaminação por ingestão. Apesar de não haver uma aplicação direta do composto em relação à produção de alimentos, a contaminação ocorre de maneira indireta já que o 4-cloro-3-metilfenol é utilizado em adesivos e embalagens de alimentos, podendo contaminar os mesmos (DHHS, 2008a).

Porém, apesar de todo o perfil toxicológico, não há registros de contaminação de seres humanos pelo 4-cloro-3-metilfenol, e desse modo, pode-se dizer que a maior exposição de seres humanos a esse composto é através de atividades ocupacionais (DHHS, 2008a).

4.3.3 Nitrofenóis

Os nitrofenóis, assim como os clorofenóis, representam um dos grupos mais difundidos de compostos derivados do fenol. Esses compostos são largamente empregados em produções industriais tendo a fórmula estrutural geral apresentada na FIG. 13.

Figura 13: Estrutura geral dos nitrofenóis (n - nº de grupos nitro).

Estes compostos estão presentes no ambiente devido principalmente a utilização dos mesmos em processos industriais, pois a quantidade gerada por processos naturais representa uma parcela pequena. Naturalmente, os nitrofenóis são gerados pela reação de fenóis com nitritos presentes em água através da influência da radiação UV proveniente da luz do sol (Michalowicz, 2007).

Dos compostos pertencentes a esse grupo, o mais conhecido é o 4-nitrofenol, descrito no item 4.3.3.1.

4.3.3.1 4-nitrofenol

O 4-nitrofenol (p-nitrofenol) apresenta-se a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C) como um sólido incolor ou levemente amarelado, de baixa solubilidade em água e não volátil (ATSDR, 1992). Este é utilizado na fabricação de medicamentos, fungicidas, corantes e explosivos e tem sua estrutura apresentada na FIG. 14.

Figura 14: Estrutura do 4-nitrofenol.

Apesar de haver poucos registros sobre a ação desse composto em seres humanos, o modo como este composto afeta a saúde depende do nível e tempo de exposição. A principal fonte de informação são testes realizados em animais, os quais demonstraram que o 4-nitrofenol possui toxicidade moderada. Apesar não possuir toxicidade aguda em seres humanos, deve-se sempre levar em conta à exposição ocupacional, que na maioria das vezes causa danos à saúde, já que o contato é de maneira direta e normalmente em altas concentrações (ATSDR, 1992).

4.3.4 Metilfenóis

Os metilfenóis (cresóis) são compostos amplamente utilizados na produção de polímeros, sendo esta, a fonte pela qual estes compostos se apresentam ao meio ambiente (DHHS, 2008a).

Representado principalmente pelos três isômeros mais comuns encontrados no meio ambiente (*orto-cresol*, *meta-cresol*, *para-cresol*) este grupo está amplamente distribuído no meio ambiente oriundos, além da produção industrial como citado acima, da combustão de gasolina pelos automóveis, combustão da madeira, carvão e resíduos urbanos. Entretanto, por serem facilmente degradados na atmosfera, a concentração a qual os seres humanos estão expostos devido a presença destes compostos é baixa (DHHS, 2008a).

Neste trabalho, o metilfenol estudado é o *m-cresol* (3-metilfenol), o qual é apresentado no item 4.3.4.1.

4.3.4.1 3-metilfenol

O 3-metilfenol (*m-cresol*) é, na temperatura ambiente (aproximadamente 23°C), um sólido incolor pouco solúvel em água (DHHS, 2008a). Assim como seus isômeros, este é utilizado em escala industrial na produção de polímeros e tem sua estrutura molecular apresentada na FIG. 15.

Figura 15: Estrutura do 3-metilfenol.

Conhecido popularmente por *creolina*, além de serem utilizados na produção de polímeros, estes são largamente empregados como esmalte eletroisolante para fios de cobre utilizados na construção de motores elétricos e geradores (DHHS, 2008a).

Estudos demonstram que o principal meio de exposição de seres humanos ao *m-cresol* é através da inalação do mesmo, porém, por ser facilmente degradado na atmosfera, não há relatos de contaminação de seres humanos devido à presença desse composto (DHHS, 2008a).

4.4 LEGISLAÇÕES SOBRE COMPOSTOS FENÓLICOS EM ÁGUA

Por serem utilizados vastamente em processos industriais, a presença dos compostos fenólicos em efluentes oriundos desses processos é inevitável. Porém, o tratamento de efluentes e a imposição de limites rigorosos pertinentes à presença de tais substâncias no meio ambiente fazem com que a exposição de seres humanos relacionada à ingestão de água contaminada não ocorra.

Apesar da preocupação em relação à presença de compostos tóxicos em águas ser um consenso mundial, os limites máximos permitidos são estabelecidos por órgãos nacionais, sendo assim, não há homogeneidade entre as legislações. Atualmente, a *USEPA* e a *CE* são os órgãos de referência internacionais no estabelecimento de diretrizes

ambientais. No Brasil, os limites e normas ambientais são orientados ou regulamentados por meio de resoluções emitidas pelo *Conselho Nacional do Meio Ambiente, CONAMA*.

Devido à grande quantidade de compostos derivados do fenol, o estabelecimento de limites individuais torna-se complexo. Em algumas legislações, são estabelecidos limites para a presença de fenóis totais ou para apenas um composto fenólico específico.

A *USEPA* estabelece limite apenas para a presença do pentaclorofenol no meio ambiente, sendo este, $0,001 \text{ mg L}^{-1}$. Entretanto, o *National Institute for Occupational Safety and Health, NIOSH*, que estabelece limites de exposição ocupacional, estabeleceu o limite de exposição de 5 mg L^{-1} para fenol e de $2,3 \text{ mg L}^{-1}$ para isômeros de cresol (Kubota, 2001).

Na Europa, a *EC* por meio da diretiva 98/83/CE, estabelece limites mais específicos, sendo para todos os tipos de fenóis aquosos (fenóis totais) o limite de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ e para fenóis individuais o limite de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ (Kubota, 2001).

No Brasil, por meio da resolução 430 de 2011, o CONAMA estabelece o limite de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ para a presença de fenóis totais em água, sendo considerados fenóis totais todas as substâncias que reagem com 4-aminoantipirina (CONAMA, 2011). Além do CONAMA, o ministério da saúde por meio da portaria 2914/2011 determina o limite para a presença de pentaclorofenol de $9 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Em São Paulo, o decreto estadual 8.468 de 1976 estabelece limites para a presença de substâncias em água que, diferentemente do CONAMA, o limite para a presença de fenóis totais em água de abastecimento é de $0,001 \text{ mg L}^{-1}$. Estes valores são apresentados na TAB. 1.

Tabela 1: Valores máximos permissíveis para a presença de compostos fenólicos.

Compostos	São Paulo	Brasil		E.U.A.		U.E.
		1	2	1	2	
	Decreto Estadual	CONAMA	MS 2.914/11	USEPA	NIOSH	Diretiva 98/83/CE
	$\mu\text{g mL}^{-1}$					
Fenóis Totais	0,001	0,5			5	0,5
Fenóis Individuais						0,1
Pentaclorofenol			0,009	0,001		
Cresóis					2,3	
2,4,6-triclorofenol			0,2			

4.5 METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS

As diretrizes bastante restritivas sobre a presença de compostos fenólicos no meio ambiente têm aumentado a necessidade de monitorar continuamente a presença desses contaminantes em águas naturais. Devido a esse fato, houve um aumento na quantidade de estudos voltados para a determinação desses compostos, o que aumenta a quantidade de dados analíticos disponíveis na literatura auxiliando a elaboração de novos estudos.

Em muitos estudos, técnicas cromatográficas têm sido empregadas para a identificação e determinação de compostos fenólicos em água, tendo como um dos métodos consagrados, inclusive indicado como método oficial pela *USEPA* (método 528), a extração dos compostos por *SPE* e determinação por *GC/MS*.

4.5.1 Extração dos analitos

A extração dos analitos das amostras de água subterrânea é essencial não só para a troca de matriz (pois no *GC/MS* não é possível realizar análise em amostras com matriz aquosa), mas também porque essa técnica fornece a possibilidade de eliminar possíveis interferentes presentes e concentrar os analitos de interesse (Souza, 2011).

A técnica consiste na separação do tipo líquido-sólido na qual um cartucho de extração contendo a fase sólida corresponde à fase estacionária. Os analitos presentes na amostra são aprisionados na fase estacionária por meio da diferença de polaridade e são removidos pela utilização do solvente orgânico escolhido para se trabalhar como matriz. As etapas envolvidas no processo de extração *SPE* são apresentadas na FIG. 16.

Figura 16: Etapas do processo de extração SPE (Fonte: Souza, 2011).

Na etapa 1, denominada condicionamento do cartucho, por meio da aplicação de um solvente orgânico adequado, o material de empacotamento do cartucho SPE é ativado. A escolha do solvente deve ser efetuada em função do material adsorvente e do composto a ser separado. Nesta etapa, é importante não deixar o material de preenchimento secar, pois caminhos preferenciais podem ser formados (Souza, 2011)

Na etapa 2, adição da amostra, um volume pré-definido da amostra é percolado preferencialmente a um fluxo baixo pelo cartucho, para que os analitos de interesse fiquem retidos no material adsorvente (Souza, 2011),

A lavagem (etapa 3), também denominada etapa de *clean up*, tem como objetivo remover possíveis interferentes que tenham sido retidos juntamente com os analitos removidos, por meio da utilização de um solvente que não possua condição suficiente para remover os próprios analitos.

E finalizando o processo, na etapa 4, eluição, os analitos de interesse são extraídos da fase estacionária do cartucho utilizando o solvente ideal para a retarda destes e análise a fim de se obter boa recuperação dos compostos (Souza, 2011).

4.5.2 Análise instrumental

As análises de compostos fenólicos por meio de técnicas cromatográficas são relatadas em muitos estudos por ser uma técnica que fornece segurança e precisão na determinação, ainda mais se acoplada a sistemas de detecção de alta sensibilidade e especificidade (Ribani *et al*, 2004).

Embora a análise desses compostos por meio da cromatografia líquida (HPLC) esteja em evidência nos últimos anos, pela evolução da técnica e a diminuição do tempo de análise, GC/MS é uma técnica amplamente utilizada em avaliação ambiental, sendo inclusive, uma técnica de referência para a determinação de compostos fenólicos em amostras ambientais.

A cromatografia a gás é uma das técnicas mais antigas para a determinação de compostos químicos (começou a ser descrita em 1944). Baseada na separação por diferença de polaridade, um cromatógrafo gasoso é composto por um sistema de controle de fluxo do gás de arraste, um sistema de injeção de amostra, um forno, uma coluna cromatográfica e um sistema de detecção, conforme o esquema apresentado na FIG. 17 (Kuntasal, 2005).

Figura 17: Esquema dos componentes de um cromatógrafo gasoso.

A amostra é inserida no equipamento pelo sistema de injeção de amostra e “arrastada” para a coluna cromatográfica por um gás de “arraste” que não interfira na análise. Esta coluna cromatográfica possui uma fase estacionária a qual retém os compostos de acordo com a polaridade, ou seja, uma coluna cromatográfica dotada fase estacionária polar retém os compostos polares por mais tempo do que uma coluna com fase estacionária apolar. Após separar os analitos de interesse pela passagem destes através da coluna cromatográfica, estes são detectados e o detector envia um sinal relativo a cada analito separadamente para uma base de dados, a qual gera um sinal cromatográfico (um pico) que representa tais analitos. A análise em um cromatógrafo gasoso pode ser ajustada alterando alguns parâmetros, como o fluxo do gás de arraste e a temperatura da coluna dentro do forno, que normalmente, é ajustada para ser alterada de acordo com o tempo de análise (rampa de temperatura) de acordo com a temperatura de ebulição dos compostos analisados. Dessa forma, a técnica cromatográfica apresenta alto poder de resolução podendo separar dezenas de substâncias na mesma análise com baixos limites de quantificação (Souza, 2011).

Para que essa técnica seja eficiente, é necessária a escolha de um detector apropriado, a fim de minimizar a detecção de possíveis impurezas que podem interferir na quantificação, gerando uma incerteza sobre o resultado da análise. Entre os detectores utilizados junto ao cromatógrafo gasoso, o espectrômetro de massas se destaca por fornecer informações qualitativas e quantitativas sobre a amostra com alta eficiência em pouco tempo.

Composto por uma fonte de íons, um filtro de massas e um sistema de aquisição de dados, o espectrômetro de massas ioniza os analitos de interesse e por meio da relação massa/carga (m/z) específica para cada composto, os analitos são detectados; além de ser obtido um gráfico da abundância relativa dos íons gerados. A fonte de íons (responsável pela ionização dos compostos) pode promover a ionização de várias maneiras, tendo como principais a ionização química à pressão atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization, APCI*), fotoionização a pressão atmosférica (*atmospheric pressure photo ionization, APPI*), ionização por electrospray (*electrospray ionization, ESI*), ionização química (*chemical ionization, CI*) e ionização por impacto de elétrons (*electron impact, EI*); esta última, utilizada no presente trabalho.

Por meio de um bombardeamento de elétrons liberados por um filamento aquecido com energia de colisão de 70eV na amostra gasosa, os compostos são ionizados e direcionados ao filtro de massas. Nesse filtro, a relação massa/carga é estabelecida, e assim como a fonte de íons, o filtro de massas pode estabelecer essa relação de diversas maneiras, destacando o analisador por setor magnético, por tempo de voo (*time of flight, TOF*) e o analisador quadrupolar, utilizado no presente trabalho (Souza, 2011).

O filtro de massas quadrupolar é constituído de quatro vareta e assim como o nome diz, possui quatro polos (duas vareta positivas e duas vareta negativas) dispostos de maneira alternada onde passa uma voltagem continua e uma alternada. Ao alternar essa voltagem, é gerado um campo onde é possível selecionar qual razão massa/carga irá atravessar o filtro e atingir o detector, enquanto que os não selecionados serão desviados da trajetória central. O detector utilizado nesse trabalho é o multiplicador de elétron, ME. Ao chocar-se com a parede do detector (que possui o formato cônico), os íons liberam elétrons que são direcionados ao fim do cone devido ao gradiente negativo e a corrente elétrica gerada nesse processo é proporcional ao fluxo de íons que entraram no detector. Assim, os dados são registrados por um *software* e é gerado o espectro de massas relativo à análise (Souza, 2011).

5 ÁREA DE ESTUDO

As atividades realizadas no IPEN, assim como as atividades realizadas em qualquer outra instalação, envolvem a liberação de efluentes para o meio ambiente, seja de forma controlada ou não. No IPEN, grande parte da rotina e das pesquisas é voltada para atividades nucleares. Porém, as atividades podem gerar efluentes de caráter não radioativo.

Dessa forma, o IPEN possui dois programas de monitoramento ambiental, dos quais um é voltado para avaliar a presença de produtos radioativos no ambiente (Programa de Monitoramento Radiológico Ambiental, PMRA) e o outro, tem o intuito de avaliar a presença de produtos químicos não radioativos (Programa de Monitoramento Químico Ambiental, PMQA). Ambos os programas de monitoramento ambiental do IPEN realizam o controle da presença de substâncias químicas não só na saída de efluentes, mas também no lençol freático presente na área do instituto. Dessa forma, foram estabelecidos seis pontos para a amostragem de água subterrânea, os quais são apresentados na FIG. 18.

Figura 18: Localização dos pontos de coleta de água subterrânea no IPEN (Fonte: PQMA, 2012).

Os pontos de monitoramento possuem poços de coleta de água subterrânea os quais têm profundidade variável, porém, as amostras são coletadas a aproximadamente cinco metros da superfície. Essa medida de nível hidro estático é realizada no momento da coleta, assim como a determinação de alguns parâmetros físico químicos das amostras, como temperatura e pH. As coletas são realizadas a cada dois meses, conforme o cronograma estabelecido no PMQA (2012).

6 DESENVOLVIMENTO DO SOFTWARE

Com a evolução da tecnologia a presença de *softwares* e aplicativos tornou-se uma realidade em diversas áreas. Tal realidade se faz presente também no campo da metrologia, onde a qualidade dos dados gerados deve ser comprovada e, para isso, é de fundamental importância que haja uma avaliação criteriosa já que as falhas decorrentes do uso de *softwares* e aplicativos tornam-se mais sensíveis. Isso se dá pelo fato de que esses resultados podem representar a qualidade da atividade desenvolvida e pequenas falhas podem tornar a avaliação equivocada. Entretanto, a utilização de *softwares* em laboratórios metrológicos traz muitos benefícios ao processo de medição como organização, velocidade e precisão (em função da automação e minimização dos erros sistemáticos) na obtenção dos dados.

O desenvolvimento de um programa computacional para a execução de uma atividade específica diminui a possibilidade do erro gerado no processo de avaliação da incerteza de medição, já que a estrutura do programa é elaborada especificamente para o processo ou etapa em questão. Dessa maneira, os valores declarados pelo usuário no programa são dados de um processo ou etapa específica, tornando a utilização mais clara, objetiva e inequívoca e, assim, erros relacionados ao manuseio do programa têm menor probabilidade de ocorrer.

Uma das principais características do programa desenvolvido no presente trabalho é que este pode ser ajustado de acordo com o processo de interesse. Considere nesse caso, análises químicas diversas e ações/processos curtos como avaliações prévias, parciais ou investigativas.

Mesmo o programa tendo a possibilidade de ser ajustado conforme o processo de interesse, a estrutura básica é a mesma para qualquer processo de análise. O que é alterado são quais as grandezas de entrada de cada processo são declaradas pelo usuário. De uma maneira geral, a estrutura básica do programa é dividida entre as telas para a declaração dos dados de entrada, a combinação individual dos dados de entrada e a emissão do resultado da estimativa da incerteza. Essa estrutura é representada na FIG. 19.

Figura 19: Representação da estrutura básica do *software* desenvolvido.

A etapa de identificação das fontes de incerteza é realizada pelo usuário antes do início do tratamento dos dados a estimativa, e, baseado nessa etapa, o *software* é ajustado ao processo de interesse.

Costuma-se representar as fontes de incerteza de um método de análise em laboratórios metrológicos pelo do Diagrama de Causa e Efeito (conhecido também como diagrama de Ishikawa ou espinha de peixe). Tal diagrama possibilita identificar, simplificar e agrupar todas as incertezas do processo, evitando possíveis duplicações (Guia EURACHEM, 2012). Dessa forma, o diagrama auxilia na seleção das grandezas de entrada e configuração do *software* para que esse não apresente erros funcionais.

Além disso, a estrutura de cálculo do *software* é baseada na orientação do Guia EURACHEM (2012) sobre estimativa da incerteza seguindo o método de propagação das variâncias e covariâncias, método esse denominado de método clássico.

Essa estrutura descrita acima é apresentada no *software* por meio de sua interface gráfica desenvolvida utilizando a ferramenta de programação *Visual Basic Express Edition*®.

6.1 A LINGUAGEM DE PROGRAMAÇÃO VISUAL BASIC

A linguagem BASIC (*Beginners All-Purpose Symbolic Instruction Code*) foi elaborada com o intuito de tornar claro o ensino dos conceitos da programação. Porém, com o passar dos anos e com a evolução da tecnologia, a grande utilização do sistema

operacional *Windows*® permitiu aos usuários maior familiarização com os computadores devido à sua interface gráfica utilizada para executar funções que antes eram realizadas por meio de algoritmos.

A utilização dessa interface gráfica foi aplicada também no campo da programação, dando origem a linguagem de programação *Visual Basic*. Sendo assim, essa linguagem de programação nada mais é do que a combinação da linguagem *BASIC* (com inúmeros acréscimos e aprimoramentos) com um método, denominado *Visual*, para criar a interface com o usuário.

O *Visual Basic* revolucionou o processo de desenvolvimento de aplicações para *Windows*® porque no seu ambiente de trabalho o programador “desenha” o *layout* das telas do programa simplesmente arrastando objetos e acrescenta os códigos de maneira integrada.

Em 2005 a *Microsoft*® lançou a nova versão da linguagem *Visual Basic* que passou a ser integrada à plataforma .NET, sendo denominado de *Visual Basic.NET*. Com isso, a ferramenta ganhou recursos para ser integrada a outros programas da *Microsoft*® (*Excel*, *Word*, *Outlook*, serviços para *web* e software para dispositivos móveis).

Devido à facilidade de trabalhar com a linguagem, a disponibilidade de ferramentas gratuitas com fácil acesso e a compatibilidade com a grande maioria de sistemas operacionais o programa apresentado neste trabalho foi desenvolvido na plataforma *Visual Basic.NET* por meio do software *Visual Basic Express Edition 2008*®.

6.2 ESTRUTURA DO SOFTWARE

A estrutura de cálculo do software é baseada na orientação do Guia EURACHEM (2012) sobre estimativa da incerteza seguindo o método proposto pelo mesmo. Atualmente, o Guia EURACHEM (2012) fornece uma orientação detalhada para a estimativa da incerteza em análises químicas quantitativas por meio da avaliação da incerteza originada a partir de cada fonte individual pertinente à análise. Estas incertezas padrão são combinadas (método da propagação das variâncias e covariâncias), resultando em um valor que representa a incerteza de todo o processo de análise, a incerteza combinada.

O procedimento de cálculo executado pelo *software* consiste em avaliar as incertezas padrão associadas às grandezas de entrada e combiná-las para que todos esses valores representem a incerteza global (incerteza combinada) do processo.

Como o *software* foi elaborado para laboratórios de metrologia química, optou-se por não utilizar banco de dados a fim de facilitar a adequação desses em computadores, que em muitos casos, não possuem os programas necessários para o funcionamento correto de determinados *softwares*. Desse modo, os dados gerados durante o processo de avaliação são organizados através de documentos gerados pelo Bloco de Notas do *Windows*®. Os documentos com extensão “.txt” são gerados em ordem numérica crescente, o que permite um número infinito de relatórios, além do tamanho pequeno (1 kB) que não exige computadores com configurações avançadas.

Quando o usuário inicia um novo processo de estimativa da incerteza, o *software* gera um novo documento “.txt” (extensão do Bloco de Notas) no dispositivo de memória *RAM* do computador (usualmente, disco rígido denominado C:\) no qual são gravados todos os processos já realizados (conforme apresentado na FIG. 20). Assim que os dados são gerados (como por exemplo, incerteza padrão, incerteza combinada), esses, são salvos automaticamente no documento e ao fim da análise, são apresentados como relatório de análise.

Figura 20: Documentos “.txt” gerados em ordem numérica crescente.

O programa conta com um total de doze telas, incluindo as telas de ajuda. Essas foram organizadas de uma maneira lógica, seguindo a ordem de um processo de estimativa da incerteza de tal modo que a declaração das grandezas de entrada auxilie o usuário na visualização do processo como um todo. Essa organização é apresentada na FIG. 21.

Figura 21: Organização das telas de declaração das grandezas de entrada.

6.2.1 DECLARAÇÃO DAS GRANDEZAS DE ENTRADA

O processo de estimativa da incerteza realizado pelo *software* é baseado no método de associação das incertezas padrão a fim de se obter um resultado que represente a incerteza total do processo. Desse modo, o usuário declara individualmente os valores pertinentes a cada fator de influência “navegando” entre telas específicas de cada etapa, permitindo uma visualização por etapa e também completa do processo.

Este método de estimativa permite ao usuário obter a incerteza padrão pertinente a uma etapa do processo, selecionando esta opção na tela apresentada na FIG. 22.

Figura 22: Tela de seleção da estimativa a ser realizada (completa ou parcial).

Caso o usuário deseje avaliar a incerteza padrão de cada etapa individualmente e não avaliar um processo inteiro, o *software* permite essa ação ao clicar no botão “Incerteza Padrão”. Nessa seleção, é apresentada uma tela com as fontes de incerteza as quais foram definidas na elaboração do diagrama de Ishikawa. Caso o usuário deseje avaliar a incerteza expandida (incerteza global do processo), esse deverá clicar no botão “Incerteza Expandida”, e assim, “navegará” pelas telas uma a uma sem a possibilidade de retornar à tela inicial até gerar o relatório de análise e finalizar o processo. Vale ressaltar que as telas são as mesmas em ambos os processos, o que diferencia é que ao selecionar a estimativa da incerteza expandida, o *software* combinará as incertezas padrão automaticamente, gerando o resultado da estimativa no fim do processo.

Como o *software* está adaptado ao método de análise desenvolvido neste trabalho, a FIG. 23 apresenta a tela com as fontes de incerteza definidas de acordo com o diagrama de Ishikawa apresentado na FIG. 2.

Figura 23: Tela de seleção das fontes de análise para análise parcial.

6.2.2 SOLUÇÃO PADRÃO E SOLUÇÃO TRABALHO

A incerteza associada à solução padrão tem influência direta na incerteza associada à solução trabalho, já que esta é uma diluição da primeira. A solução trabalho por sua vez é precursora de todas as outras utilizadas, já que essas são diluições da mesma, e assim, a incerteza associada a solução trabalho influenciará no preparo de todas as outras soluções. Como o processo de diluição envolve vidrarias e instrumentos de transferência de volume, as grandezas de entrada são basicamente as incertezas relacionadas à declaração do fornecedor (certificado), obtidas por ensaio de repetição, à dilatação da vidraria utilizada e da incerteza relacionada à pureza do padrão, declarada pelo fornecedor. Em muitos trabalhos, a incerteza associada à massa é declarada nessa etapa, porém, no processo apresentado neste trabalho a incerteza da massa não está presente, já que os padrões utilizados são líquidos. A tela de declaração das grandezas de entrada desta etapa é apresentada na FIG. 24.

Avaliação da Incerteza - Solução Trabalho / Pureza do Padrão

Concentração Solução Estoque (ppm): Pureza (%):

Concentração Solução Trabalho (ppm):

Grandezas de Entrada

Volume Pipetado mL

u (Calibração): mL

u (Vrepe): mL

Volume Final mL

u (Vrepe): mL

u (Calibração): mL

Incerteza - Variação da Temperatura

Temperatura °C ± °C

u (T): °C

Calcular Diluição Calcular

Ajuda Prosseguir

Incerteza Padrão da Solução Estoque

u(P): ppm

Incerteza Padrão da Solução Trabalho

u: ppm

Figura 24: Tela de declaração das grandezas de entrada da incerteza das soluções.

Pode-se observar na FIG. 24 apresentada que o usuário pode declarar as incertezas tipo A e tipo B na mesma tela, evitando o uso de muitas delas para a declaração dos dados de entrada. O reconhecimento do valor declarado como incerteza tipo A pelo *software* é realizado quando, ao declarar o valor, o usuário clica no botão “u(Vrepe)”, e dessa forma, o *software* armazena o valor como tal. Além disso, a opção de ajuda esclarece ao usuário como a estimativa da incerteza relacionada às soluções é realizada. Essa tela é apresentada na FIG. 25.

Avaliação da Incerteza - Soluções - Ajuda

As incertezas provenientes da solução padrão e da solução trabalho interferem diretamente na incerteza associada a curva analítica. A incerteza da solução padrão é emitida pelo fornecedor ou obtida pelo valor da pureza do padrão que é normalizado dividindo-se o valor residual por raiz de 3. Já a incerteza associada a solução trabalho sofre interferência da incerteza dos instrumentos de transferência de volume, da calibração dos instrumentos de medição de volume e da influência da temperatura na dilatação dos instrumentos de medição.

Como a solução trabalho é utilizada no preparo das soluções de referência, a incerteza da solução padrão é associada a concentração no momento do preparo da solução trabalho. A incerteza da solução trabalho é obtida de acordo com a equação abaixo.

$$\mu(C_{\text{sol_trabalho}}) = C_{\text{sol_trabalho}} \sqrt{\left(\frac{u(V_{\text{i_sol_estoque}})}{V_{\text{i_sol_estoque}}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{\text{i_10}})}{V_{\text{i_10}}}\right)^2 + \left(\frac{u(C_{\text{sol_estoque}})}{C_{\text{sol_estoque}}}\right)^2}$$

Voltar

Figura 25: Tela de ajuda sobre incerteza das soluções.

6.2.3 CURVA ANALÍTICA

A incerteza associada à curva analítica compreende várias etapas, que incluem o preparo da curva (pontos da curva) e assim, a incerteza associada aos volumes, soluções e vidrarias utilizadas e a incerteza associada à resposta e resolução do equipamento.

Dessa forma, a fim de não tornar a declaração dos dados de entrada confusa, esta etapa foi dividida em quatro telas. Na primeira tela, apresentada na FIG. 26, o usuário declara os instrumentos de medição e transferência de volume utilizados no preparo da curva analítica e suas respectivas incertezas.

A interface é uma janela de software com o título "Avaliação da Incerteza - Curva Analítica". No topo, há uma barra de navegação com quatro abas: "Instrumentos Utilizados", "Soluções de Calibração", "Áreas" e "Incertezas". A aba "Instrumentos Utilizados" está selecionada.

Dentro da aba, há duas seções principais:

- Pipetas Utilizadas:** Uma tabela com duas colunas de cabeçalho: "Incerteza - Calibração" e "Incerteza - Repetitividade". Há quatro linhas para "Pipeta 1", "Pipeta 2", "Pipeta 3" e "Pipeta 4". Cada linha contém dois campos de entrada de texto, um para cada tipo de incerteza, seguidos pela unidade "mL". Um botão "Cadastrar" está localizado abaixo da tabela.
- Vidraria Utilizada:** Uma seção com campos para "Vidraria" e "Volume" (seguido de "mL"). À direita, há campos para "Incerteza - Calibração" e "Incerteza - Repetitividade". Abaixo, há um campo "Nível de Concentração" com o valor "0" e um botão "Cadastrar".

Figura 26: Tela de declaração das incertezas dos instrumentos utilizados na elaboração da curva analítica.

Em seguida, o usuário declara as grandezas de entrada relacionadas às soluções utilizadas no preparo da curva analítica e as concentrações estabelecidas, conforme a tela apresentada na FIG. 27.

	Níveis de Concentração (ppm)	Volumes Pipetados (mL)	Pipeta Utilizada
1	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
2	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
3	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
4	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
5	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
6	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
7	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

Limpar Cadastrar

Figura 27: Tela de declaração das grandezas de entrada relacionadas às soluções de calibração.

A incerteza associada à resposta do equipamento é avaliada utilizando a área obtida em função da concentração avaliada e comparando-se o valor com a área do branco e as áreas obtidas no ensaio de elaboração da curva analítica. Sendo assim, as grandezas de entrada são os níveis de concentração utilizados, as áreas desses níveis de concentração, a área dos brancos avaliados, o número de replicatas, a área da amostra e a resolução do equipamento. A tela de declaração dessas grandezas é apresentada na FIG. 28.

Áreas dos Níveis de Concentração

Nível de Concentração	Replicata	Área
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

Cadastrar

Área do Branco

Área do Branco	Replicata
<input type="text"/>	<input type="text"/>

Cadastrar

Área da Amostra

Área da Amostra	Replicata
<input type="text"/>	<input type="text"/>

Cadastrar

Resolução do Equipamento

Ajuda Calcular

Figura 28: Tela de declaração das grandezas de entrada da incerteza do equipamento.

Caso o usuário queira visualizar como são realizados os cálculos, basta clicar no botão “Ajuda”, e será apresentada uma tela com os detalhes e fórmulas pertinentes a este cálculo. Essa tela é apresentada na FIG. 29.

Figura 29: Tela de ajuda da incerteza da curva analítica.

Ao final, a tela apresentada ao usuário contém todos os valores de incertezas padrão das componentes avaliadas em cada aba correspondente, assim como a incerteza combinada da curva analítica. Esta tela é apresentada na FIG. 30.

Avaliação da Incerteza - Curva Analítica

Instrumentos Utilizados | Soluções de Calibração | Áreas | Incertezas

Incerteza - Preparo das Soluções Utilizadas

Níveis de Concentração	u (Volumes pipetados)	u (Soluções de calibração)
<input type="text"/> ppm	<input type="text"/> ppm	<input type="text"/> ppm
<input type="text"/> ppm	<input type="text"/> ppm	<input type="text"/> ppm
<input type="text"/> ppm	<input type="text"/> ppm	<input type="text"/> ppm
<input type="text"/> ppm	<input type="text"/> ppm	<input type="text"/> ppm
<input type="text"/> ppm	<input type="text"/> ppm	<input type="text"/> ppm
<input type="text"/> ppm	<input type="text"/> ppm	<input type="text"/> ppm
<input type="text"/> ppm	<input type="text"/> ppm	<input type="text"/> ppm
<input type="text"/> ppm	<input type="text"/> ppm	<input type="text"/> ppm

Incerteza - Curva Analítica

u (Curva) = ppm

Sobre Incerteza

Prosseguir

Figura 30: Tela na qual são apresentadas as incertezas padrão e combinada da curva analítica.

6.2.4 RECUPERAÇÃO

O ensaio de recuperação está relacionado com a concentração do analito extraída passível de ser quantificada. Desse modo, a incerteza relacionada a esta etapa provém da concentração da amostra preparada para a realização deste ensaio. A tela na qual as grandezas de entrada são declaradas para estimar a incerteza desta etapa é apresentada na FIG 31.

The screenshot shows a software window titled "Avaliação da Incerteza - Recuperação". It features a radio button under the heading "Resposta da Análise das Amostras". Below this are six input fields for the following labels: "Concentrações (ppm)", "Concentração - Replicata 1", "Concentração - Replicata 2", "Concentração - Replicata 3", "Concentração - Brancos", and "Desvio Padrão". The "Resultados" section at the bottom contains two output fields: "R = " and "u (R) = ", both followed by "ppm". To the right of these fields are three buttons: "Calcular", "Ajuda", and "Prosseguir".

Figura 31: Tela de declaração das grandezas de entrada da incerteza da recuperação.

Como é recomendado que o ensaio de recuperação seja realizado avaliando-se três níveis de concentrações, o *software* possui a opção de o usuário selecionar o nível de concentração o qual será usado no cálculo da estimativa da incerteza, clicando no botão de seleção acima dos campos onde são declaradas as concentrações utilizados. Essa opção é explicada de maneira mais completa no Apêndice 2, no qual é apresentado o processo de estimativa da incerteza do presente trabalho realizado pelo *software* desenvolvido.

6.2.5 RELATÓRIO DE ANÁLISE

O relatório de análise é gerado somente para a estimativa da incerteza expandida. Como descrito anteriormente, este é apresentado ao usuário como um documento do Bloco de Notas e por isso, há algumas limitações quanto à presença de gráficos e um *layout*/configuração mais apresentável. Porém, no relatório constam todas as informações pertinentes ao processo realizado como as incertezas envolvidas e o intervalo de confiança escolhido pelo usuário, conforme o exemplo apresentado na FIG. 32.

Figura 32: Exemplo de relatório de análise.

6.3 CONFIGURAÇÃO MÍNIMA EXIGIDA PELO SOFTWARE

A ideia de não utilizar banco de dados para armazenar os resultados da estimativa gerados pelo *software* tem por finalidade formar uma estrutura de funcionamento lógico simples, que possa funcionar em configurações básicas, já que muitos computadores utilizados em laboratórios não possuem configuração avançada.

Sendo assim, a configuração mínima exigida pelo *software* para seu funcionamento correto é:

- Processador:
 - *Celeron* D 1.8 ou superior;
- Memória RAM:
 - mínimo de 512 MB;
- Espaço em HD:
 - mínimo de 20 MB;
- Sistema Operacional:
 - *Windows* ® *XP* ou mais recente.

7 PARTE EXPERIMENTAL

7.1 REAGENTES, MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Foram utilizados os seguintes reagentes: metanol (MeOH) e diclorometano (DCM), ambos de grau cromatográfico fornecidos pela *J.T.Baker, México*. A água purificada foi obtida a partir dos sistemas de osmose reversa *Elix 3* da *Millipore (Estados Unidos)* e ultrapurificação pelo equipamento modelo *EasyPure* da marca *Barnstead (Estados Unidos)*.

A vidraria utilizada foi descontaminada utilizando uma solução de ácido nítrico e ácido sulfúrico, ambos p.a. na proporção de 1:1 em volume de procedência da *Merck (Alemanha)*.

Os padrões analíticos utilizados foram fornecidos pela *SPEX*, a pureza, a nomenclatura *IUPAC* e a matriz são apresentas na TAB. 2.

Tabela 2: Identificação dos padrões analíticos utilizados.

Nomenclatura IUPAC	Número CAS	Fórmula Molecular	Pureza	Matriz
2,4,6-triclorofenol	88-06-2	$C_6H_3Cl_3O$	98%	Cloreto de Metileno
2,4-diclorofenol	120-83-2	$C_6H_4Cl_2O$	99%	Cloreto de Metileno
2-nitrofenol	88-75-5	$C_6H_5NO_3$	98%	Cloreto de Metileno
3-metilfenol	108-39-4	C_7H_8O	99%	Cloreto de Metileno
4-cloro-3-metilfenol	59-50-7	C_7H_7ClO	99%	Cloreto de Metileno
Pentaclorofenol	87-86-5	C_6HCl_5O	98%	Cloreto de Metileno
Fenol	108-95-2	C_6H_6O	99%	Cloreto de Metileno
Nitrobenzeno	98-95-3	$C_6H_5NO_2$	99%	Metanol

Foram utilizados:

- Vidraria básica de laboratório (Béqueres, provetas, pipetas, balão de fundo chato, balão volumétrico);
- Cartuchos para extração em fase sólida (SPE) de 6 mL preenchidos com 500 mg de octadecil (C_{18}) da marca *SupercleanTM ENVITM* (*Pensilvânia, Estados Unidos*);
- Membranas para filtração de nitrocelulose de 45µm da marca *Sartorius*.

Além da vidraria e equipamentos já mencionados, utilizou-se:

- Cromatógrafo a Gás – GC17A, acoplado ao detector de espectrometria de massas – QP 5000, ambos da marca *Shimadzu (Japão)*; com um microprocessador de dados equipado com o software *GC-MS Solution*;
- GC/MS possui uma coluna capilar DB-5 (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 μ m da fase dimetilpolisiloxano) e um detector multiplicador de elétrons, como descrito anteriormente no item 4.5.2.
- Sistema de filtração a vácuo da marca *Sartorius*;
- Compressor modelo 089 cal, marca *FANEM*;
- Sistema de extração em fase sólida adaptado no Centro de Química e Meio Ambiente do IPEN (FIG. 33);
- Centrífuga de bancada marca *Nova Técnica (Brasil)*;

Figura 33: Sistema de extração em fase sólida.

7.2 METODOLOGIA ANALÍTICA

Devido à grande aplicação dos compostos fenólicos em processos industriais, há muitos estudos sobre o tratamento de amostras e detecção dos mesmos, o que auxiliou na elaboração da metodologia analítica do presente trabalho.

De maneira geral, pode-se dividir a metodologia deste trabalho em etapas, iniciando-se pela etapa de preparo das amostras, a etapa de avaliação do desempenho da metodologia analítica, a etapa de quantificação dos analitos e finalizando na etapa de interpretação dos dados gerados. Sendo assim, neste item, serão apresentadas todas as etapas que envolveram o processo de elaboração da metodologia analítica do presente trabalho.

7.2.1 Preparo das amostras

A metodologia final para a extração dos compostos fenólicos por meio da técnica SPE é apresentada na FIG. 34. Essa metodologia é baseada no método descrito por Berhanu (2006) e o método 528 da USEPA (*Determination of phenols in drinking water by solid phase extraction and capillary column gás chromatography/mass spectrometry (GC/MS)*).

Figura 34: Procedimento de extração.

Na etapa de condicionamento, foi utilizado um cartucho C₁₈ o qual foi condicionado com 5 mL de metanol por gravidade, mantendo o solvente em contato com o cartucho por aproximadamente 2 minutos.

As amostras são filtradas a vácuo através de membrana de nitrocelulose de 0,45 µm num fluxo de aproximadamente 6 mL min⁻¹. Uma alíquota de 500 mL é percolada através do cartucho de C₁₈. O cartucho é, então, lavado com 5 mL da mistura MeOH/H₂O na proporção de 1:9, v/v.

O cartucho é centrifugado numa centrífuga de bancada programada para 25000 rotações por minuto, RPM, durante 25 minutos a fim de se eliminar toda a água restante.

Após toda centrifugação, o cartucho é lavado com 5 mL de DCM/MeOH (60:40, v/v) a um fluxo de $1\text{--}2\text{ mL min}^{-1}$ para promover a eluição e dessorção dos analitos, recolhendo-se o extrato em tubos de ensaio. Esse extrato é transferido para balões volumétricos onde é concentrado sob fluxo de N_2 para um volume de 1 mL, e por fim, é levado para a análise cromatográfica.

7.2.2 Condições cromatográficas

Visando verificar as condições para o desenvolvimento do método analítico, inicialmente foram realizadas injeções dos padrões onde foram observados o tempo de retenção, o comportamento dos compostos em relação ao programa da temperatura do forno (“rampa de temperatura”) e a sensibilidade do detector em relação aos compostos. Também foi avaliada a utilização de um padrão interno nesses mesmos parâmetros. Foram realizadas injeções de um *mix* contendo todos os compostos, incluindo o padrão interno, a fim de verificar se haveria alguma interferência entre os compostos na mesma solução.

A partir desses ensaios preliminares foram estabelecidas as condições do equipamento para esse método de análise, que são:

- **Temperatura do Injetor:** 280 °C;
- **Temperatura da Interface:** 300 °C;
- **Fluxo da Coluna:** $1,2\text{ mL min}^{-1}$;
- **Fluxo Total:** 28 mL min^{-1} ;
- **Modo de Injeção:** *Splitless*;
- **Tempo total da corrida:** 12,7 minutos.

A programação da temperatura do forno teve início em 40 °C a qual foi mantida por 2 minutos. Foi elevada a 100 °C por uma rampa de 40 °C min^{-1} mantendo essa temperatura por 0,20 min. Por fim, a temperatura foi elevada a 105 °C aumentando 2 °C min^{-1} e foi finalizada em 300 °C, sendo elevada de 105 °C até 300 °C por uma rampa de 30 °C min^{-1} . Essa rampa é apresentada na FIG. 35.

Figura 35: Gráfico representativo da programação da temperatura.

O espectrômetro de massas, durante o processo de desenvolvimento do método analítico, operou com duas configurações diferentes. Inicialmente, nas análises qualitativas foi utilizado o método de aquisição *SCAN*, com o intervalo de varredura de 50 a 340 m/z. A configuração do modo de aquisição *Single Ion Monitoring*, *SIM*, utilizada na quantificação das amostras, é apresentada na TAB 3.

Tabela 3: Configuração do modo de aquisição *SIM*.

Composto	Intervalo de Tempo (min.)	Tempo de Retenção (min.)	Íons Monitorados (m/z)
<i>Fenol</i>	4,50 - 6,25	5,75	65; 66; 94*
<i>3-metilfenol</i>	6,25 - 7,20	7	77; 79; 107; 108*
<i>Nitrobenzeno (ISTD)</i>	7,20 - 7,60	7,3	51*; 77; 107
<i>2-nitrofenol</i>	7,60 - 7,96	7,72	64.95; 81; 108.9; 138.9*
<i>2,4-diclorofenol</i>	7,96 - 8,50	8,115	63; 97.9; 161.9*; 163.9
<i>4-cloro-3-metilfenol</i>	8,50 - 9,40	9,17	77; 107; 141.9*; 143.9
<i>2,4,6-triclorofenol</i>	9,40 - 11,00	9,68	131.9; 195,8*; 197.8; 199.8
<i>Pentaclorofenol</i>	11,00 - 12,50	11,9	164.8; 263.7; 265.7*; 267.7

* Íons de maior intensidade

Os padrões analíticos utilizados foram preparados a partir de duas soluções: solução de nitrobenzeno (padrão interno) de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e a solução *mix* contendo todos os compostos estudados (2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ cada), ambas em estado líquido. A solução de trabalho do nitrobenzeno e a solução de trabalho dos compostos estudados foram obtidas

diluindo-se as soluções iniciais para uma concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ em diclorometano/metanol (60/40, v/v).

Os níveis de concentração da curva analítica foram preparados a partir da solução trabalho por meio de diluições em balões volumétricos no momento da injeção. Optou-se por não manter soluções de trabalho dos níveis de concentração da curva a fim de evitar possíveis interferentes ou a evaporação dos compostos. Na TAB. 4 são apresentadas as concentrações utilizadas na curva analítica para cada composto.

Tabela 4: Níveis de concentração da curva analítica para os compostos estudados.

	Fenol	o-cresol	Nitrobenzeno (ISTD)	2-nitrofenol	2,4-DCP	p-cloro-o- cresol	2,4,6- TCP	PCP
Nível de Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,05	0,05	4	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
	0,10	0,10	4	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
	0,15	0,15	4	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
	0,20	0,20	4	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
	0,30	0,30	4	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
	0,40	0,40	4	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
	0,50	0,50	4	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50

7.3 ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

Depois de estabelecidas as condições do método analítico, foram realizados ensaios para verificar o desempenho do mesmo seguindo as diretrizes do documento DOQ-CGC-008 do INMETRO (2011).

Os parâmetros avaliados foram: especificidade, seletividade, linearidade e faixa linear de trabalho, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, recuperação e robustez.

A especificidade foi avaliada quando do estabelecimento das condições gerais de análise cromatográfica (rampa de aquecimento, configurações do equipamento, entre outros).

7.3.1 Ensaio para avaliação da seletividade

A seletividade foi avaliada a partir da análise de cromatogramas obtidos pela injeção de soluções mix com e sem matriz. Foram aplicados os testes estatísticos F de *Snedecor* e o teste t de *Student*, ambos a fim de avaliar a interferência da matriz na análise.

O teste F consiste na avaliação da variância das áreas dos picos obtidos pela injeção dos padrões com e sem matriz e o resultado obtido ($F_{\text{calculado}}$) é comparado com um valor de referência (F_{tabelado}), com 95% de confiança e $(n-1)$ graus de liberdade. O valor de $F_{\text{calculado}}$ é obtido utilizando a equação 17.

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (\text{eq. 17})$$

onde:

$F = F_{\text{calculado}}$;

s_1^2 = maior variância;

s_2^2 = menor variância.

Se o valor de $F_{\text{calculado}}$ for maior que o valor de F_{tabelado} , a matriz tem efeito sobre o método no intervalo de concentração considerado. Desse modo, a significância das médias dos dois conjuntos de amostras pode ser testada com a distribuição t de *Student*, de acordo com a equação 18.

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad (\text{eq. 18})$$

onde:

$\bar{x}_1$ e $\bar{x}_2$ = média das replicatas dos níveis de concentração, com e sem matriz;

s_1^2 e s_2^2 = variância das replicatas nas soluções com e sem matriz;

n_1 e n_2 = tamanho do conjunto de soluções utilizadas, com e sem matriz.

Esses mesmos termos são utilizados para o cálculo do número de graus de liberdade de acordo com a equação 19.

$$v = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1 + 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2 + 1}} - 2 \quad (\text{eq. 19})$$

O valor de $t_{\text{calculado}}$ é comparado com um valor de referência (t_{tabelado}) selecionado na tabela t de *Student* de acordo com o número de graus de liberdade, v , e o intervalo de confiança (normalmente 95%). Assim como no teste F , caso o valor de $t_{\text{calculado}}$ seja maior que o valor de t_{tabelado} , a matriz interfere estatisticamente no resultado do método.

7.3.2 Ensaio para avaliação da linearidade e da faixa linear de trabalho

Para a determinação das concentrações das amostras considerou-se que a curva analítica apresentava comportamento linear ($y = ax + b$). Esse comportamento foi confirmado aplicando-se três avaliações:

- Avaliação do ajuste pelo coeficiente de determinação, r^2 ;
- Avaliação dos pontos individuais e;
- Avaliação pela tabela ANOVA (Análise da Variância).

A avaliação individual de todos os pontos da curva em relação à reta média ajustada (linear). Cada nível de concentração foi submetido à análise de resíduos pelo teste t de *Student*. O valor de $t_{\text{calculado}}$ para esse teste é obtido pela equação 20.

$$t_{\text{calculado}} = \frac{\text{resíduo}}{\left(\frac{s_r}{\sqrt{n}}\right)} \quad (\text{eq. 20})$$

onde:

resíduo = $|x_{\text{medido}} - x_{\text{calculado}}|$;

s_r = desvio padrão dos resíduos;

n = número dos níveis de concentração.

Se, para o ponto testado, $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$ (n-1 graus de liberdade e, normalmente, 95% de confiança), esse ponto pertence à reta. Esse teste é repetido para todos os pontos. A avaliação pela tabela ANOVA é realizada como apresentada genericamente na Tabela 5.

Tabela 5: Equações gerais para análise da variância (ANOVA).

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Número de graus de liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	$SQ_R = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	p - 1	$MQ_R = SQ_R / (p - 1)$	MQ_R / MQ_r
Resíduos	$SQ_r = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_i - \hat{y}_i)^2$	n - p	$MQ_r = SQ_r / (n - p)$	
Falta de Ajuste	$SQ_{faj} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	m - p	$MQ_{faj} = SQ_{faj} / (m - p)$	MQ_{faj} / MQ_{ep}
Erro Puro	$SQ_{ep} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	n - m	$MQ_{ep} = SQ_{ep} / (n - m)$	
Total	$SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$	n - 1		
% de variação explicada:	SQ_R / SQ_T			
% máxima de variação explicável:	$(SQ_T - SQ_{ep}) / SQ_T$	n_i = número de replicatas no nível i m = número de níveis distintos p = número de parâmetros do modelo		

Onde,

SQ_R = Soma quadrática da regressão;

SQ_r = Soma quadrática residual;

SQ_{faj} = Soma quadrática da falta de ajuste;

SQ_{ep} = Soma quadrática do erro puro;

SQ_T = Soma quadrática total;

MQ_R = Média quadrática da regressão;

MQ_r = Média quadrática residual;

MQ_{faj} = Média quadrática da falta de ajuste;

MQ_{ep} = Média quadrática do erro puro.

7.3.3 Ensaio para avaliação do limite de detecção

O limite de detecção foi avaliado por meio da injeção do branco da amostra com adição da menor concentração aceitável do analito e calculado utilizando a equação 9, apresentada no item 4.2.4.

A menor concentração aceitável é a menor concentração que é possível atribuir um grau de incerteza aceitável (INMETRO, 2011). Assim, a concentração utilizada para a realização desse ensaio foi de $0,20 \mu\text{g mL}^{-1}$, analisada em 7 replicatas. Essa concentração foi estabelecida a partir dos resultados do teste de variação do desvio padrão em função da variação da concentração (FIG. 46).

7.3.4 Ensaio para avaliação do limite de quantificação

Inicialmente, o limite de quantificação foi estabelecido como sendo o primeiro nível de concentração da curva analítica. Para avaliar se esse valor representaria corretamente tal limite, foi realizado o teste descrito no item 4.2.5 no qual foram realizadas 6 injeções com concentrações em torno do limite de detecção, gerando um gráfico “desvio padrão x concentração” e selecionado o valor com menor desvio padrão relativo aceitável.

O menor valor de desvio padrão relativo aceitável foi obtido por meio de consulta ao Diagrama de Horwitz (Corneta de Horwitz).

7.3.5 Ensaio para avaliação da precisão

A precisão do método desenvolvido no presente trabalho foi avaliada por meio da repetitividade, considerando-se o desvio padrão relativo de sete replicatas de diferentes concentrações realizadas pelo mesmo analista, no mesmo equipamento, com o mesmo procedimento, no mesmo dia.

O desvio padrão e a média das replicatas foram utilizados no cálculo da precisão de acordo com a equação 15, apresentada no item 4.2.7.

7.3.6 Ensaio para avaliação da recuperação

O ensaio de recuperação foi realizado fortificando-se 500 mL de uma amostra com volumes conhecidos de uma solução *mix* em três níveis de concentração e analisada

conforme o procedimento apresentado no item 7.2.1. Desse modo, avaliou-se a eficiência do método de extração.

7.3.7 Ensaio para avaliação da robustez

Para avaliação da robustez do método proposto no presente trabalho, foi utilizado o método de Youden descrito no item 4.2.8. Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando a planilha elaborada por Furusawa (2007). O ensaio de robustez foi realizado apenas na matriz variando-se sete parâmetros (os quais estão apresentados na TAB. 6) em oito experimentos.

Tabela 6: Parâmetros selecionados para o ensaio de robustez e as variações.

Fator	Nominal (-)	Variação (+)
<i>Volume da Amostra, μL</i>	1,0	1,2
<i>Temperatura do Injetor, $^{\circ}\text{C}$</i>	280	300
<i>Temperatura da Interface, $^{\circ}\text{C}$</i>	300	320
<i>Tensão do Detector, eV</i>	2,5	2,7
<i>Micro Scan Width</i>	0	1
<i>Sampling Time, min.</i>	1	1,2
<i>Solvent Cut Time, min.</i>	4,2	4,5

7.3.8 Avaliação da incerteza

Apesar de o presente trabalho propor a utilização de um software para a realização dos cálculos da incerteza, os mesmos foram realizados também manualmente (planilha eletrônica) para acompanhar os resultados gerados pelo software e corrigir eventuais erros de programação.

Como pode ser observado no Diagrama de Ishikawa apresentado na FIG. 2, as fontes de incerteza identificadas que influenciaram na determinação de compostos fenólicos pelo método desenvolvido no presente trabalho foram a incerteza associada à utilização da solução padrão, a incerteza associada ao preparo das soluções trabalho, as incertezas associadas à curva analítica (que inclui a incerteza das medidas) e a incerteza associada à recuperação.

7.3.8.1 Incerteza associada à solução padrão

A solução padrão utilizada no presente trabalho foi adquirida em ampolas de 1 mL. Os certificados emitidos pelo fornecedor reportam as incertezas relacionadas à concentração dos compostos. Desse modo, a incerteza relacionada à solução padrão foi obtida por meio da normalização do valor emitido pelo fornecedor, ou seja, foi dividido o valor da incerteza emitida pelo fornecedor por $\sqrt{3}$ (assumiu-se uma distribuição retangular).

7.3.8.2 Incerteza associada à solução trabalho

Como as soluções trabalho são obtidas pela diluição da solução padrão, a incerteza associada à utilização da mesma provém do uso dos balões volumétricos e da pipeta utilizada. Nesse cálculo, são consideradas as informações emitidas pelo fabricante dos materiais utilizados, o desvio padrão obtido pela repetitividade (tanto da pipeta quanto do balão volumétrico utilizado) e a variação da temperatura. Desse modo, a incerteza associada ao preparo da solução trabalho segue a equação 21.

$$u_{c(sol. trab.)} = C_{sol.trab.} \sqrt{\left(\frac{u(V_{sol.estoque})}{V_{sol.estoque}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{10})}{V_{10}}\right)^2 + \left(\frac{u(C_{sol.estoque})}{C_{sol.estoque}}\right)^2} \quad (\text{eq. 21})$$

onde:

$C_{sol.trab.}$ = concentração da solução intermediária de trabalho;

$u_{V \text{ sol. estoque}}$ = incerteza do volume pipetado da solução padrão para o preparo da solução intermediária;

$V_{\text{sol. estoque}}$ = volume pipeta da solução padrão no preparo da solução trabalho;

u_{V10} = incerteza do balão volumétrico;

$u_{C \text{ sol. estoque}}$ = incerteza da solução padrão de cada composto;

$C_{\text{sol. estoque}}$ = concentração da solução padrão.

7.3.8.3 Incerteza associada à resposta do equipamento

A incerteza associada à resposta do equipamento é obtida avaliando-se a área dos picos obtidos por meio de incertezas da repetitividade e da resolução do equipamento.

O valor da incerteza representado pela repetitividade das injeções é calculado de acordo com a equação 22.

$$u_{repetitividade} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (\text{eq. 22})$$

onde:

s = desvio padrão das medidas;

n = número de injeções realizadas.

Como a incerteza proveniente da resolução do equipamento é um valor padronizado, foi considerada a distribuição retangular para esse cálculo (que consiste na divisão entre a resolução a meia altura do pico por $\sqrt{3}$). Sendo assim, a incerteza padrão associada a resposta do equipamento é representada pela equação 23.

$$u_{\text{área}} = \sqrt{(u_{repetitividade})^2 + (u_{resolução})^2} \quad (\text{eq. 23})$$

7.3.8.4 Incerteza associada à recuperação

A incerteza associada à recuperação é calculada de acordo com a equação 24.

$$u_{rec} = R \sqrt{\left(\frac{u(C_{real})}{C_{real}}\right)^2 + \left(\frac{u(C_{obtida})}{C_{obtida}}\right)^2} \quad (\text{eq. 24})$$

onde:

R = valor da recuperação;

u (C_{real}) = incerteza da solução padrão adicionada;

C_{real} = concentração da solução padrão adicionada;

u (C_{obtida}) = incerteza da concentração obtida;

C_{obtida} = concentração obtida.

A solução adicionada é proveniente da solução trabalho, desse modo, a incerteza da solução adicionada é calculada pela equação 23. A incerteza da solução obtida é calculada pela equação 25.

$$u_{C\ obtida} = \frac{s_{rec}}{\sqrt{n}} \quad (\text{eq. 25})$$

onde:

s_{rec} = desvio padrão dos ensaios de recuperação;

n = número de ensaios de recuperação.

7.3.8.5 Incerteza associada ao volume final

Na etapa de preparo das amostras, após passar pelo processo de concentração, o extrato obtido é avolumado para 1 mL com o solvente de eluição, após a adição dos padrões de interesse. A incerteza associada ao volume final é a incerteza proveniente desse processo, que assim como os outros processos de diluição tem como contribuição a incerteza declarada pelo fabricante da vidraria utilizada, à incerteza proveniente da repetitividade e a incerteza proveniente da temperatura. Esse cálculo é realizado de acordo com a equação 26.

$$u_{VF} = \sqrt{(u_{repe})^2 + (u_{fabricante})^2 + (u_{\Delta t})^2 + (u_{coef.dilata\c{c}{a}{o}})^2} \quad (\text{eq. 26})$$

7.3.8.6 Incerteza combinada

Como discutido no item 4.1.3, a incerteza combinada é obtida agrupando-se todas as incertezas padrão do procedimento analítico e realizado de acordo com a equação 27.

$$u_C = C_{f\ en\ ois} \sqrt{\left(\frac{u(C_{curva})}{C_{curva}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_f)}{V_f}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{amostra})}{V_{amostra}}\right)^2 + \left(\frac{u(R)}{R}\right)^2} \quad (\text{eq. 27})$$

7.3.8.7 Incerteza expandida

Para que o valor da incerteza expandida represente a incerteza global do processo, o número de graus de liberdade efetivo deve ser considerado. A função de se avaliar tal número é que, ao combinar as incertezas padrão de várias fontes, deve-se estabelecer o intervalo no qual os valores devem variar aleatoriamente. Desse modo, ao realizar o cálculo do número de graus de liberdade efetivos e utilizá-lo para determinar o

fator de abrangência multiplicando este pelo valor da incerteza combinada, é estabelecido o intervalo no qual os possíveis valores do resultado o qual a incerteza é atribuída podem variar. Depois de calculado o número de graus de liberdade efetivos pela equação 6 e considerar o intervalo de confiança de 95%, o fator de abrangência, k , determinado para este processo foi de 1,96. Este valor foi utilizado no cálculo da incerteza expandida, de acordo com a equação 28.

$$U = u_c \cdot k \quad (\text{eq. 28})$$

7.4 QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

7.4.1 Coleta

Embora a coleta das amostras de água subterrânea ocorra bimestralmente, a quantificação dos compostos estudados no presente trabalho foi realizada somente na coleta relativa ao mês de julho de 2012. Conforme a FIG. 18, o IPEN possui seis poços para a coleta de água subterrânea os quais são apresentados individualmente na FIG. 36.

Figura 36: Local dos pontos de coleta (AP01 a AP06).

As amostras foram coletadas dos poços com um amostrador *bailer* (amostrador descartável, apresentado na FIG. 37) em frascos âmbar, totalizando um volume de quatro litros por ponto.

Figura 37: Amostrador do tipo *bailer*, utilizado na coleta.

Por estarem localizados dentro do instituto, não houve a necessidade de armazenamento da amostra (condicionamento), já que logo após esse processo, as amostras foram filtradas e submetidas ao processo de extração descrito no item 6.2.1.

8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

O processo de validação do método analítico aplicado ao presente trabalho, descrito no item 6.3, teve por finalidade garantir a qualidade dos dados gerados na quantificação de compostos fenólicos presentes na água subterrânea do IPEN. Os resultados obtidos nesse processo são apresentados nesse capítulo.

8.1.1 Seletividade

Inicialmente, a seletividade foi avaliada por meio da avaliação visual dos cromatogramas obtidos pela injeção de padrões com concentrações conhecidas a fim de observar a separação dos picos. Essa avaliação foi realizada na matriz das amostras (água subterrânea com concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$) e o cromatograma foi obtido por análise no modo SCAN, a fim de demonstrar a boa separação entre os picos (FIG. 38).

Figura 38: Cromatograma obtido na análise do padrão de concentração $1 \mu\text{g mL}^{-1}$

Observando o cromatograma apresentado na FIG. 38 pode-se notar que uma boa separação e resolução dos picos dos compostos não havendo interferência da matriz de água subterrânea nesses dois parâmetros.

Além da análise visual, outras formas de se avaliar as possíveis interferências (sobre a precisão das medidas) da matriz aplicando-se o teste F de *Snedecor* e o teste t de *Student*, descritos no item 7.3.1. Adotando-se um intervalo de confiança de 95% com 6 graus de liberdade ($n = 7$), os resultados obtidos em ambos os testes são apresentados na TAB. 7.

Tabela 7: Resultados dos testes estatísticos aplicados para avaliação da seletividade em água subterrânea (matriz, AS) e no solvente de eluição (sem matriz).

Fenol - Concentração em $\mu\text{g mL}^{-1}$								
	Concentração	0,05	0,10	0,15	0,20	0,30	0,40	0,50
Sem Matriz	s^2	1,6E+10	1,4E+09	5,0E+10	1,3E+11	2,8E+11	8,9E+11	2,5E+12
	s^2	3,9E+8	4,9E+10	8,4E+10	4,6E+10	3,9E+11	4,8E+11	3,8E+11
Matriz AS	F_{calc}	0,02	33,7	1,7	0,4	1,4	0,5	0,1
	t_{calc}	5,9	4,7	0,3	6,2	1,3	7,9	1,2
3-metilfenol - Concentração em $\mu\text{g mL}^{-1}$								
	Concentração	0,05	0,10	0,15	0,20	0,30	0,40	0,50
Sem Matriz	s^2	1,4E+10	3,1E+09	6,8E+09	3,8E+10	2,3E+11	7,1E+11	1,8E+12
	s^2	2,6E+7	1,2E+10	2,8E+10	3,9E+10	2,8E+11	4,1E+11	3,5E+11
Matriz AS	F_{calc}	0,002	3,8	4,1	0,8	1,2	0,5	0,2
	t_{calc}	6,6	4,7	0,6	7,7	1,7	7,9	0,9
Nitrobenzeno - Concentração em $\mu\text{g mL}^{-1}$								
	Concentração	0,05	0,10	0,15	0,20	0,30	0,40	0,50
Sem Matriz	s^2	6,2E+11	1,5E+11	1,4E+10	2,2E+11	1,0E+12	1,1E+12	2,0E+12
	s^2	1,4E+12	1,5E+12	2,8E+12	1,4E+12	7,4E+12	4,0E+12	2,3E+12
Matriz AS	F_{calc}	2,3	10,4	201	6,4	7,2	3,7	1,1
	t_{calc}	5,3	14,3	9,2	9,3	5,6	1,9	6,8
4-nitrofenol - Concentração em $\mu\text{g mL}^{-1}$								
	Concentração	0,05	0,10	0,15	0,20	0,30	0,40	0,50
Sem Matriz	s^2	1,4E+09	1,4E+08	2,4E+08	2,4E+09	1,7E+10	7,7E+10	1,4E+11
	s^2	8,4E+05	5,9E+08	1,7E+09	2,9E+09	7,3E+10	3,0E+10	3,4E+10
Matriz AS	F_{calc}	0,0006	4,1	6,9	1,2	4,2	0,4	0,2
	t_{calc}	6,4	8,2	2,7	2,2	1,8	4,5	1,1
2,4-diclorofenol - Concentração em $\mu\text{g mL}^{-1}$								
	Concentração	0,05	0,10	0,15	0,20	0,30	0,40	0,50
Sem Matriz	s^2	1,4E+10	1,3E+09	3,8E+10	5,3E+10	9,7E+10	2,8E+11	7,6E+11
	s^2	7,8E+07	1,7E+10	1,2E+10	1,0E+10	9,4E+10	1,7E+11	2,0E+11
Matriz AS	F_{calc}	0,001	13,8	0,3	0,2	0,9	0,6	0,3
	t_{calc}	4,3	2,7	0,1	6,1	4,3	8,7	0,9

(Continuação: Tabela 7: Resultados dos testes estatísticos aplicados para avaliação da seletividade subterrânea (matriz, AS) e no solvente de eluição (sem matriz)).

4-cloro-3-metilfenol - Concentração em μg								
	Concentração	0,05	0,10	0,15	0,20	0,30	0,40	0,50
Sem Matriz	s^2	8,6E+09	6,7E+08	1,5E+10	3,0E+10	5,6E+10	1,1E+11	5,1E+11
	s^2	4,6E+08	2,9E+09	1,2E+10	1,7E+10	9,8E+10	2,2E+11	2,3E+11
Matriz AS	F_{calc}	0,005	4,4	0,8	0,6	1,8	1,9	0,5
	t_{calc}	5,1	7,5	0,8	6,3	5,8	8,6	0,1
2,4,6-triclorofenol - Concentração em $\mu\text{g mL}^{-1}$								
	Concentração	0,05	0,10	0,15	0,20	0,30	0,40	0,50
Sem Matriz	s^2	6,7E+09	5,5E+08	4,0E+09	7,4E+09	6,7E+10	3,8E+10	1,7E+11
	s^2	3,7E+07	1,2E+09	5,0E+09	3,2E+09	1,5E+10	7,5E+10	4,7E+10
Matriz AS	F_{calc}	0,001	2,3	1,3	0,4	0,2	1,9	0,3
	t_{calc}	6,4	6,3	2,2	10,3	1,1	9,6	1,4
Pentaclorofenol - Concentração em $\mu\text{g mL}^{-1}$								
	Concentração	0,05	0,10	0,15	0,20	0,30	0,40	0,50
Sem Matriz	s^2	1,8E+09	1,0E+08	4,0E+08	1,1E+09	3,4E+09	1,4E+10	2,7E+10
	s^2	4,5E+06	7,4E+08	3,7E+09	3,1E+09	1,5E+10	2,8E+10	2,7E+10
Matriz AS	F_{calc}	0,002	7,2	9,1	2,7	4,4	1,9	0,9
	t_{calc}	4,8	12,9	6,5	3,8	9,2	1,6	4,9

Como discutido no item 6.3.1, se o valor de F_{calc} for maior que o valor de F_{tab} ($F_{\text{tab}} = 4,28$ com 6 graus de liberdade e intervalo de confiança de 95%), a matriz é tida como interferente na precisão do método. Como se pode observar na TAB. 6, somente alguns valores apresentaram tal comportamento, entretanto, a interpretação dos resultados obtidos pelo teste t de *Student*, no qual a matriz é tida como interferente se o valor de t_{calc} for maior que o valor de t_{tab} ($t_{\text{tab}} = 2,179$ para o intervalo de confiança de 95% e 12 graus de liberdade), demonstrou que a matriz interfere na precisão do método em grande parte dos níveis de concentração.

Desse modo, optou-se por realizar a quantificação das amostras por meio de uma curva analítica elaborada na matriz a fim de minimizar as interferências da mesma durante as medições.

8.1.2 Linearidade e faixa linear de trabalho

Além de avaliar a linearidade da curva analítica pelo valor do coeficiente de determinação, r^2 , método mais usual, também foram utilizados o teste t de *Student* e a análise de variância (ANOVA), que apresenta outros recursos como a avaliação do conjunto de dados (% máxima de variação explicável) e do modelo ajustado (teste F).

No antigo documento do INMETRO DOQ-CGCRE-008 de 2003 o valor do coeficiente de correlação linear, r , aceitável era acima de 0,90. Nas versões mais recentes não há essa recomendação, sendo que na versão atual, (INMETRO, 2011), o documento faz menção somente à avaliação pelo coeficiente de correlação linear sem mencionar valor e à análise de variância.

Para o fenol, os dados gerados na tabela ANOVA (FIG. 39) indicaram que pelo modelo linear ajustado a ($F_{\text{calculado}} = 1103,72 > F_{\text{tabelado}} = 4,75$) regressão é significativa e não há evidência de falta de ajuste dos dados ($F_{\text{calculado}} = 3,42 < F_{\text{tabelado}} = 3,97$). Além disso, a porcentagem de variação explicada (99,72; r^2) está muito próxima à porcentagem máxima de variação explicável (99,89). Esse comportamento observado no tratamento dos dados do fenol foi praticamente o mesmo para todos os compostos estudados, exceto para o 4-cloro-3-metilfenol. Na FIG. 39 é apresentada a tabela ANOVA fenol e na TAB. 8 são apresentados os resultados resumidos para os demais compostos estudados.

Análise da variância para o ajuste de um modelo LINEAR ($y=ax+b$)							
Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F			
Regressão	0,73	1	0,73				
Resíduos	0,01	12	0,00	1103,72			
Falta de Ajuste	0,01	5	0,00				
Erro Puro	0,00	7	0,00	3,42			
Total	0,74	13					
% de variação explicada	99,72	F(95%)	1	12	F(1,10, 95%)	4,75	A Regressão é significativa
% máxima de variação explicável	99,89	F(95%)	5	7	F(4, 6, 95%)	3,97	A Falta de Ajuste não é evidenciada

Figura 39: Tabela ANOVA para o ajuste do modelo linear do fenol.

Tabela 8: Valores do teste ANOVA aplicado aos compostos estudados.

Valores do teste ANOVA						
	% Máxima Explicável	% Explicada	F Regressão	Falta de Ajusta	Regressão	Falta de Ajuste
Fenol	99,89	99,72	1103	3,4	Significativa	Não Evidenciado
3-metilfenol	99,99	99,93	17197	10,9	Significativa	Evidenciado
4-nitrofenol	99,98	99,94	20538	6,4	Significativa	Evidenciado
2,4-diclorofenol	99,99	99,34	1812	9,3	Significativa	Evidenciado
4-cloro-3-metilfenol	99,69	99,28	1652	1,8	Significativa	Não Evidenciado
2,4,6-triclorofenol	99,99	98,95	1133	7,5	Significativa	Evidenciado
Pentaclorofenol	99,96	99,49	2356	9,2	Significativa	Evidenciado

Como pode ser observado na TAB. 8 os valores de F_{cal} para a análise do modelo de regressão linear estão todos acima do valor de tabelado ($F_{tab} = 4,75$), desse evidenciando que a regressão é significativa.

Porém, foi observado ajuste do modelo linear apenas para os compostos fenol e 4-cloro-3-metilfenol. Apesar desse ajuste não evidenciado, a utilização do modelo linear proposto para esses compostos não é inviabilizada, já que a regressão significativa e a porcentagem explicada demonstraram que é possível obter um bom desempenho do método.

Os valores do teste t de *Student* obtidos para os pontos das curvas (com e sem matriz) são apresentados nas tabelas 9 e 10. O valor crítico para 95% de confiança e 12 graus de liberdade é $t_{tabelado} = 2,4$. Assim, podemos observar alguns pontos que poderiam ser classificados como não pertencentes à curva (o ponto de $0,40 \mu\text{g mL}^{-1}$ da curva com matriz, por exemplo). Porém, esses valores são indicativos e auxiliam o analista na tomada de decisão. Pelos resultados obtidos nos demais testes e pela experiência obtida durante o desenvolvimento do método, podemos afirmar que o ajuste linear é adequado para todos os analitos e não há necessidade de se retirar esses pontos (discrepantes) do conjunto que constituirá a curva analítica. Esses pontos “discrepantes” podem ser explicados pelo fato de o conjunto dos pontos serem muito bem ajustáveis ao modelo e não apresentarem grandes variações entre as replicatas (precisão alta). Assim, como o teste t de *Student* considera as variâncias das replicatas, qualquer variação um pouco maior num conjunto muito estável aparecerá como discrepante. Uma outra possível aplicação para esse teste é a avaliação de uma possível ocorrência de desvios ou tendências na curva que poderia, então, ser atribuída à não linearidade no intervalo estudado. Os dados também não mostram tendências.

Tabela 9: Valores obtidos no teste *t* de *Student* para avaliação da linearidade. ($t_{\text{tab}} = 2,4$; 95%, 12 graus de liberdade).

Valores teste <i>t</i> de <i>Student</i> - Matriz Água Subterrânea							
	Concentração - $\mu\text{g mL}^{-1}$						
	0,05	0,10	0,15	0,20	0,30	0,40	0,50
Fenol	0,8	1,3	0,4	2,3	2,2	5,3	2,2
3-metilfenol	1,9	0,5	1,7	2,1	2,4	5,8	1,9
4-nitrofenol	2,1	0,4	0,1	2,3	2,2	4,3	2,1
2,4-diclorofenol	1,5	1,9	0,5	2,1	2,3	2,0	0,6
4-cloro-3-metilfenol	1,5	1,9	0,4	2,3	2,3	2,0	0,5
2,4,6-triclorofenol	1,6	1,4	0,5	1,7	1,4	4,7	4,9
Pentaclorofenol	2,8	0,6	0,2	6,2	2,0	2,0	0,6

Tabela 10: Valores obtidos no teste *t* de *Student* para avaliação da linearidade (ensaio sem matriz).

Valores teste <i>t</i> de <i>Student</i> – Sem Matriz							
	Concentração - $\mu\text{g mL}^{-1}$						
	0,05	0,10	0,15	0,20	0,30	0,40	0,50
Fenol	1,4	1,1	0,8	0,8	3,1	5,3	2,3
3-metilfenol	1,4	0,9	0,7	0,6	3,4	5,2	2,1
4-nitrofenol	1,7	0,8	1,1	0,2	2,8	5,5	2,3
2,4-diclorofenol	1,5	0,6	0,9	0,5	4,1	4,6	1,2
4-cloro-3-metilfenol	1,5	0,5	0,7	0,5	4,4	4,3	0,9
2,4,6-triclorofenol	1,2	1,1	0,8	0,9	3,2	5,3	2,4
Pentaclorofenol	2,4	0,03	0,9	0,8	5,4	2,1	1,8

Além desses testes, observou-se também a representação gráfica da linearidade na curva analítica com matriz para os compostos estudados (apresentados na FIG. 40), assim como as equações da reta e o coeficiente de determinação das curvas analíticas (apresentados na TAB. 11).

Tabela 11: Equações da reta e coeficiente de determinação, r^2 , dos compostos avaliados. Curva analítica com matriz de água subterrânea.

Curva Analítica		
Composto	Matriz (AS)	
	Eq. da Reta	r^2
Fenol	$y = 0,9148X - 0,0201$	0,997
3-metilfenol	$y = 0,8884X - 0,0154$	0,9997
4-nitrofenol	$y = 0,9003X - 0,0197$	0,9995
2,4-diclorofenol	$y = 0,9336X - 0,0262$	0,9992
4-cloro-3-metilfenol	$y = 0,9397X - 0,0247$	0,997
2,4,6-triclorofenol	$y = 0,9715X - 0,0295$	0,997
Pentaclorofenol	$y = 0,9811X - 0,0305$	0,998

Figura 40: Representação gráfica da linearidade para os compostos estudados.

Segundo INMETRO (2003) o valor do coeficiente de correlação, frequentemente usado para indicar o quanto pode ser considerada adequada a reta como modelo matemático, usualmente requerido é acima de 0,90, significando um valor de r^2 de 0,81. Os valores obtidos nas curvas utilizadas para a quantificação (curva com matriz) superam esse valor para todos os compostos, conforme observado na TAB. 11.

8.1.3 Limite de detecção

Seguindo as diretrizes do INMETRO (2003), o limite de detecção foi estabelecido avaliando-se o desvio padrão de sete replicatas da solução *mix* com concentração de 0,20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada analito. Os limites de detecção de cada composto são apresentados na TAB. 12.

Tabela 12: Limites de detecção calculados.

Compostos	Limite de detecção
	$\mu\text{g mL}^{-1}$
Fenol	0,04
3-metilfenol	0,03
4-nitrofenol	0,03
2,4-diclorofenol	0,02
4-cloro-3-metilfenol	0,03
2,4,6-triclorofenol	0,03
Pentaclorofenol	0,04

8.1.4 Limite de quantificação

Assim como o limite de detecção, o limite de quantificação foi estabelecido seguindo as orientações do INMETRO (2011). Conforme o documento, e descrito no item 7.3.4., o limite de quantificação estabelecido foi o primeiro nível de concentração da curva analítica, que para o presente trabalho é de 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para todos os analitos.

Com a finalidade de verificar se tal abordagem seria correta para a determinação do valor de limite de quantificação, foi realizado um estudo por meio da quantificação em seis níveis de concentração com valores próximos ao limite de detecção estabelecido. Os desvio padrão relativos dessas replicatas foram apresentados graficamente em função das respectivas concentrações (FIG. 41).

Figura 41: Gráfico de avaliação do desvio padrão relativo para a determinação do limite de quantificação.

A determinação do desvio padrão relativo aceitável é realizada por meio da análise do diagrama de Horwitz (corneta de Horwitz), conforme descrito no item 4.2.5. Pela análise do diagrama na região das concentrações estudadas a concentração de 0,05 µg mL⁻¹.

8.1.5 Precisão

A precisão do procedimento analítico foi avaliada considerando o parâmetro coeficiente de variação, CV, ou desvio padrão relativo. Para a avaliação desse parâmetro, foram selecionadas duas concentrações (0,05 e 0,20 µg mL⁻¹) e considerados medidas em sete replicatas com matriz de água subterrânea. O nível mais baixo foi escolhido pois é o mais provável de sofrer interferência da matriz. O nível de 0,20 µg mL⁻¹ foi escolhido para avaliar as flutuações em um pico cromatográfico bem definido. Os valores de coeficiente de variação obtidos são apresentados na TAB. 13.

Tabela 13: Coeficiente de variação (%) nos níveis de concentração avaliados.

Coeficiente de variação (%)		
Compostos	Concentração - µg mL ⁻¹	
	0,05	0,2
Fenol	16	16
3-metilfenol	18	12
4-nitrofenol	19	9
2,4-diclorofenol	16	4
4-cloro-3-metilfenol	17	11
2,4,6-triclorofenol	15	12
Pentaclorofenol	14	18

Com exceção ao pentaclorofenol, na concentração mais baixa os CV são maiores do que na concentração mais alta. Esse comportamento está de acordo com o esperado uma vez que sinais decorrentes de concentrações baixas (nessa ordem de grandeza) são mais instáveis e susceptíveis a interferência externa.

8.1.6 Recuperação

O ensaio de recuperação foi realizado em três níveis de concentração distintos (0,05; 0,20 e 0,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os resultados obtidos nos testes, assim como as concentrações utilizadas são apresentados na TAB. 14.

Tabela 14: Valores de recuperação obtidos e as concentrações avaliadas.

	Recuperação (%)		
	0,05	0,20	0,50
	$\mu\text{g mL}^{-1}$	$\mu\text{g mL}^{-1}$	$\mu\text{g mL}^{-1}$
Fenol	37	41	46
3-metilfenol	40	37	45
4-nitrofenol	48	59	58
2,4-diclorofenol	61	65	78
4-cloro-3-metilfenol	50	52	71
2,4,6-triclorofenol	71	72	79
Pentaclorofenol	67	70	78

Segundo Ribani *et al* (2004), os intervalos aceitáveis para análise de resíduos no ensaio de recuperação estão entre 70 e 120% com precisão de até 20%. Observando os valores obtidos no ensaio apresentados na TAB. 14, a recuperação para o procedimento analítico proposto no presente trabalho é baixa, com tendência de melhora com o aumento da concentração. Esse comportamento é esperado já que os níveis avaliados são baixos (abaixo de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e o cartucho C_{18} utilizado não é específico para a classe desses compostos. Mesmo assim, para os compostos 2,4-diclorofenol; 4-cloro-3-metilfenol; 2,4,6-triclorofenol e pentaclorofenol as recuperações estão acima de 70% em 0,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, que é o limite máximo permissível para compostos fenólicos segundo o CONAMA. Dessa forma, o processo mostrou-se adequado para a quantificação dos compostos fenólicos nessa faixa de concentração.

8.1.7 Robustez

Com o intuito de avaliar a resposta do método frente a pequenas variações, o ensaio de robustez foi realizado conforme descrito no item 6.3.7. Esse comportamento dos compostos é apresentado na FIG. 42.

Figura 42: Comportamento dos compostos no ensaio de robustez.

De uma maneira geral, os parâmetros mais críticos no método são o *micro scan width* e o volume da amostra. Na etapa de injeção da amostra é utilizada uma seringa com subdivisões de 0,1 μL e de fácil manuseio para os operadores treinados. Assim, as variações no volume de injeção não são significativas, podendo considerar a injeção de volumes praticamente “constantes”. Já o *micro scan width* é um parâmetro que pode ser configurado pelo programa de operação do equipamento, não tendo o operador controle sobre o seu funcionamento durante a aquisição dos dados. Da mesma forma, considera-se que não há variação significativa dos valores desse parâmetro durante a aquisição dos dados já que no período de utilização do equipamento não houve evento que indicasse essa alteração. Desse modo, não há a necessidade de alteração de nenhum parâmetro estabelecido para essa metodologia.

Individualmente, por meio da análise dos gráficos de probabilidade normal, os comportamentos dos compostos em relação aos parâmetros avaliados são específicos. Sendo assim, os gráficos individuais são apresentados na FIG. 43.

Figura 43: Comportamento individual dos compostos no ensaio de robustez.

(Continuação Figura 43: Comportamento individual dos compostos no ensaio de robustez).

Os limites *Margin of Error*, *ME*, e *Simultaneous Margin of Error*, *SME*, determinam que um parâmetro que ultrapassa o limite *ME* pode, possivelmente, ter algum efeito sobre o processo na variação avaliada. Não deve necessariamente ser reajustado. Se ultrapassar o limite *SME*, o parâmetro tem claramente um efeito sobre o processo. Porém, também não deve ser necessariamente reajustado. Alguns fatores como o aumento de custos, desgastes excessivos, melhora do sinal justificável, podem ser mais significativos do que o reajuste do processo.

Observando os gráficos de probabilidade normal, em todos os eles, dois valores ficaram acima do limite *ME* e, em alguns casos, os valores estavam acima do limite superior *SME*. Para todos os compostos, o parâmetro *micro scan width* foi o que mais se apresentou susceptível às variações estudadas. Tal parâmetro, relacionado ao espectrômetro de massas, representa a sensibilidade da avaliação da área do pico, desse modo, o método fica suscetível a influências negativas já que assim, o equipamento pode considerar relações massa/carga que não representam o composto em si.

A influência positiva observada pela variação do parâmetro *tensão do detector*, segundo valor mais alto em todos os gráficos apresentados na FIG. 43 já era esperado, já que com o aumento da tensão, aumenta significativamente a intensidade do sinal. Porém, este parâmetro não foi alterado no método de análise, pois, como mencionado anteriormente, não houve necessidade de se elevar a tensão do detector, pois os sinais

estavam em uma ordem de grandeza razoável para serem tratados. Além disso, o aumento da tensão do detector diminui útil do mesmo. Todos os outros parâmetros avaliados no ensaio estavam abaixo do ME, e assim, não interferem significativamente na análise, havendo a necessidade de alteração desses parâmetros.

Assim, considera-se que o método de análise é robusto o suficiente, nas condições estabelecidas, para a determinação dos compostos fenólicos estudados em matriz de água subterrânea.

8.1.8 Resultados Quantitativos e a Estimativa da incerteza de medição

Depois de estabelecida todas as fontes de incerteza e realizada a validação do procedimento analítico, a estimativa da incerteza foi realizada com intervalo de confiança de aproximadamente 95%. O processo de estimativa da incerteza foi realizado utilizando-se o software e manualmente com o intuito de avaliar os resultados gerados pelos dois modos, assim como a facilidade que o software proporciona no processo de estimativa da incerteza.

Como pode ser observado na TAB. 15, todos os analitos, se presentes, estão em concentrações abaixo do LQ ($0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$). Para águas subterrâneas esse comportamento não é incomum e para a área estudada é perfeitamente aceitável. Apesar de inúmeras atividades que se desenvolvem no IPEN poderem ser classificadas como industriais, as ideias de Gerenciamento de Resíduos são bem aceitas por toda a comunidade o que pode refletir nesses baixos níveis (se) apresentados por esses compostos.

Tabela 15: Valores de concentração dos compostos.

Compostos	Concentração					
	$\mu\text{g mL}^{-1}$					
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6
Fenol	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
3-metilfenol	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
4-nitrofenol	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
2,4-diclorofenol	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
4-cloro-3-metilfenol	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
2,4,6-triclorofenol	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05

Tabela 16: Incertezas expandidas estimadas para o procedimento proposto.

Faixa de Incerteza Estimada		
Compostos	Mínimo	Máximo
	$\mu\text{g mL}^{-1}$	
Fenol	0,06	0,12
3-metilfenol	0,04	0,04
4-nitrofenol	0,10	0,13
2,4-diclorofenol	0,04	0,20
4-cloro-3-metilfenol	0,09	0,20
Pentaclorofenol	0,04	0,08

Todos os cálculos envolvidos no processo de estimativa da incerteza são apresentados no Apêndice 1. No Apêndice 2 são apresentadas as telas com os valores obtidos da mesma estimativa, porém, realizada pelo software desenvolvido no presente trabalho.

A Tabela 16 apresenta as incertezas estimadas para o procedimento proposto neste trabalho. Alguns valores estão na ordem de $0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$ outros estão em $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para todos os compostos, o componente da incerteza que mais contribui é a curva analítica, FIG 44. Isso é, em parte, devido às fontes de incertezas consideradas para esta grandeza de entrada. Para um processo de análise cromatográfica, muitas etapas são altamente impactantes, ou seja, podem gerar variações consideráveis propagáveis até o resultado final. Podemos citar todas as etapas de preparação das soluções (diluições), a extração/recuperação dos analitos e a etapa de medição em si que, por se tratar de baixas concentrações o sinal analítico (área) do cromatograma é significativamente influenciado tanto pelas características químicas do composto estudado quanto pela presença de outros compostos (matriz) e sensibilidade do equipamento de medição.

O uso de uma solução *mix* dos analitos pode ser considerado uma vantagem para esse estudo, uma vez que os compostos desse grupo podem estar presentes concomitantemente com uma certa frequência, pois, se bem avaliados, podem ser considerados indicadores de determinadas atividades industriais.

Ressalta-se que a não quantificação dos analitos nos níveis referenciados pela legislação não significa que não estão presentes. Este trabalho procurou contribuir com a criação de um *software* de cálculo de incertezas para que resultados como esses pudessem ser avaliados com mais segurança. A validação aplicada ao procedimento analítico, o estudo das incertezas e a facilidade proporcionada pelo *software* permite-nos, então, comentar com segurança os resultados apresentados neste trabalho.

Figura 44: Representação gráfica das incertezas individuais.

8.1.9 Eficiência do *software*

A eficiência do *software* no procedimento de estimativa da incerteza de medição é observada principalmente em relação à quantidade de algarismos significativos e o tempo de execução do processo.

Os algarismos significativos podem provocar um aumento na incerteza de um processo caso os arredondamentos intermediários sejam realizados de maneira equivocada. Como no processo em questão a quantidade de algarismos significativos utilizados foi determinada pelo analista, para comparar a eficiência em relação a esta questão foi considerado um processo da literatura descrito no guia de referência EURACHEM e é apresentado em tal guia como o “Exemplo A1: Preparação de um padrão de calibração”. Neste exemplo fornecido pelo guia, os valores da incerteza apresentados provavelmente sofreram arredondamentos intermediários, já que o mesmo processo realizado pelo *software* com os valores de entrada também fornecidos pelo guia forneceu valores com diferenças, conforme apresentado na TAB. 17.

Tabela 17: Comparação dos valores da literatura com os valores gerados pelo *software* para o mesmo processo.

	Valor no Guia	Valor do Software
Incerteza Padrão - Pureza	0,000058 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,0000577 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Incerteza Padrão - Massa	0,05 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,05 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Incerteza Padrão - Volume	0,07 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,066 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Incerteza Padrão Combinada	0,9 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,83 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Incerteza Expandida	1,8 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,66 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Tempo de processamento dos dados	-	72 segundos

9 CONCLUSÕES

1. O *software* elaborado para a estimativa da incerteza de medição do processo analítico proposto no presente trabalho mostrou-se útil, pois:
 - a. Permite que o usuário saiba quais os dados irá gerar ou obter;
 - b. Permite que o usuário organize esses dados na forma de etapas de cálculo, o que diminui a ocorrência de erros sistemáticos;
 - c. Diminui o tempo consumido com cálculos e eventuais processos de revisão de entrada de dados;
 - d. Gera um relatório com um resumo dos dados de entrada e os resultados para as incertezas;
 - e. A partir desse relatório, o usuário poderá avaliar o processo e retomar ou atuar em alguma etapa realizada, caso haja necessidade.
2. A validação do *software* utilizando dados da literatura mostrou que a estrutura para o desenvolvimento de softwares voltados à metrologia química proposta no presente trabalho é funcional ;
3. O *software* não realiza arredondamentos intermediários, o que permite ao usuário fazê-lo no resultado final minimizando os erros provenientes desses arredondamentos (propagação de erros e falsa interpretação das etapas e do processo).
4. A diversidade das necessidades de uma análise química é grande, no entanto, o programa permite algumas personalizações em função da necessidade do usuário.
5. O programa não é definitivo, podendo e devendo absorver melhorias.

6. O método desenvolvido mostrou-se adequado para a quantificação dos compostos estudados no presente trabalho. A recuperação está associada ao nível de concentração avaliado.
7. O resultado da quantificação dos compostos fenólicos mostrou que os poços de inspeção estudados estão livres de contaminação por essa classe de substâncias. O cenário para essas substâncias é decorrente da natureza das atividades realizadas no instituto e do Programa de Gerenciamento de Resíduos Químicos que estabelece procedimentos para a segregação e/ou descarte dos resíduos.
8. A utilização do *software* para a estimativa da incerteza do processo desenvolvido no presente trabalho foi essencial, pois este auxiliou no entendimento e organização das etapas deste processo (o *software* foi desenvolvido antes de o procedimento analítico ser estabelecido e ajustado durante o processo de desenvolvimento) além de auxiliar nos cálculos.
9. Finalmente, não há como estimar as incertezas se o usuário não tem conhecimento sobre as etapas do processo. O programa apresenta diversos *links* de ajuda para os iniciantes e para que o usuário utilize a ferramenta da forma que realmente precisa.

10 CONSIDERAÇÕES FINAIS/ TRABALHOS FUTUROS

Uma das características do desenvolvimento de programas é a necessidade de acompanhamento constante e próximo tanto do demandante quanto do programador. Possíveis evoluções do programa passam pelo aumento das possibilidades de configuração das ferramentas, melhora dos *links* de ajuda tornando o programa quase que autoexplicativo, implementação de interfaces com outros programas e em especial aqueles direcionados ao gerenciamento de laboratórios com ou sem sistema de qualidade implantados, entre outros.

11 APENDICE 1

Cálculo da incerteza de medição para o Fenol

1. Incerteza da solução estoque

Grandezas de entrada: pureza do padrão (a solução padrão foi adicionada diretamente na solução de trabalho)

$$u(P) = 0,005773503 \mu\text{g mL}^{-1}$$

2. Incerteza da solução trabalho

Grandezas de entrada: incerteza da solução estoque, volume pipetado da solução estoque e volume final da solução trabalho.

$$u(C_{\text{sol. estoque}}) = 0,005773503 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(V_{\text{pipetado}}) = 0,000100184 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 8,66025\text{E-}05$$

$$\text{repetitividade} = 0,00005$$

$$\Delta t = 6,06218\text{E-}06$$

$$u(V_{\text{FINAL}}) = 0,012033426 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 0,011547005$$

$$\text{repetitividade} = 0,003162278$$

$$\Delta t = 0,001212436$$

Incerteza Combinada

$$u_c(\text{Solução}_{\text{Fenol}}) = 0,023255629 \mu\text{g mL}^{-1}$$

3. Incertezas das soluções de calibração para a curva analítica

Grandezas de entrada: incerteza da solução trabalho, incerteza do volume pipetado e incerteza dos balões volumétricos utilizados.

Incerteza dos volumes pipetados

- Ponto 1

$$u(V_{\text{PONTO 1}}) = 8,67489\text{E-}05 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 8,66025\text{E-}05$$

$$\text{repetitividade} = 0,000005$$

$$\Delta t = 6,06218\text{E-}07$$

- Ponto 2

$$u(V_{\text{PONTO 3}}) = 5,86072\text{E-}05 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 5,7735\text{E-}05$$

repetitividade = 0,00001

$\Delta t = 1,21244\text{E-}06$

- Ponto 3

$u(V_{\text{PONTO } 4}) = 8,79108\text{E-}05 \mu\text{g mL}^{-1}$

calibração = 8,66025E-05

repetitividade = 0,000015

$\Delta t = 1,81865\text{E-}06$

- Ponto 4

$u(V_{\text{PONTO } 5}) = 0,000117214 \mu\text{g mL}^{-1}$

calibração = 0,00011547

repetitividade = 0,00002

$\Delta t = 2,42487\text{E-}06$

- Ponto 5

$u(V_{\text{PONTO } 6}) = 0,000520493 \mu\text{g mL}^{-1}$

calibração = 0,000519615

repetitividade = 0,00003

$\Delta t = 3,63731\text{E-}06$

- Ponto 6

$u(V_{\text{PONTO } 7}) = 0,000693991 \mu\text{g mL}^{-1}$

calibração = 0,00069282

repetitividade = 0,00004

$\Delta t = 4,84974\text{E-}06$

- Ponto 7

$u(V_{\text{PONTO } 8}) = 0,000293036 \mu\text{g mL}^{-1}$

calibração = 0,000288675

repetitividade = 0,00005

$\Delta t = 6,06218\text{E-}06$

Incerteza Combinada das soluções da curva analítica

$u_c (\text{Curva}_{\text{Ponto } 1}) = 0,000917109 \mu\text{g mL}^{-1}$

$u_c (\text{Curva}_{\text{Ponto } 2}) = 0,000851053 \mu\text{g mL}^{-1}$

$u_c (\text{Curva}_{\text{Ponto } 3}) = 0,001276579 \mu\text{g mL}^{-1}$

$u_c (\text{Curva}_{\text{Ponto } 4}) = 0,001702105 \mu\text{g mL}^{-1}$

$u_c (\text{Curva}_{\text{Ponto } 5}) = 0,005502655 \mu\text{g mL}^{-1}$

$u_c (\text{Curva}_{\text{Ponto } 6}) = 0,007336874 \mu\text{g mL}^{-1}$

$u_c (\text{Curva}_{\text{Ponto } 7}) = 0,004255263 \mu\text{g mL}^{-1}$

4. Incerteza da curva analítica

Grandezas de entrada: área das amostras, área do branco, soluções da curva analítica, áreas referentes às soluções da curva analítica.

Incerteza combinada da curva analítica

$$u_c (\text{Curva analítica}) = 0,03874 \mu\text{g mL}^{-1}$$

5. Incerteza da recuperação

Grandezas de entrada: concentração da solução padrão e resultado da solução encontrada.

Incerteza combinada da recuperação

$$u_c (\text{recuperação}) = 0,0036 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(C_{\text{real}}) = 0,002337 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(C_{\text{obtida}}) = 0,00278213 \mu\text{g mL}^{-1}$$

Cálculo da incerteza de medição para o 3-metilfenol

1. Incerteza da solução estoque

Grandezas de entrada: pureza do padrão (a solução padrão foi adicionada diretamente na solução de trabalho)

$$u(P) = 0,005773503 \mu\text{g mL}^{-1}$$

2. Incerteza da solução trabalho

Grandezas de entrada: incerteza da solução estoque, volume pipetado da solução estoque e volume final da solução trabalho.

$$u(C_{\text{sol. estoque}}) = 0,005773503 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(V_{\text{pipetado}}) = 0,000100184 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 8,66025\text{E-}05$$

$$\text{repetitividade} = 0,00005$$

$$\Delta t = 6,06218\text{E-}06$$

$$u(V_{\text{FINAL}}) = 0,012033426 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 0,011547005$$

$$\text{repetitividade} = 0,003162278$$

$$\Delta t = 0,001212436$$

Incerteza Combinada

$$u_c (\text{Solução}_{\text{Fenol}}) = 0,023372509 \mu\text{g mL}^{-1}$$

3. Incertezas das soluções de calibração para a curva analítica

Grandezas de entrada: incerteza da solução trabalho, incerteza do volume pipetado e incerteza dos balões volumétricos utilizados.

Incerteza dos volumes pipetados

- Ponto 1
 $u(V_{\text{PONTO 1}}) = 8,67489\text{E-}05 \mu\text{g mL}^{-1}$
calibração = 8,66025E-05
repetitividade = 0,000005
 $\Delta t = 6,06218\text{E-}07$
- Ponto 2
 $u(V_{\text{PONTO 3}}) = 5,86072\text{E-}05 \mu\text{g mL}^{-1}$
calibração = 5,7735E-05
repetitividade = 0,00001
 $\Delta t = 1,21244\text{E-}06$
- Ponto 3
 $u(V_{\text{PONTO 4}}) = 8,79108\text{E-}05 \mu\text{g mL}^{-1}$
calibração = 8,66025E-05
repetitividade = 0,000015
 $\Delta t = 1,81865\text{E-}06$
- Ponto 4
 $u(V_{\text{PONTO 5}}) = 0,000117214 \mu\text{g mL}^{-1}$
calibração = 0,00011547
repetitividade = 0,00002
 $\Delta t = 2,42487\text{E-}06$
- Ponto 5
 $u(V_{\text{PONTO 6}}) = 0,000520493 \mu\text{g mL}^{-1}$
calibração = 0,000519615
repetitividade = 0,00003
 $\Delta t = 3,63731\text{E-}06$
- Ponto 6
 $u(V_{\text{PONTO 7}}) = 0,000693991 \mu\text{g mL}^{-1}$
calibração = 0,00069282
repetitividade = 0,00004
 $\Delta t = 4,84974\text{E-}06$
- Ponto 7
 $u(V_{\text{PONTO 8}}) = 0,000293036 \mu\text{g mL}^{-1}$
calibração = 0,000288675
repetitividade = 0,00005

$$\Delta t = 6,06218\text{E-}06$$

Incerteza Combinada das soluções da curva analítica

$$u_c (\text{Curva}_{\text{Ponto 1}}) = 0,000921718 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u_c (\text{Curva}_{\text{Ponto 2}}) = 0,000855329 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u_c (\text{Curva}_{\text{Ponto 3}}) = 0,001282994 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u_c (\text{Curva}_{\text{Ponto 4}}) = 0,001710658 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u_c (\text{Curva}_{\text{Ponto 5}}) = 0,005530307 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u_c (\text{Curva}_{\text{Ponto 6}}) = 0,007373742 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u_c (\text{Curva}_{\text{Ponto 7}}) = 0,004276646 \mu\text{g mL}^{-1}$$

4. Incerteza da curva analítica

Grandezas de entrada: área das amostras, área do branco, soluções da curva analítica, áreas referentes às soluções da curva analítica.

Incerteza combinada da curva analítica

$$u_c (\text{Curva analítica}) = 0,049477379 \mu\text{g mL}^{-1}$$

5. Incerteza da recuperação

Grandezas de entrada: concentração da solução padrão e resultado da solução encontrada.

Incerteza combinada da recuperação

$$u_c (\text{recuperação}) = 0,0031 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(C_{\text{real}}) = 0,002337 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(C_{\text{obtida}}) = 0,002002082 \mu\text{g mL}^{-1}$$

Cálculo da incerteza de medição para o 4-nitrofenol

1. Incerteza da solução estoque

Grandezas de entrada: pureza do padrão (a solução padrão foi adicionada diretamente na solução de trabalho)

$$u(P) = 0,005773503 \mu\text{g mL}^{-1}$$

2. Incerteza da solução trabalho

Grandezas de entrada: incerteza da solução estoque, volume pipetado da solução estoque e volume final da solução trabalho.

$$u(C_{\text{sol. estoque}}) = 0,005773503 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(V_{\text{pipetado}}) = 0,000100184 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 8,66025\text{E-}05$$

$$\text{repetitividade} = 0,00005$$

$$\Delta t = 6,06218\text{E-}06$$

$$u(V_{\text{FINAL}}) = 0,012033426 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 0,011547005$$

$$\text{repetitividade} = 0,003162278$$

$$\Delta t = 0,001212436$$

Incerteza Combinada

$$u_c(\text{Solução}_{\text{Fenol}}) = 0,023255629 \mu\text{g mL}^{-1}$$

3. Incertezas das soluções de calibração para a curva analítica

Grandezas de entrada: incerteza da solução trabalho, incerteza do volume pipetado e incerteza dos balões volumétricos utilizados.

Incerteza dos volumes pipetados

- Ponto 1

$$u(V_{\text{PONTO 1}}) = 8,67489\text{E-}05 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 8,66025\text{E-}05$$

$$\text{repetitividade} = 0,000005$$

$$\Delta t = 6,06218\text{E-}07$$

- Ponto 2

$$u(V_{\text{PONTO 3}}) = 5,86072\text{E-}05 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 5,7735\text{E-}05$$

$$\text{repetitividade} = 0,00001$$

$$\Delta t = 1,21244\text{E-}06$$

- Ponto 3

$$u(V_{\text{PONTO 4}}) = 8,79108\text{E-}05 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 8,66025\text{E-}05$$

$$\text{repetitividade} = 0,000015$$

$$\Delta t = 1,81865\text{E-}06$$

- Ponto 4

$$u(V_{\text{PONTO 5}}) = 0,000117214 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 0,00011547$$

$$\text{repetitividade} = 0,00002$$

$$\Delta t = 2,42487\text{E-}06$$

- Ponto 5

$$u(V_{\text{PONTO 6}}) = 0,000520493 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 0,000519615$$

$$\text{repetitividade} = 0,00003$$

$$\Delta t = 3,63731\text{E-}06$$

- Ponto 6
 $u(V_{\text{PONTO 7}}) = 0,000693991 \mu\text{g mL}^{-1}$
 calibração = 0,00069282
 repetitividade = 0,00004
 $\Delta t = 4,84974\text{E-}06$
- Ponto 7
 $u(V_{\text{PONTO 8}}) = 0,000293036 \mu\text{g mL}^{-1}$
 calibração = 0,000288675
 repetitividade = 0,00005
 $\Delta t = 6,06218\text{E-}06$

Incerteza Combinada das soluções da curva analítica

$$\begin{aligned} u_c(\text{Curva}_{\text{Ponto 1}}) &= 0,000917109 \mu\text{g mL}^{-1} \\ u_c(\text{Curva}_{\text{Ponto 2}}) &= 0,000851053 \mu\text{g mL}^{-1} \\ u_c(\text{Curva}_{\text{Ponto 3}}) &= 0,001276579 \mu\text{g mL}^{-1} \\ u_c(\text{Curva}_{\text{Ponto 4}}) &= 0,001702105 \mu\text{g mL}^{-1} \\ u_c(\text{Curva}_{\text{Ponto 5}}) &= 0,005502655 \mu\text{g mL}^{-1} \\ u_c(\text{Curva}_{\text{Ponto 6}}) &= 0,007336874 \mu\text{g mL}^{-1} \\ u_c(\text{Curva}_{\text{Ponto 7}}) &= 0,004255263 \mu\text{g mL}^{-1} \end{aligned}$$

4. Incerteza da curva analítica

Grandezas de entrada: área das amostras, área do branco, soluções da curva analítica, áreas referentes às soluções da curva analítica.

Incerteza combinada da curva analítica

$$u_c(\text{Curva analítica}) = 0,071259 \mu\text{g mL}^{-1}$$

5. Incerteza da recuperação

Grandezas de entrada: concentração da solução padrão e resultado da solução encontrada.

Incerteza combinada da recuperação

$$\begin{aligned} u_c(\text{recuperação}) &= 0,0045 \mu\text{g mL}^{-1} \\ u(C_{\text{real}}) &= 0,002337249 \mu\text{g mL}^{-1} \\ u(C_{\text{obtida}}) &= 0,003838049 \mu\text{g mL}^{-1} \end{aligned}$$

Cálculo da incerteza de medição para o 2,4-diclorofenol

1. Incerteza da solução estoque

Grandezas de entrada: pureza do padrão (a solução padrão foi adicionada diretamente na solução de trabalho)

$$u(P) = 0,005773503 \mu\text{g mL}^{-1}$$

2. Incerteza da solução trabalho

Grandezas de entrada: incerteza da solução estoque, volume pipetado da solução estoque e volume final da solução trabalho.

$$u(C_{\text{sol. estoque}}) = 0,005773503 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(V_{\text{pipetado}}) = 0,000100184 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 8,66025\text{E-}05$$

$$\text{repetitividade} = 0,00005$$

$$\Delta t = 6,06218\text{E-}06$$

$$u(V_{\text{FINAL}}) = 0,012033426 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 0,011547005$$

$$\text{repetitividade} = 0,003162278$$

$$\Delta t = 0,001212436$$

Incerteza Combinada

$$u_c(\text{Solução}_{\text{Fenol}}) = 0,023606216 \mu\text{g mL}^{-1}$$

3. Incertezas das soluções de calibração para a curva analítica

Grandezas de entrada: incerteza da solução trabalho, incerteza do volume pipetado e incerteza dos balões volumétricos utilizados.

Incerteza dos volumes pipetados

- Ponto 1

$$u(V_{\text{PONTO 1}}) = 8,67489\text{E-}05 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 8,66025\text{E-}05$$

$$\text{repetitividade} = 0,000005$$

$$\Delta t = 6,06218\text{E-}07$$

- Ponto 2

$$u(V_{\text{PONTO 3}}) = 5,86072\text{E-}05 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 5,7735\text{E-}05$$

$$\text{repetitividade} = 0,00001$$

$$\Delta t = 1,21244\text{E-}06$$

- Ponto 3

$$u(V_{\text{PONTO 4}}) = 8,79108\text{E-}05 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 8,66025\text{E-}05$$

$$\text{repetitividade} = 0,000015$$

$$\Delta t = 1,81865\text{E-}06$$

- Ponto 4

$$u(V_{\text{PONTO } 5}) = 0,000117214 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 0,00011547$$

$$\text{repetitividade} = 0,00002$$

$$\Delta t = 2,42487\text{E-}06$$

- Ponto 5

$$u(V_{\text{PONTO } 6}) = 0,000520493 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 0,000519615$$

$$\text{repetitividade} = 0,00003$$

$$\Delta t = 3,63731\text{E-}06$$

- Ponto 6

$$u(V_{\text{PONTO } 7}) = 0,000693991 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 0,00069282$$

$$\text{repetitividade} = 0,00004$$

$$\Delta t = 4,84974\text{E-}06$$

- Ponto 7

$$u(V_{\text{PONTO } 8}) = 0,000293036 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 0,000288675$$

$$\text{repetitividade} = 0,00005$$

$$\Delta t = 6,06218\text{E-}06$$

Incerteza Combinada das soluções da curva analítica

$$u_c (\text{Curva}_{\text{Ponto } 1}) = 0,000930935 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u_c (\text{Curva}_{\text{Ponto } 2}) = 0,000863882 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u_c (\text{Curva}_{\text{Ponto } 3}) = 0,001295824 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u_c (\text{Curva}_{\text{Ponto } 4}) = 0,001727765 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u_c (\text{Curva}_{\text{Ponto } 5}) = 0,005585610 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u_c (\text{Curva}_{\text{Ponto } 6}) = 0,007447480 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u_c (\text{Curva}_{\text{Ponto } 7}) = 0,004319412 \mu\text{g mL}^{-1}$$

4. Incerteza da curva analítica

Grandezas de entrada: área das amostras, área do branco, soluções da curva analítica, áreas referentes às soluções da curva analítica.

Incerteza combinada da curva analítica

$$u_c (\text{Curva analítica}) = 0,0532 \mu\text{g mL}^{-1}$$

5. Incerteza da recuperação

Grandezas de entrada: concentração da solução padrão e resultado da solução encontrada.

Incerteza combinada da recuperação

$$u_c (\text{recuperação}) = 0,0077 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(C_{\text{real}}) = 0,002337249 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(C_{\text{obtida}}) = 0,007293766 \mu\text{g mL}^{-1}$$

Cálculo da incerteza de medição para o 4-cloro-3-metilfenol

1. Incerteza da solução estoque

Grandezas de entrada: pureza do padrão (a solução padrão foi adicionada diretamente na solução de trabalho)

$$u(P) = 0,005773503 \mu\text{g mL}^{-1}$$

2. Incerteza da solução trabalho

Grandezas de entrada: incerteza da solução estoque, volume pipetado da solução estoque e volume final da solução trabalho.

$$u(C_{\text{sol. estoque}}) = 0,005773503 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(V_{\text{pipetado}}) = 0,000100184 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 8,66025\text{E-}05$$

$$\text{repetitividade} = 0,00005$$

$$\Delta t = 6,06218\text{E-}06$$

$$u(V_{\text{FINAL}}) = 0,012033426 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 0,011547005$$

$$\text{repetitividade} = 0,003162278$$

$$\Delta t = 0,001212436$$

Incerteza Combinada

$$u_c(\text{Solução}_{\text{Fenol}}) = 0,023606216 \mu\text{g mL}^{-1}$$

3. Incertezas das soluções de calibração para a curva analítica

Grandezas de entrada: incerteza da solução trabalho, incerteza do volume pipetado e incerteza dos balões volumétricos utilizados.

Incerteza dos volumes pipetados

- Ponto 1

$$u(V_{\text{PONTO 1}}) = 8,67489\text{E-}05 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 8,66025\text{E-}05$$

$$\text{repetitividade} = 0,000005$$

$$\Delta t = 6,06218\text{E-}07$$

- Ponto 2

$$u(V_{\text{PONTO 3}}) = 5,86072\text{E-}05 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 5,7735\text{E-}05$$

repetitividade = 0,00001

$\Delta t = 1,21244\text{E-}06$

- Ponto 3

$u(V_{\text{PONTO } 4}) = 8,79108\text{E-}05 \mu\text{g mL}^{-1}$

calibração = 8,66025E-05

repetitividade = 0,000015

$\Delta t = 1,81865\text{E-}06$

- Ponto 4

$u(V_{\text{PONTO } 5}) = 0,000117214 \mu\text{g mL}^{-1}$

calibração = 0,00011547

repetitividade = 0,00002

$\Delta t = 2,42487\text{E-}06$

- Ponto 5

$u(V_{\text{PONTO } 6}) = 0,000520493 \mu\text{g mL}^{-1}$

calibração = 0,000519615

repetitividade = 0,00003

$\Delta t = 3,63731\text{E-}06$

- Ponto 6

$u(V_{\text{PONTO } 7}) = 0,000693991 \mu\text{g mL}^{-1}$

calibração = 0,00069282

repetitividade = 0,00004

$\Delta t = 4,84974\text{E-}06$

- Ponto 7

$u(V_{\text{PONTO } 8}) = 0,000293036 \mu\text{g mL}^{-1}$

calibração = 0,000288675

repetitividade = 0,00005

$\Delta t = 6,06218\text{E-}06$

Incerteza Combinada das soluções da curva analítica

$u_c(\text{Curva}_{\text{Ponto } 1}) = 0,000930935 \mu\text{g mL}^{-1}$

$u_c(\text{Curva}_{\text{Ponto } 2}) = 0,000863882 \mu\text{g mL}^{-1}$

$u_c(\text{Curva}_{\text{Ponto } 3}) = 0,001295824 \mu\text{g mL}^{-1}$

$u_c(\text{Curva}_{\text{Ponto } 4}) = 0,001727765 \mu\text{g mL}^{-1}$

$u_c(\text{Curva}_{\text{Ponto } 5}) = 0,005585610 \mu\text{g mL}^{-1}$

$u_c(\text{Curva}_{\text{Ponto } 6}) = 0,007447480 \mu\text{g mL}^{-1}$

$u_c(\text{Curva}_{\text{Ponto } 7}) = 0,004319412 \mu\text{g mL}^{-1}$

4. Incerteza da curva analítica

Grandezas de entrada: área das amostras, área do branco, soluções da curva analítica, áreas referentes às soluções da curva analítica.

Incerteza combinada da curva analítica

$$u_c (\text{Curva analítica}) = 0,055910896 \mu\text{g mL}^{-1}$$

5. Incerteza da recuperação

Grandezas de entrada: concentração da solução padrão e resultado da solução encontrada.

Incerteza combinada da recuperação

$$u_c (\text{recuperação}) = 0,0048 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(C_{\text{real}}) = 0,002337249 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(C_{\text{obtida}}) = 0,0041437 \mu\text{g mL}^{-1}$$

Cálculo da incerteza de medição para o 2,4,6-triclorofenol

1. Incerteza da solução estoque

Grandezas de entrada: pureza do padrão (a solução padrão foi adicionada diretamente na solução de trabalho)

$$u(P) = 0,005773503 \mu\text{g mL}^{-1}$$

2. Incerteza da solução trabalho

Grandezas de entrada: incerteza da solução estoque, volume pipetado da solução estoque e volume final da solução trabalho.

$$u(C_{\text{sol. estoque}}) = 0,011547005 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(V_{\text{pipetado}}) = 0,000100184 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 8,66025\text{E-}05$$

$$\text{repetitividade} = 0,00005$$

$$\Delta t = 6,06218\text{E-}06$$

$$u(V_{\text{FINAL}}) = 0,012033426 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 0,011547005$$

$$\text{repetitividade} = 0,003162278$$

$$\Delta t = 0,001212436$$

Incerteza Combinada

$$u_c (\text{Solução}_{\text{Fenol}}) = 0,023255629 \mu\text{g mL}^{-1}$$

3. Incertezas das soluções de calibração para a curva analítica

Grandezas de entrada: incerteza da solução trabalho, incerteza do volume pipetado e incerteza dos balões volumétricos utilizados.

Incerteza dos volumes pipetados

- Ponto 1
 $u(V_{\text{PONTO 1}}) = 8,67489\text{E-}05 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$
calibração = 8,66025E-05
repetitividade = 0,000005
 $\Delta t = 6,06218\text{E-}07$
- Ponto 2
 $u(V_{\text{PONTO 3}}) = 5,86072\text{E-}05 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$
calibração = 5,7735E-05
repetitividade = 0,00001
 $\Delta t = 1,21244\text{E-}06$
- Ponto 3
 $u(V_{\text{PONTO 4}}) = 8,79108\text{E-}05 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$
calibração = 8,66025E-05
repetitividade = 0,000015
 $\Delta t = 1,81865\text{E-}06$
- Ponto 4
 $u(V_{\text{PONTO 5}}) = 0,000117214 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$
calibração = 0,00011547
repetitividade = 0,00002
 $\Delta t = 2,42487\text{E-}06$
- Ponto 5
 $u(V_{\text{PONTO 6}}) = 0,000520493 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$
calibração = 0,000519615
repetitividade = 0,00003
 $\Delta t = 3,63731\text{E-}06$
- Ponto 6
 $u(V_{\text{PONTO 7}}) = 0,000693991 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$
calibração = 0,00069282
repetitividade = 0,00004
 $\Delta t = 4,84974\text{E-}06$
- Ponto 7
 $u(V_{\text{PONTO 8}}) = 0,000293036 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$
calibração = 0,000288675
repetitividade = 0,00005
 $\Delta t = 6,06218\text{E-}06$

Incerteza Combinada das soluções da curva analítica

$$u_c (\text{Curva}_{\text{Ponto 1}}) = 0,000917109 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u_c (\text{Curva}_{\text{Ponto 2}}) = 0,000851053 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u_c (\text{Curva}_{\text{Ponto 3}}) = 0,001276579 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u_c (\text{Curva}_{\text{Ponto 4}}) = 0,001702105 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u_c (\text{Curva}_{\text{Ponto 5}}) = 0,005502655 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u_c (\text{Curva}_{\text{Ponto 6}}) = 0,007336874 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u_c (\text{Curva}_{\text{Ponto 7}}) = 0,004255263 \mu\text{g mL}^{-1}$$

4. Incerteza da curva analítica

Grandezas de entrada: área das amostras, área do branco, soluções da curva analítica, áreas referentes às soluções da curva analítica.

Incerteza combinada da curva analítica

$$u_c (\text{Curva analítica}) = 0,030370758 \mu\text{g mL}^{-1}$$

5. Incerteza da recuperação

Grandezas de entrada: concentração da solução padrão e resultado da solução encontrada.

Incerteza combinada da recuperação

$$u_c (\text{recuperação}) = 0,0073 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(C_{\text{real}}) = 0,002337249 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(C_{\text{obtida}}) = 0,006888252 \mu\text{g mL}^{-1}$$

Cálculo da incerteza de medição para o Pentaclorofenol**1. Incerteza da solução estoque**

Grandezas de entrada: pureza do padrão (a solução padrão foi adicionada diretamente na solução de trabalho)

$$u(P) = 0,005773503 \mu\text{g mL}^{-1}$$

2. Incerteza da solução trabalho

Grandezas de entrada: incerteza da solução estoque, volume pipetado da solução estoque e volume final da solução trabalho.

$$u(C_{\text{sol. estoque}}) = 0,005773503 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(V_{\text{pipetado}}) = 0,000100184 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 8,66025\text{E-}05$$

$$\text{repetitividade} = 0,00005$$

$$\Delta t = 6,06218\text{E-}06$$

$$u(V_{\text{FINAL}}) = 0,012033426 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 0,011547005$$

$$\text{repetitividade} = 0,003162278$$

$$\Delta t = 0,001212436$$

Incerteza Combinada

$$u_c(\text{Solução}_{\text{Fenol}}) = 0,023255629 \mu\text{g mL}^{-1}$$

3. Incertezas das soluções de calibração para a curva analítica

Grandezas de entrada: incerteza da solução trabalho, incerteza do volume pipetado e incerteza dos balões volumétricos utilizados.

Incerteza dos volumes pipetados

- Ponto 1

$$u(V_{\text{PONTO 1}}) = 8,67489\text{E-}05 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 8,66025\text{E-}05$$

$$\text{repetitividade} = 0,000005$$

$$\Delta t = 6,06218\text{E-}07$$

- Ponto 2

$$u(V_{\text{PONTO 2}}) = 5,86072\text{E-}05 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 5,7735\text{E-}05$$

$$\text{repetitividade} = 0,00001$$

$$\Delta t = 1,21244\text{E-}06$$

- Ponto 3

$$u(V_{\text{PONTO 3}}) = 8,79108\text{E-}05 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 8,66025\text{E-}05$$

$$\text{repetitividade} = 0,000015$$

$$\Delta t = 1,81865\text{E-}06$$

- Ponto 4

$$u(V_{\text{PONTO 4}}) = 0,000117214 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 0,00011547$$

$$\text{repetitividade} = 0,00002$$

$$\Delta t = 2,42487\text{E-}06$$

- Ponto 5

$$u(V_{\text{PONTO 5}}) = 0,000520493 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 0,000519615$$

$$\text{repetitividade} = 0,00003$$

$$\Delta t = 3,63731\text{E-}06$$

- Ponto 6

$$u(V_{\text{PONTO 6}}) = 0,000693991 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 0,00069282$$

$$\text{repetitividade} = 0,00004$$

$$\Delta t = 4,84974\text{E-}06$$

- Ponto 7

$$u(V_{\text{PONTO 7}}) = 0,000293036 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 0,000288675$$

$$\text{repetitividade} = 0,00005$$

$$\Delta t = 6,06218\text{E-}06$$

Incerteza Combinada das soluções da curva analítica

$$u_c (\text{Curva}_{\text{Ponto 1}}) = 0,000917109 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u_c (\text{Curva}_{\text{Ponto 2}}) = 0,000851053 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u_c (\text{Curva}_{\text{Ponto 3}}) = 0,001276579 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u_c (\text{Curva}_{\text{Ponto 4}}) = 0,001702105 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u_c (\text{Curva}_{\text{Ponto 5}}) = 0,005502655 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u_c (\text{Curva}_{\text{Ponto 6}}) = 0,007336874 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u_c (\text{Curva}_{\text{Ponto 7}}) = 0,004255263 \mu\text{g mL}^{-1}$$

4. Incerteza da curva analítica

Grandezas de entrada: área das amostras, área do branco, soluções da curva analítica, áreas referentes às soluções da curva analítica.

Incerteza combinada da curva analítica

$$u_c (\text{Curva analítica}) = 0,036767078 \mu\text{g mL}^{-1}$$

5. Incerteza da recuperação

Grandezas de entrada: concentração da solução padrão e resultado da solução encontrada.

Incerteza combinada da recuperação

$$u_c (\text{recuperação}) = 0,0039 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(C_{\text{real}}) = 0,002337249 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(C_{\text{obtida}}) = 0,003077527 \mu\text{g mL}^{-1}$$

12 APÊNDICE 2

Cálculo das incertezas realizado pelo software

O cálculo do valor da incerteza de medição do presente trabalho foi realizado manualmente e utilizando o software desenvolvido, a fim de testar a veracidade dos dados gerados pelo mesmo. Nessa seção, são apresentadas as telas de estimativa da incerteza para o Fenol, porém, este processo foi realizado para todos os compostos estudados.

1. Incerteza da solução estoque e da solução trabalho

Grandezas de entrada: pureza do padrão incerteza da solução estoque, volume pipetado da solução estoque e volume final da solução trabalho.

The screenshot shows a software window titled "Avaliação da Incerteza - Solução Trabalho / Pureza do Padrão". It contains the following fields and values:

- Concentração Solução Estoque (ppm): 1990
- Pureza (%): 98
- Concentração Solução Trabalho (ppm): 10
- Grandezas de Entrada:
 - Volume Pipetado: 0,05 mL
 - u (Calibração): 0,000086602 mL
 - u (Vrepe): 0,00005 mL (highlighted with a red circle)
 - Volume Final: 10 mL
 - u (Vrepe): 0,03162278 mL (highlighted with a red circle)
 - u (Calibração): 0,011547005 mL
- Uncertainty - Variation of Temperature:
 - Temperatura: 20 °C ± 1 °C
 - u (T): 0,5773503 °C
- Buttons: "Calcular Diluição" (highlighted with a blue circle), "Calcular", "Ajuda", and "Prosseguir".
- Uncertainty Standard of the Stock Solution:
 - u(P): 0,005773503 ppm
- Uncertainty Standard of the Working Solution:
 - u: 0,023255629 ppm

Figura 45: Tela com as grandezas de entrada da incerteza da solução trabalho e pureza do padrão.

Para que o software reconheça o valor da incerteza tipo A declarado, o usuário deve clicar no botão marcado com o círculo vermelho na FIG. 45. Caso o usuário queira calcular os volumes necessários ou a concentração obtida, o software oferece a opção de "Calcular Diluição", acessada ao clicar no botão marcado com o círculo azul. Ao clicar nesse botão é apresentada a tela demonstrada na FIG. 46.

Cálculo da Diluição

Variáveis

Concentração Inicial: Incógnita ☐

Volume Inicial: ☐

Concentração Final: ☐

Volume Final: ☐

Resposta

Valor da incógnita:

Figura 46: Tela opcional para o cálculo da diluição da solução trabalho.

2. Incertezas da curva analítica

Grandezas de entrada: incerteza da solução trabalho, incerteza do volume pipetado, incerteza dos balões volumétricos utilizados no preparo da curva, área das amostras, área do branco, soluções da curva analítica, áreas referentes às soluções da curva analítica.

A declaração das grandezas de entrada para a avaliação da incerteza da curva analítica é realizada em varias etapas. Inicialmente, o usuário cadastra as pipetas utilizadas e as incertezas da pipeta (incerteza de calibração e incerteza da repetitividade). As vidrarias utilizadas no preparo da curva analítica são cadastradas por nível de concentração, e dessa forma, o software associa a incerteza específica de cada vidraria no ponto preparado. O nível de concentração é selecionado no campo marcado com o círculo vermelho, por meio de uma barra de rolagem.

Avaliação da Incerteza - Curva Analítica

Instrumentos Utilizados | Soluções de Calibração | Áreas | Incertezas

Pipetas Utilizadas

	Incerteza - Calibração	Incerteza - Repetitividade
☒ Pipeta 1	0,01 mL	0,001 mL
☒ Pipeta 2	0,03 mL	0,001 mL
☐ Pipeta 3	<input type="text"/> mL	<input type="text"/> mL
☐ Pipeta 4	<input type="text"/> mL	<input type="text"/> mL

Vidraria Utilizada

Vidraria: Incerteza - Calibração:

Volume: mL Incerteza - Repetitividade:

Nível de Concentração:

Figura 47: Tela cadastramento dos instrumentos volumétricos utilizados e suas respectivas incertezas.

Em seguida, o usuário declara o valor dos níveis de concentração em partes por milhão (ppm), os volumes pipetados por nível de concentração e a pipeta utilizada. A pipeta utilizada é selecionada em uma lista pré-cadastrada, conforme observado na marcação da FIG. 48. Caso o usuário selecione na lista uma pipeta que não foi cadastrada na tela anterior (Figura 47), o software não permitirá a continuação do processo, informando que os dados declarados pelo usuário são insuficientes.

	Níveis de Concentração (ppm)	Volumes Pipetados (mL)	Pipeta Utilizada
1	0,05	0,005	Pipeta 1
2	0,10	0,010	Pipeta 1
3	0,15	0,015	Pipeta 1
4	0,20	0,020	Pipeta 1
5	0,30	0,030	Pipeta 2
6	0,40	0,040	Pipeta 2
7	0,50	0,050	

Limpar Cadastrar

Pipeta 1
Pipeta 2
Pipeta 3
Pipeta 4

Figura 48: Tela de declaração das grandezas de entrada das soluções utilizadas no preparo da curva analítica.

As grandezas de entrada restantes são relacionadas ao desempenho do equipamento utilizado. Nesta tela, o usuário cadastra as áreas obtidas na análise dos níveis de concentração estabelecidos, assim como as áreas do branco, as áreas da amostra avaliada e a quantidade de replicatas realizadas no ensaio. Nesta etapa optou-se por automatizar o processo de cadastramento, ao invés de desenvolver uma tela na qual o usuário cadastrasse todos os valores ao mesmo tempo visando à obtenção de um *layout* mais simples e menos confuso. Esta tela é apresentada na FIG. 49.

Avaliação da Incerteza - Curva Analítica

Instrumentos Utilizados | Soluções de Calibração | **Áreas** | Incertezas

Áreas dos Níveis de Concentração

Nível de Concentração	Replicata	Área
Nível de Concentração 1	1	54555

Área do Branco: 3750, Replicata: 1

Área da Amostra: 41057, Replicata: 2

Resolução do Equipamento: 0,1918

Ajuda | Prosseguir

Figura 49: Tela de declaração das grandezas de entrada relacionadas ao equipamento utilizado.

Todas as incertezas padrão obtidas, incluindo as incertezas dos volumes pipetados e a incerteza de cada nível de concentração, assim como a incerteza padrão da curva analítica são apresentadas para o usuário em uma tela demonstrada na FIG. 50.

Avaliação da Incerteza - Curva Analítica

Instrumentos Utilizados | Soluções de Calibração | Áreas | **Incertezas**

Incerteza - Preparo das Soluções Utilizadas

Níveis de Concentração	u (Volumes pipetados)	u (Soluções de calibração)
0,05 ppm	0,00008674 ppm	0,000917109 ppm
0,10 ppm	0,000058607 ppm	0,000851053 ppm
0,15 ppm	0,000087908 ppm	0,001276579 ppm
0,20 ppm	0,000117214 ppm	0,001702105 ppm
0,30 ppm	0,000520493 ppm	0,005502655 ppm
0,40 ppm	0,000693991 ppm	0,007336874 ppm
0,50 ppm	0,000293036 ppm	0,004255263 ppm

Incerteza - Curva Analítica

u (Curva) = 0,03874 ppm

Sobre Incerteza | Prosseguir

Figura 50: Incertezas da curva de calibração.

3. Incerteza da recuperação

Grandezas de entrada: concentração da solução padrão e resultado da solução encontrada.

O ensaio de recuperação é, normalmente, realizado em três concentrações distintas, e assim, existem três valores de incerteza. Porém, para a avaliação da incerteza total do processo, é utilizado apenas um valor de incerteza que por conveniência, normalmente é escolhido o conjunto de dados com o menos desvio padrão nas medições. A tela na qual o usuário declara as grandezas de entrada relativas à recuperação fornece essa opção selecionando o conjunto de dados a ser utilizado no botão acima de cada grupo, conforme a marcação realizada na FIG. 51.

Concentrações (ppm)	0,05	0,20	0,50
Concentração - Replicata 1	0,046497	0,29681	0,50748
Concentração - Replicata 2	0,038264	0,24674	0,51247
Concentração - Replicata 3	0,043889	0,25756	0,51089
Concentração - Brancos	0,01043	0,01172	0,01009
Desvio Padrão	0,0042076	0,0263459	0,0025479

Resultados		
R =	0,0513	ppm
u (R) =	0,0036	ppm

Calcular
Ajuda
Prosseguir

Figura 51: Tela de declaração das grandezas de entrada para a estimativa da incerteza no ensaio de recuperação.

4. Incerteza Expandida

Por fim, após o software ter calculado as incertezas padrão de cada fonte, adequa-las a fim de se obter a incerteza combinada e calcular o número de graus de liberdade efetivo, o usuário seleciona o intervalo de confiança desejado e o software emite o resultado final da incerteza de medição. Esta tela é apresentada na FIG. 52.

Incerteza Expandida

Incertezas Combinadas

Incerteza - Solução Padrão: 0,023255629 ppm

Incerteza - Curva Analítica: 0,03874 ppm

Incerteza - Recuperação: 0,0036 ppm

Incerteza Expandida

☒ 95% ☐ 97,5% ☐ 99% ☐ 99,5%

U = 0,05988 ppm

Visualizar Relatório Sobre Incerteza Home

Figura 52: Tela de emissão do resultado da incerteza expandida do processo avaliado.

5. Relatório da análise

Após a emissão do resultado da incerteza de medição, o usuário tem a opção de visualizar o relatório do processo de estimativa. Apesar de não possuir um layout adequado, as informações presentes no relatório são armazenadas no computador automaticamente, e assim, o usuário pode acessá-lo sempre que desejar. A tela de visualização do relatório da análise é apresentada na FIG. 53.

Visualizar Relatório

Arquivo Formatar

Avaliacao da Incerteza - Analise 0003

- Solucao Estoque
u = 0,005773503 ppm

- Solucao Trabalho
u = 0,023255629 ppm

- Curva Analitica
u = 0,03874 ppm

- Recuperacao
Concentracao utilizada: 0,50
R = 0,0513
u = 0,0036 ppm

Incerteza Padrao Combinada
- u = 0,03055 ppm

Incerteza Expandida
- Intervalo de Confianca: 95%
- k = 1,96
- u = +- 0,05988 ppm

Figura 53: Relatório final do processo de estimativa da incerteza realizado pelo software.

13 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAUJO, P. *Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation*. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 2224 – 2234, 2009.

ATUANYA, E.I., PUROHIT, H.J., CHAKRABARTI, T. Anaerobic and aerobic biodegradation of chlorophenols onto various sorbents, **Wast Management**. v. 25, p.695-702, 2001.

ATSDR - AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicology Profile for Phenol**. Atlanta, 2008.

ATSDR - AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological Profile for Nitrophenols: 2-Nitrophenol; 4-Nitrophenol**. Atlanta, 1992.

AUCELIO, R.Q.; CUNHA, A.L.M.C.; MARQUES, F.F.C.; ZIOLLI, R.L. Uncertainties associated with signal measurements from solutions and from solid substrates using luminescence based methods. Disponível em: < <http://iopscience.iop.org/0026-1394/45/4/014> >. Acesso em: 17 de abril de 2012.

BARATTO, A.C. Measurand: a cornerstone concept in metrology. Disponível em: < <http://iopscience.iop.org/0026-1394/45/3/006> >. Acesso em: 18 de abril de 2012.

BERHANU, T.; JONSSON, J. A. *Determination of phenolic compounds in water*. In: NOLLET, L.M.L. **Handbook of water analysis**. 2 ed., p. 409 -430, 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVISA). **Resolução nº 899**. D.O.U. de 29/05/2003, Brasília, 2003.

BRASIL. Ministério do desenvolvimento urbano e meio ambiente. Conselho nacional do meio ambiente (CONAMA). **Resolução n. 357**, D.O.U. de 17/03/05, Brasília, 2005.

BRASIL. Ministério do desenvolvimento urbano e meio ambiente. Conselho nacional do meio ambiente (CONAMA). **Resolução n. 430**. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646> > Acesso em: 27 de abril de 2012.

BRITO, C.F. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em sedimentos. Avaliação da represa do Parque do Parque Pedroso, Santo André, SP.** Dissertação de mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/USP, São Paulo, 2009.

BUCHMANN, J.H.; SARKIS, J.E.S. O conceito de incerteza aplicado aos processos de medição associados à preparação de uma solução de referência para calibração. **Quim. Nova**, v. 25, n.1, p. 111-116, 2002.

CARVALHO, A.; NEVES, J. A. *Causas fundamentais das dificuldades na implementação da ISO/IEC 17025 em laboratórios de calibração.* In: **METROLOGIA.** Anais. Recife: SBM, 2003.

CESAR, I.C.; PIANETTI, G.A. *Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantitation of lumefantrine use Youden's test.* **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.45, n. 2, p.235-240, 2009.

CHUI, Q.S.H.; BARROS, C.B.; SILVA, T.D. *Parâmetros r e R obtidos de programa interlaboratorial – como usá-los.* **Química Nova**, v. 32, n. 8, 2009.

CHUI, Q.S.H. Qualidade em curvas de calibração. In: **17º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais.** Foz do Iguaçu. Brasil. 2006.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia.** Campinas: Editora Unicamp, 2006.

COX, M.G., HARRIS, P.M. Measurement uncertainty and traceability. Disponível em: < <http://iopscience.iop.org/0957-0233/17/3/S13> >. Acesso em: 02 de março de 2012.

DEJAEGER, B.; VANDER HEYDEN, Y. **Robustness Testing of CE Methods.** Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis, Volume 9, 185-224, 2008.

DHHS - Department of Health and Human Service. **Toxicological profile for cresols.** 2008a.

DHHS - Department of Health and Human Service. **Toxicological profile for pentachlorophenol**. 2008b.

DHHS - Department of Health and Human Service. **Report on Carcinogens 2,4,6-Trichlorophenol**. 11^a edition. 2001.

DHHS - Department of Health and Human Service. **Toxicological profile for chlorophenols**. 1999.

DHHS - Department of Health and Human Service. **Toxicology and Carcinogenesis Studies of 2,4-Dichlorophenol**. 1989.

DOW AGROSCIENCES. *Safe Handling Guide 2,4-Dichlorophenol*. 2000.

EA – European co-operation for Accreditation. *Guidelines on the expression of uncertainty in quantitative testing*. Disponível em: <
http://www.europeanaccreditation.org/Docs//0002_Application%20documents/0002_Application%20documents%20for%20Laboratories%20Series%204/00700_EA-4-16rev00.pdf>. Acesso em: 20 de agosto de 2012.

ESTADO DE SÃO PAULO. Constituição do Estado de São Paulo. São Paulo, 1989.

ESTADO DE SÃO PAULO. **Decreto 54.487, de 26/06/09**. Disponível em: <
<http://www.cetesb.sp.gov.br/Institucional/documentos/Dec8468.pdf>> Acesso em 17/04/2012.

FERREIRA, M.M.C.; RIBEIRO, F.A.L. Planilha de validação: Uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Quim. Nova**, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

FURUSAWA, H. A. **Validação de Ensaios Químicos**. São Paulo, IPEN-CNEN/SP, 2007 (adaptação eletrônica baseada no documento DOQ-CGCRE-008 de 01/03/2003 do INMETRO).

GALLAS, M. R. **Incerteza de Medição**. Florianópolis, 2009. Disponível em: <
<http://www.if.ufrgs.br/~marcia/medidas.pdf>> Acesso em 28/05/2012.

GALARINI, R.; PECORELLI, I.; BIBI, R.; FIORINI, L.; PIERSANTI, A. Sulfonamides residues analysis: evaluation of results dispersion at maximum residual limit by the

expanded uncertainty and 2002/657/EC decision limit approaches. **Analytical Chimica Acta**, v. 529, p. 15-20, 2005.

GONZÁLEZ, A.G.; HERRADOR, M.A. *A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles*. **Trends in Anal. Chem.**, v. 26., n. 3, 2007.

GUIA CITAC/EURACHEM. **Guia para qualidade em química analítica. Uma assistência à acreditação**. Versão Brasileira. 2002.

GUIA EURACHEM. **Determinando a incerteza na medição analítica**. 2ed. Versão Brasileira. 2002.

GUM - GUIDE EURACHEM/ CITAC. **Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement**. 3 ed. 2012.

HALL, B.D. Evaluating methods of calculation measurement uncertainty. Disponível em: < <http://iopscience.iop.org/0026-1394/45/2/N01> > . Acesso em: 17 de abril de 2012.

HARRIS, C. D. **Análise química quantitativa**. 6.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005.

HARDOCK, P. J. *The determination of measurement uncertainty in meter inter-comparisons*. Canadian School of Hydrocarbon Measurement. Measurement Canada, 2007.

HIBBERT, D.B. Systematic errors in analytical measurements results. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 25-32. 2007.

HIBERT, D. B. *Propagation of uncertainty in high-performance liquid chromatography with UV-VIS detection*. **Analytical Chimica Acta**, v. 443, p. 205-214. 2001.

HORWITZ, W.; ALBERT, R. *The Horwitz ratio (HorRat): a useful index of method performance with respect to precision*. **Journal of AOAC International**, v. 89, n. 4, 2006.

Horwitz, W. *The Variability of AOAC Methods of Analysis as Used in Analytical Pharmaceutical Chemistry*. **Journal of AOAC International**, v. 89, n. 4, p. 1095–1108, 2006.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Vocabulário internacional de termos fundamentais e gerais de metrologia.** 2^a edição. Brasil. 2000.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos.** Rio de Janeiro. DOQ-CGCRE-008. Rev. 03. Fev. 2010.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos.** Rio de Janeiro. DOQ-CGCRE-008. Rev. 01. Fev. 2003.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. NIT-DICLA-021. **Expressão da incerteza de medição.** Rev. 04 de fev. 2010.

ISO - International Organization for Standardization. **General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.** ISO/IEC 17025, 1999.

ISO - International Organization for Standardization. **Accuracy (trueness and precision) of Measurement Methods and Results - Part 2: basic method for the Determination of Repeatability and Reproducibility of a Standard Measurement Method.** ISO 5725-2. 1998.

JCGM - JOINT COMMITTEE FOR GUIDES IN METROLOGY. *Evaluation of measurement data — Supplement 1 to the “Guide to the expression of uncertainty in measurement — Propagation of distributions using a Monte Carlo method.* BIPM, IEC, IFCC, ILAC, ISO, IUPAC, IUPAP e OIML. 2008. Disponível em: < http://www.bipm.org/utils/common/documents/jcgm/JCGM_101_2008_E.pdf > Acesso em: 20 agosto de 2012.

JORNADA, D. *et al.* Implantação da norma ISO/IEC 17025 nos laboratórios da Universidade de Caxias do Sul. In: **ENQUALAB - ENCONTRO PARA A QUALIDADE DE LABORATÓRIOS.** São Paulo. Anais. São Paulo, 2008.

JORNADA, D. **Implantação de um guia orientativo de incerteza de medição para avaliadores de laboratório da rede metrológica RS.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

JORNADA, D.; JORNADA, F. Cálculo de incerteza da medição: estudo comparativo entre os métodos do GUM, de Monte Carlo e de integração numérica. In: **ENQUALAB - ENCONTRO PARA A QUALIDADE DE LABORATÓRIOS**. São Paulo. Anais. São Paulo, 2007.

KACKER, R.; SOMMER, K.D.; KESSER, R. Evolution of modern approaches to express uncertainty in measurement. Disponível em: < HTTP://IOPSCIENCE.IOP.ORG/0026-1394/44/6/011 >. Acesso em: 23 de maio de 2012.

KANE, J.S. Analytical bias: the neglected component of measurement uncertainty. **Analyst**, v. 122, p. 1283-1288, 1997.

KESSEL, R. **Een nieuwe methode voor het evalueren van onzekerheid voor complexe isotoopmetingen**. Dissertação de doutorado, University of Antwerp, Bélgica, 2003.

KRAGTEN, J. A standard scheme for calculating numerically standard deviations and confidence intervals. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 28, p. 89-97, 1995.

KROUWER, J.S. Critique of the Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement Method of Estimating and Reporting Uncertainty in Diagnostic Assays. **Clinical Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 1818-1821. 2003.

KUBOTA, L.T.; FREIRE, R.S.; DURÁN, N., ROSATTO, S.S. *Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental*. **Química Nova**, v. 24, p. 77-86. 2001.

KUNTASAL, O.O.; KARMAN, D.; WANG, D.; TUNCEL, S.G.; TUNCEL, G. Determination of volatile organic compounds in different microenvironments by multibed adsorption and short-path thermal desorption followed by gas chromatographic-mass spectrometric analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1099, p. 43-54. 2005.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RiMa, 2004.

LEITE, F. **Validação em análise química**. 5.ed. Campinas, SP: Editora Átomo, 2008.

MICHALOWICZ, J.; Duda, W. *Phenols – Source and Toxicity*. **Polish Journal of Environmental Studies**. Vol. 16, nº 3, p. 347-362. 2007.

MOREIRA, J. L. M. **Degradação de clorofenóis em efluentes**. Dissertação de mestrado, Faculdade do Porto, Portugal, 2003.

MOREIRA, D.F.; MAGALHÃES, W.F. Calculando as incertezas de diluição nas concentrações das soluções padrão usadas na calibração de um instrumento de medição analítica. **Revista Analytica**. n. 33, p. 42-50. 2008.

NAMIÉŚNIK, J.; KONIECZKA, P. *Estimating uncertainty in analytical procedures based on chromatographic techniques*. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 882-991, 2010.

NATIONAL PHYSICAL LABORATORY – NPL . **Measurement Good Practice Guide**. No. 11: A Beginner's Guide to Uncertainty of Measurement. Crown, 2ª ed. Teddington, 2001. Disponível em: < <http://www.npl.co.uk> >. Acesso em: 20 agosto de 2012.

OLIVEIRA, E.C.; AGUIAR, P.F. Comparação de diferentes abordagens para avaliação da incerteza na cromatografia do gás natural. **Quím. Nova**, v. 32, n. 6, p. 1655-1660, 2009.

OLIVEIRA, E.C.; AGUIAR, P.F. Validação da metodologia da avaliação de incerteza em curvas de calibração melhor ajustadas por polinômios de segundo grau. **Quím. Nova**, v. 32, n. 6, p. 1571-1575, 2009.

OTOMO, J.I. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de hormônios, considerados disruptores endócrinos, nas águas destinadas ao abastecimento público na região do rio Paraíba do Sul, SP**. Dissertação de mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/USP, São Paulo, 2010.

PAIVA, R.; SAIKI, M. Implantação do sistema de gestão da qualidade no Laboratório de análise por ativação neutrônica do IPEN-CNEN/SP. In: **METROLOGIA**, 2003, Recife. Anais. Recife: SBM, 2003.

PERSSON, B.; VESSMAN, J.; McDOWALL, R.D. *Questions of Quality*. **LC-GC**. n. 12, v. 18, 1998.

PETROVIC, M.; ELJARRAT, E.; Lopez de ALDA, M.J.; BARCELÓ, D. Recent advances in the mass spectrometric analysis related to endocrine disrupting compounds in aquatic environmental samples. **Journal of Chromatography A**. v.974, p.23-51, 2002.

PQMA. **Programa de Monitoramento Químico Ambiental do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares**. São Paulo, 2012.

RAMOS, A.F. **Quantificação da incerteza em medições analíticas**. Outubro, 2003.

RAMSEY, M.H. Sampling as a source of measurement uncertainty: techniques for quantification and comparison with analytical sources. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. V. 13, p. 97-104, 1998.

REZNIK, L.; DABKE, K.P. Measurement model: application of intelligent methods. **Measurement** **35**, P 47-58, 2004.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. *Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos*. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, A.S., SOUZA, J.A. *Aplicação de técnica de validação de software em laboratórios de calibração*. In: **1º Encontro da Sociedade Portuguesa de Metrologia**. Lisboa, Portugal. 2004.

RICHARDSON, S.D. Environmental mass spectrometry: emerging contaminants and current issues. **Anal. Chem.**, v. 82, n.12, p. 4742-4774, 2010.

RIUS, F.X.; MAROTO, A.; BOQUÉ, R.; RIU, J. Evaluating uncertainty in routine analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 9-10, p. 577-584, 1999.

SABIN, G.P. **Desenvolvimento e validação de método utilizando SPE e GC-MS para a determinação multirresíduo de pesticidas em água potável**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2007.

SEILER, J.P. *Pentachlorophenol*. **Mutation Research**, v. 257, p. 27-47. 1991.

SOMMER, K. D.; KOCHSIEK, M. Role of measurement uncertainty in deciding conformance in legal metrology. **OIML BULLETIN**, v. XLIII, n. 2, 2002.

SOUSA, J.A.; REYNOLDS, A.P.; DELGADO, I.S.; MARQUES, J.C.; TEIXEIRA, L.M.; JESUS, C.G. Estudo comparativo de diferentes métodos na avaliação de incertezas de medição em metrologia química. In: **2ª Conferência Nacional de Metrologia e Inovação**. Funchal, Madeira, Portugal. 2007.

SOUZA, R.R. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de disruptores endócrinos resultantes de atividades antrópicas nas águas da região do rio Paraíba do Sul, SP**. Dissertação de mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/USP, São Paulo, 2011.

STEMPNIAK, Charles R.; LANDGRAF, Wagner R. Software para Avaliar e Expressar a Incerteza de Medição. In: **ENQUALAB - ENCONTRO PARA A QUALIDADE DE LABORATÓRIOS**, São Paulo. Anais. 2006.

STEMPNIAK, C.R. *Reduzindo a incerteza de medição com a ajuda de software*. In: **Encontro para a Qualidade de Laboratórios**. São Paulo, SP. 2005. Disponível em: < <http://www.autolab.com.br/artigos/reduzindoaincerteza.ppt> >.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; FAJGELJ, A.; WILLETS, P.; WOOD, R. Harmonised guidelines for the use of recovery information in analytical measurement. *Pure e Appl. Chem.*, v. 71, n. 2, p. 337-348, 1999.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. **Drinking Water Contaminants**. National Primary Drinking Water Regulations. Disponível em: < <http://water.epa.gov/drink/contaminants/index.cfm> >. Acesso em 04 jan. 2012.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. **Method 528 –Determination of Phenols in Drinking Water by Solid-Phase Extraction and Capillary Column Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS)**. Washington, April, 2000.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. **Toxicological review of phenol**. 2002.

VALENTE, A.L.P.; AUGUSTO, F. *Microextração em fase sólida*. **Química Nova**, v. 23, n. 4, 2000.

VANDER HEYDEN, Y., QUESTIER, F., AND MASSART, D. L. *Ruggedness testing of chromatographic methods: selection of factors and levels*. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, V. 18, p. 43–56, 1998.

VANDER HEYDEN, Y.; NIJHUS, A.; SMEYERS-VERBEKE, J.;VANDEGINSTE, B.G.M.; MASSART, D.L. Guidance for robustness / ruggedness tests in method validation. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 24, p.723-753, 2001.

VEGA-BUSTILLOS, O.; SASSINE, A.; MARCH, R. A espectrometria de massas quadrupolar. São Paulo, 2001.

VIDAL, J.L.M.; LIÉBANAS, F.J.A.; GONZÁLEZ, F.J.E.; LÓPEZ, E.A.; TORRES, M.E.H., RODRÍGUEZ, L.C. Assessment of uncertainty in pesticide multiresidue analytical methods: main sources and estimation. **Analytica Chimica Acta**, v. 454, p. 297-314, 2002.

VIM - Vocabulário Internacional de Metrologia. 1ª edição Luso-Brasileira. 2012.

WILLINK, R. A generalization of the Welch–Satterthwaite formula for use with correlated uncertainty components. **Metrologia Sevres**, v. 44, p. 340-349, 2007.

WILLINK, R. What is robustness in data analysis? Disponível em: < <http://iopscience.iop.org/0026-1394/45/4/010> >. Acesso em: 10 de abril de 2012.

WILLINK, R. Estimation and uncertainty in fitting straight lines data: different techniques. Disponível em: < <http://iopscience.iop.org/0026-1394/45/3/005> >. Acesso em: 17 de abril de 2012.

WHO – World Health Organization. **Guidelines for Drinking-water Quality**. 3ed. WHO Library: Geneva, 2008.

YUWONO, M.; INDRAYANTO, G. *Gas chromatography*. In: CAZES, J. (Ed.) **Analytical Instrumentation Handbook**. 2ed. CRC Press, 2004.