

MÉTODOS DE CALIBRAÇÃO

⇒ Sinais obtidos por equipamentos e instrumentos devem ser calibrados para evitar erros nas medidas.

Calibração, de acordo com o INMETRO, é o conjunto de operações que estabelece, sob condições especificadas, a relação entre os valores indicados por um instrumento de medição ou sistemas de medição ou valores representados por uma medida materializada ou material de referência, e os valores correspondentes das grandezas estabelecidas por padrões.

MÉTODOS DE CALIBRAÇÃO

Modos de calibração:

a) *Calibração Pontual* – determina-se o valor de uma constante K com um único padrão, a qual expressa a relação entre a medida instrumental e a concentração do analito de interesse. Esta hipótese deve ser testada experimentalmente.

b) *Calibração Multipontual* – calibração com mais de dois padrões.

*O método mais empregado consiste na calibração multipontual com até 5 níveis de concentração, podendo apresentar uma relação linear (sensibilidade constante na faixa de concentração de trabalho) ou não-linear (sensibilidade é função da concentração do analito).

MÉTODOS DE CALIBRAÇÃO

Para muitos tipos de análises químicas, a resposta para o procedimento analítico deve ser avaliado para quantidades conhecidas de constituintes (chamados padrões), de forma que a resposta para uma quantidade desconhecida possa ser interpretada.

1. Curva de calibração externa ou curva analítica
2. Curva de adição de padrão
3. Padrão interno

AMOSTRA PADRÃO

É uma amostra de referência que contém o analito de interesse.

Padrão externo:

Amostra e padrão são injetados separadamente e a identificação do composto desejado é feita através da comparação de alguma característica, por exemplo, em cromatografia, tempo de retenção.

Padrão interno:

Adição de quantidade conhecida de elemento de referência nos padrões e na amostra.

BRANCO

Os brancos indicam a interferência de outras espécies na amostra e os traços de analito encontrados nos reagentes usados na preservação, preparação e análise. Medidas frequentes de brancos também permitem detectar se analitos provenientes de amostras previamente analisadas estão contaminando as novas análises, por estarem aderidos aos recipientes ou aos instrumentos.

1. Branco do método

2. Branco para reagentes

3. Branco de campo

BRANCO

Branco de método: é uma amostra que contém todos os constituintes exceto o analito, e deve ser usada durante todas as etapas do procedimento analítico.

Branco para reagente: é semelhante ao branco de método, mas ele não foi submetido a todos os procedimentos de preparo de amostra.

Branco de campo: é semelhante a um branco de método, mas ele foi exposto ao local de amostragem.

Obs.: O branco de método é a estimativa mais completa da contribuição do branco para a resposta analítica, sendo que sua resposta deve ser subtraída da resposta de uma amostra real antes de calcularmos a quantidade de analito na amostra.

CALIBRAÇÃO PONTUAL

Determinação de ácido ascórbico (vitamina C) em suco de laranja:

Branco: sinal = 0,10 unidade

Padrão: [AA] = 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$; sinal = 2,39 unidade

$$\text{sinal} = K [\text{AA}]_{\text{padrão}}$$

$$(2,39 - 0,10) = K (2)$$

$$K = 1,145 \text{ unidade L } \mu\text{mol}^{-1}$$

Amostra: [AA] = x $\mu\text{mol L}^{-1}$; sinal = 6,11 unidade

$$\text{sinal} = K [\text{AA}]_{\text{padrão}}$$

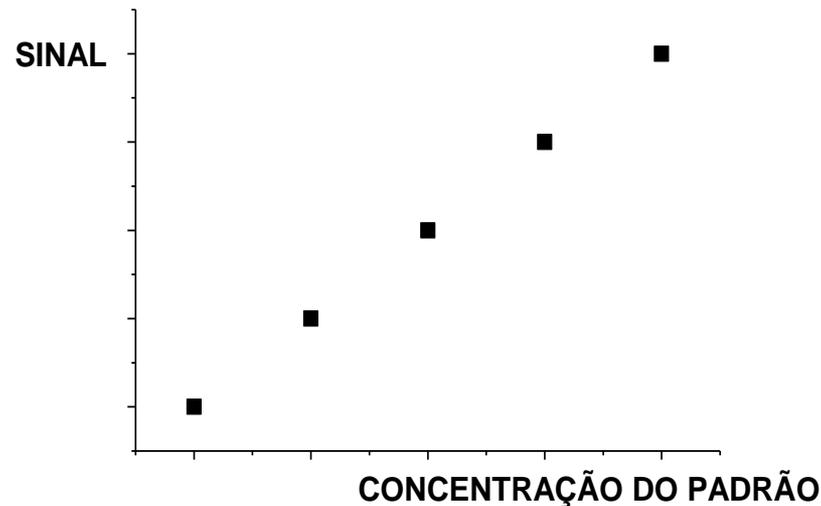
$$(6,11 - 0,10) = 1,145 [\text{AA}]$$

$$[\text{AA}] = 5,24 \mu\text{mol L}^{-1}$$



Correlação e regressão

Quando se usam métodos instrumentais, é necessário calibrar, freqüentemente, os instrumentos usando uma série de amostras (padrões), cada uma em uma concentração diferente e conhecida do analito → CURVA DE CALIBRAÇÃO EXTERNA



Dois procedimentos estatísticos devem ser aplicados à curva de calibração:

- Verificar se o gráfico é linear ou não
- Encontrar a melhor reta (ou melhor curva) que passa pelos pontos.

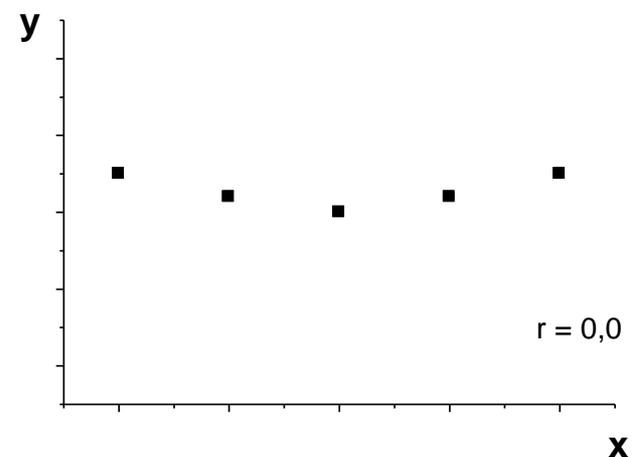
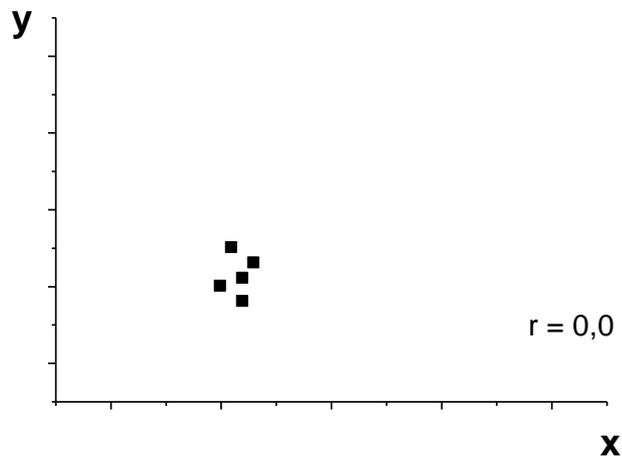
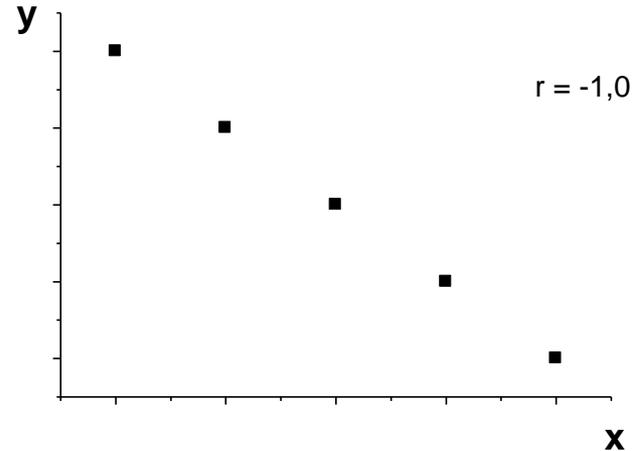
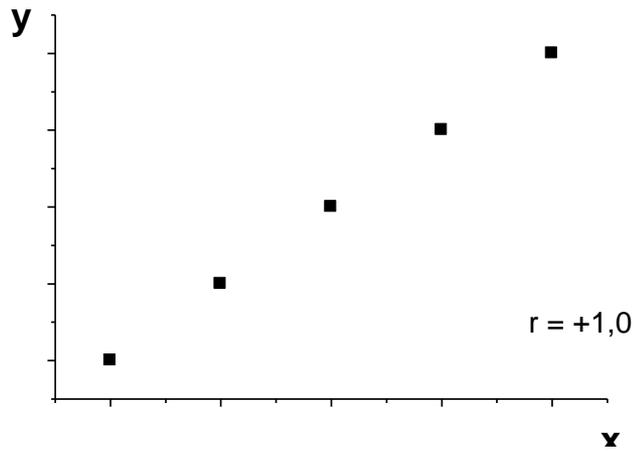
Coeficiente de correlação

Para verificar se existe uma relação linear entre duas variáveis x_1 e y_1 , usa-se o coeficiente de correlação de Pearson, r :

$$r = \frac{n \sum x_1 y_1 - \sum x_1 \sum y_1}{\left\{ \left[n \sum x_1^2 - (\sum x_1)^2 \right] \left[n \sum y_1^2 - (\sum y_1)^2 \right] \right\}^{1/2}}$$

n = número de pontos experimentais

O valor de r deve estar entre -1 e +1.



Quanto mais próximo de ± 1 , maior a probabilidade de que exista uma relação linear entre as variáveis x e y .

Valores de r que tendem a zero indicam que x e y não estão linearmente correlacionados.

Regressão linear

Determinar a melhor reta que passa pelos pontos experimentais → REGRESSÃO LINEAR OU MÉTODO DOS MÍNIMOS QUADRADOS.

A equação de uma linha reta é: $y = a + bx$

y = variável dependente

x = variável independente

b = inclinação da reta

a = intersecção no eixo dos y

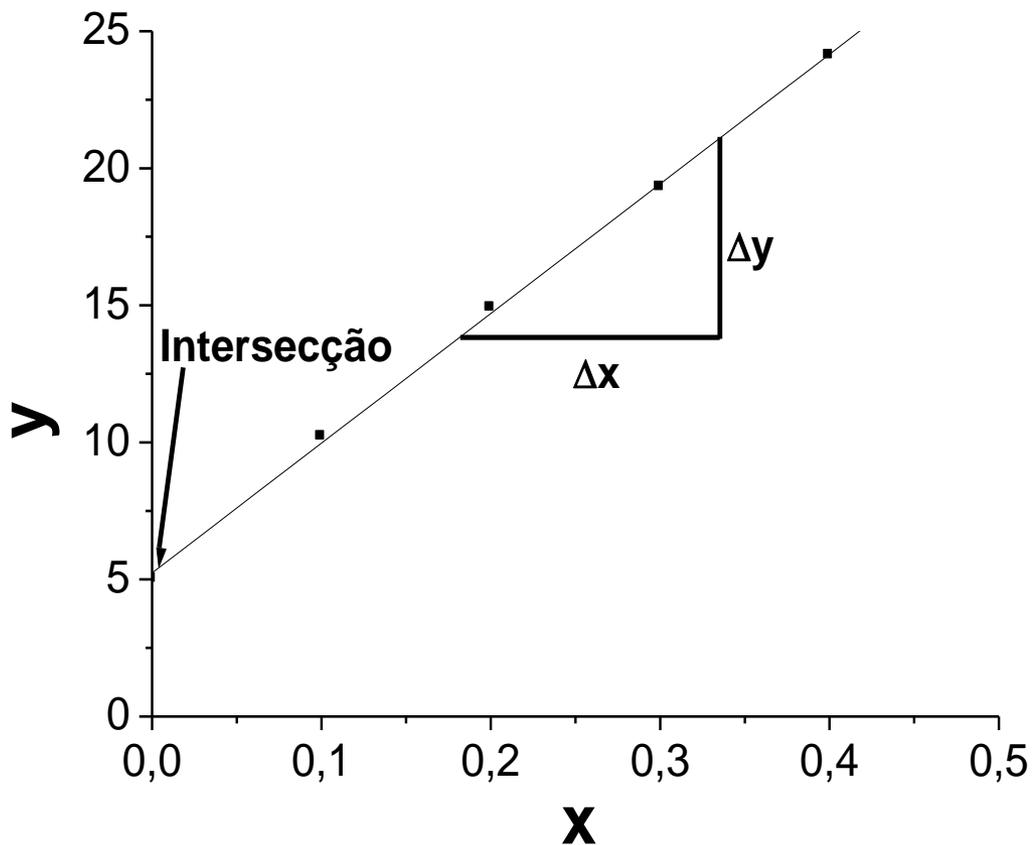
$$b = \frac{n \sum x_1 y_1 - \sum x_1 \sum y_1}{n \sum x_1^2 - (\sum x_1)^2}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

\bar{y} = média de todos os valores de y_1

\bar{x} = média de todos os valores de x_1

Pela curva de calibração



a = intersecção

b = coeficiente angular = $\Delta y / \Delta x$

Cálculo x computador

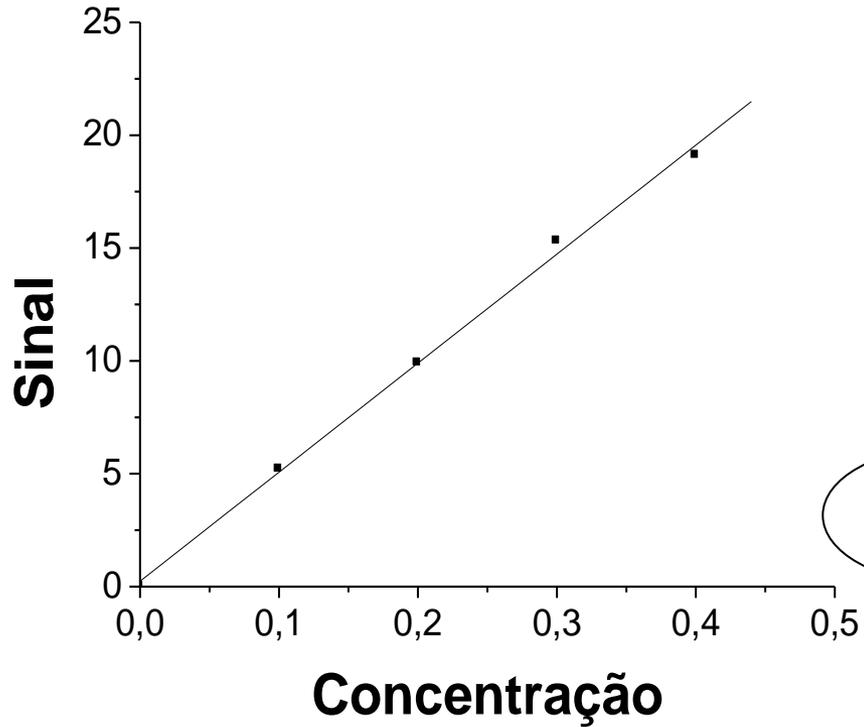
Concentração	0,00	0,10	0,20	0,30	0,40
Sinal	0,00	5,20	9,90	15,30	19,10

$$r = \frac{n \sum x_1 y_1 - \sum x_1 \sum y_1}{\sqrt{\left[n \sum x_1^2 - (\sum x_1)^2 \right] \left[n \sum y_1^2 - (\sum y_1)^2 \right]}}$$

x ₁	y ₁	x ₁ ²	y ₁ ²	x ₁ y ₁
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,10	5,20	0,01	27,04	0,52
0,20	9,90	0,04	98,01	1,98
0,30	15,30	0,09	234,09	4,59
0,40	19,10	0,16	364,81	7,64
Σx ₁ =1,00	Σy ₁ = 49,5	Σx ₁ ² = 0,30	Σy ₁ ² =723,95	Σx ₁ y ₁ =14,73

Equação → y = 0,24 + 48,3x e r = 0,9987

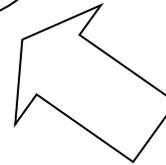
Cálculo x computador



Linear Regression for Data1_B:

$Y = A + B * X$

Parameter	Value	Error		
A	0,24	0,34957		
B	48,3	1,42712		
R	0,99869	0,45129	N	P
			5	<0.0001



Computador

Equação $\rightarrow y = 0,24 + 48,3x$ e $r = 0,9987$

Erros na inclinação e intersecção da reta

$$S_{y/x} = \sqrt{\sum (y_1 - \hat{y})^2 / (n-2)} \quad \hat{y} = \text{valores a partir da reta de regressão}$$

Desvio padrão da inclinação: $S_b = S_{y/x} / \sqrt{\sum (x_1 - \bar{x})^2}$

Desvio padrão da intersecção: $S_a = S_{y/x} \sqrt{\sum x_1^2 / n \sum (x_1 - \bar{x})^2}$

RESULTADO: $b \pm ts$ e $a \pm ts$

Erro na estimativa da concentração

$$S_{xc} = \frac{S_{y/x}}{b} \left[1 + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum (x - \bar{x})^2} \right]^{1/2}$$

Exemplo

Calcule os desvios padrões da inclinação e da intersecção da reta $y = 48,3x + 0,24$ para intervalo de confiança a 95% .

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,00	0,10	0,20	0,30	0,40
Resposta	0,00	5,20	9,90	15,30	19,10

$$S_{y/x} = \sqrt{\sum (y_1 - \hat{y})^2 / (n - 2)}$$

Desvio padrão da inclinação:

$$S_b = S_{y/x} / \sqrt{\sum (x_1 - \bar{x})^2}$$

Desvio padrão da intersecção:

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\sum x_1^2 / n \sum (x_1 - \bar{x})^2}$$

- O sucesso do método da curva de calibração é muito dependente da **exatidão** com que são conhecidas as concentrações dos padrões e quão próxima a **matriz dos padrões** está da **matriz das amostras** a serem analisadas.

- Infelizmente, estabelecer esta similaridade de matriz entre amostras complexas e padrões geralmente é difícil ou impossível de ser feita, e os efeitos da matriz levam a *erros de interferência*.

- Para minimizar os efeitos da matriz, normalmente é necessário **separar o analito do interferente** antes de obter a resposta medida do instrumento.

Método da adição de padrão

-Adições de quantidades conhecidas do analito na amostra (*spiking*)

-Elimina ou minimiza interferências introduzidas pela matriz de amostras complexas

-A matriz permanece quase inalterada após cada adição, a única diferença é concentração do analito.

$$S = \frac{kV_s c_s + kV_x c_x}{V_t}$$

S = resposta instrumental

k = constante de proporcionalidade

V_s = volume da solução padrão

c_s = concentração da solução padrão

V_x = volume da solução problema

c_x = concentração da solução problema

V_t = volume total



A equação da reta é: $y = a + bx$

y = resposta do instrumento

x = concentração da solução padrão

b = inclinação da reta

a = intersecção no eixo dos y

$$a = \frac{kV_x c_x}{V_t}$$

$$b = \frac{kV_s}{V_t}$$

Determinação da concentração por extrapolação

$$S = \frac{kV_s c_s + kV_x c_x}{V_t} = 0 \Rightarrow c_x = \frac{-(V_s)_0 c_s}{V_x}$$

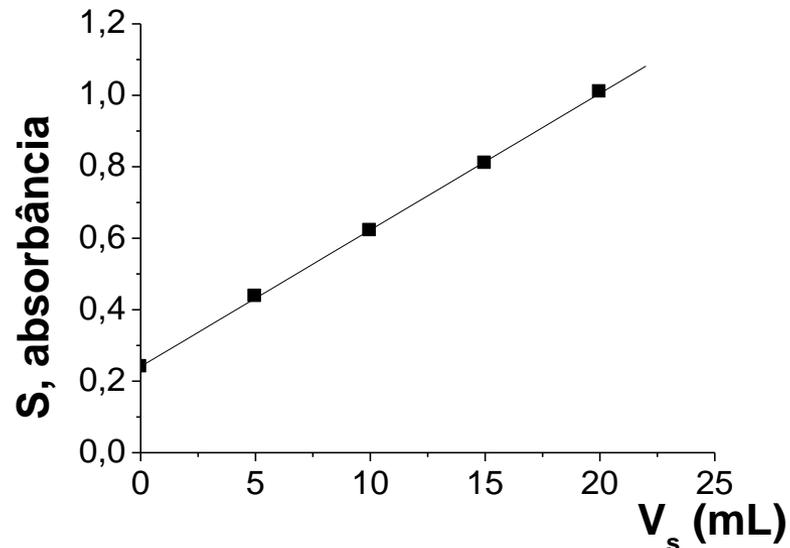
Via gráfico

Desvio padrão do valor extrapolado

$$S_{xE} = \frac{S_{y/x}}{b} \left[\frac{1}{n} + \frac{\bar{y}^{-2}}{b^2 \sum (x_1 - \bar{x})^2} \right]^{1/2}$$

Exemplo

Alíquotas de 10,00 mL de uma amostra de água natural foram pipetadas em frascos volumétricos de 50,00 mL. Exatamente 0,00, 5,00, 10,00, 15,00 e 20,00 mL de uma solução padrão contendo 11,10 ppm de Fe^{3+} foram adicionados a cada um, seguidos por um excesso de íons tiocianato para formar o complexo $\text{Fe}(\text{SCN})^{2+}$ e posterior diluição para o volume final. A resposta para cada uma das cinco soluções, medida com um colorímetro foi determinada como sendo 0,240, 0,437, 0,621, 0,809 e 1,009, respectivamente. Qual era a concentração de Fe^{3+} na amostra de água?



$$b = \frac{n \sum x_1 y_1 - \sum x_1 \sum y_1}{n \sum x_1^2 - (\sum x_1)^2}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

$$b = \frac{n \sum x_1 y_1 - \sum x_1 \sum y_1}{n \sum x_1^2 - (\sum x_1)^2}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

x_1	y_1	x_1^2	y_1^2	$x_1 y_1$
0,00	0,240	0,00	0,0576	0,00
1,11	0,437	1,23	0,1910	0,48
2,22	0,621	4,93	0,3856	1,38
3,33	0,809	11,09	0,6545	2,69
4,44	1,009	19,71	1,0181	4,48
$\Sigma x_1 = 11,1$	$\Sigma y_1 = 3,116$	$\Sigma x_1^2 = 36,96$	$\Sigma y_1^2 = 2,3068$	$\Sigma x_1 y_1 = 9,03$

$$b = \frac{n \sum x_1 y_1 - \sum x_1 \sum y_1}{n \sum x_1^2 - (\sum x_1)^2}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

x_1	y_1	x_1^2	y_1^2	$x_1 y_1$
0,00	0,240	0,00	0,0576	0,00
1,11	0,437	1,23	0,1910	0,48
2,22	0,621	4,93	0,3856	1,38
3,33	0,809	11,09	0,6545	2,69
4,44	1,009	19,71	1,0181	4,48
$\Sigma x_1 = 11,1$	$\Sigma y_1 = 3,116$	$\Sigma x_1^2 = 36,96$	$\Sigma y_1^2 = 2,3068$	$\Sigma x_1 y_1 = 9,03$

Equação $\rightarrow S = 0,24 + 0,171 [\text{Fe}^{3+}]$

Determinação da concentração por extrapolação

$$0 = 0,24 + 0,171 [\text{Fe}^{3+}] \Rightarrow [\text{Fe}^{3+}] = 1,404 \text{ ppm}$$

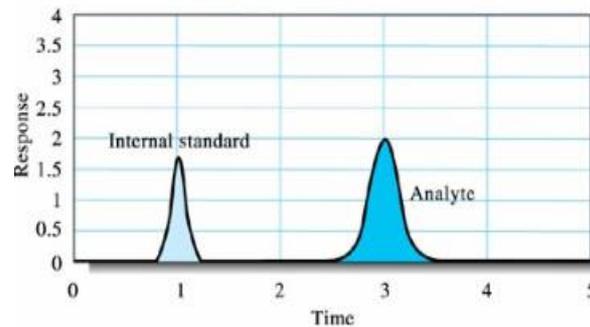
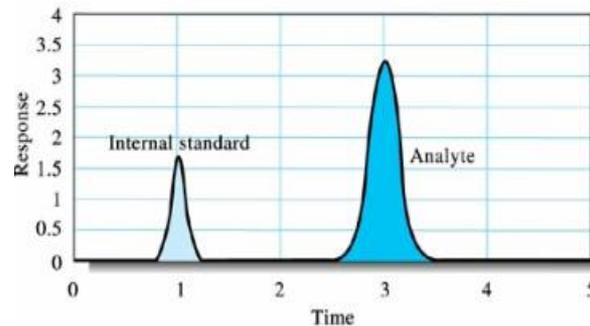
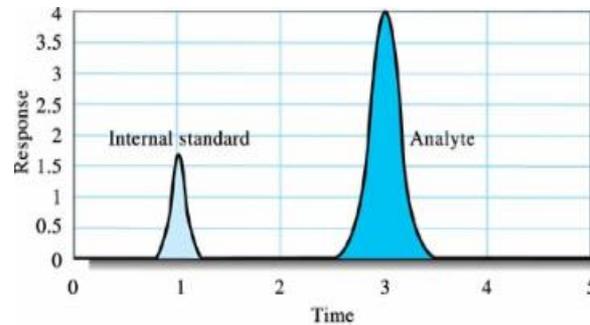
10 mL de amostra em um balão de 50,00 mL

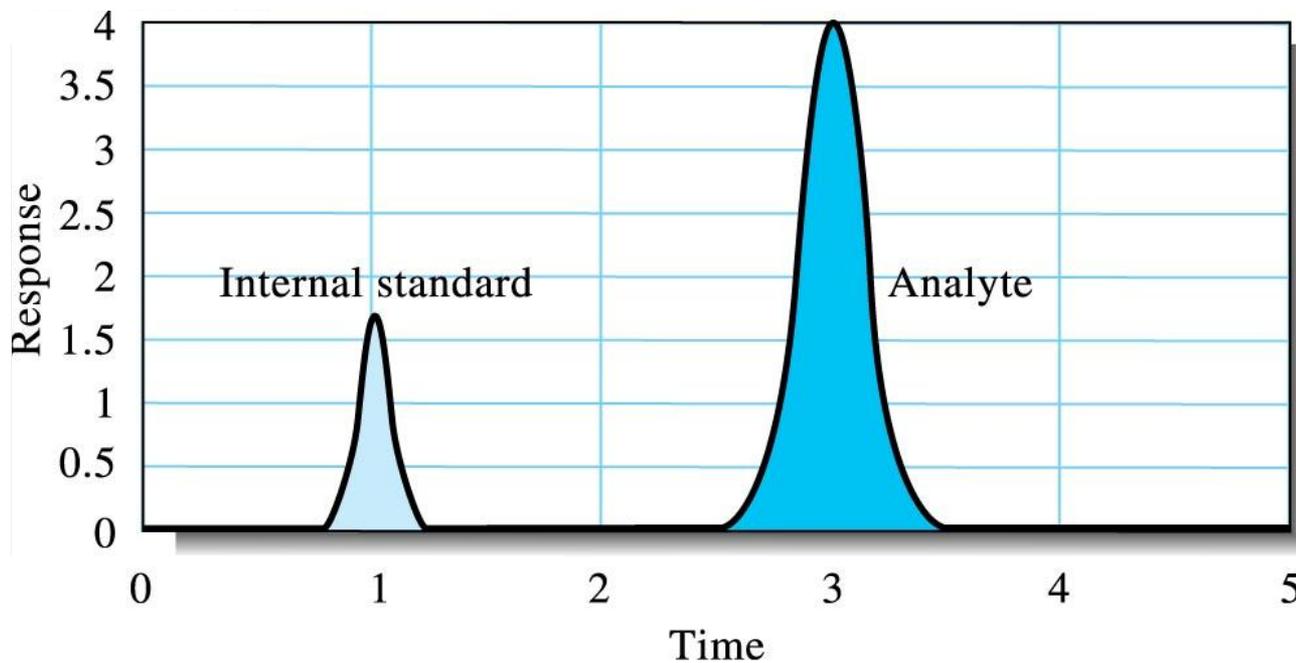
$$[\text{Fe}^{3+}] = 7,018 \text{ ppm}$$



Método do padrão interno

- Adição de quantidade conhecida de elemento de referência nos padrões e na amostra
- Corrige variações no sinal analítico devido a mudanças nas condições de análise.





© 2004 Thomson - Brooks/Cole

R = resposta

C = concentração

V = volume utilizado

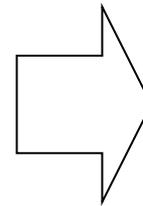
k = constante de proporcionalidade

p = padrão interno

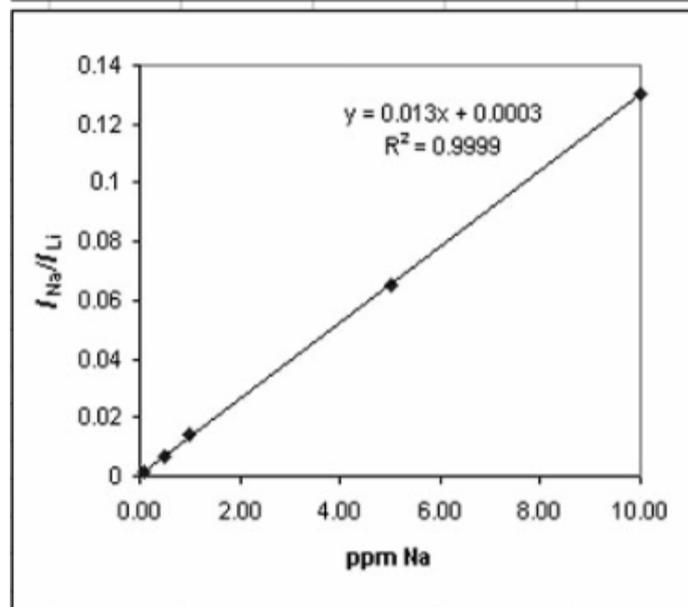
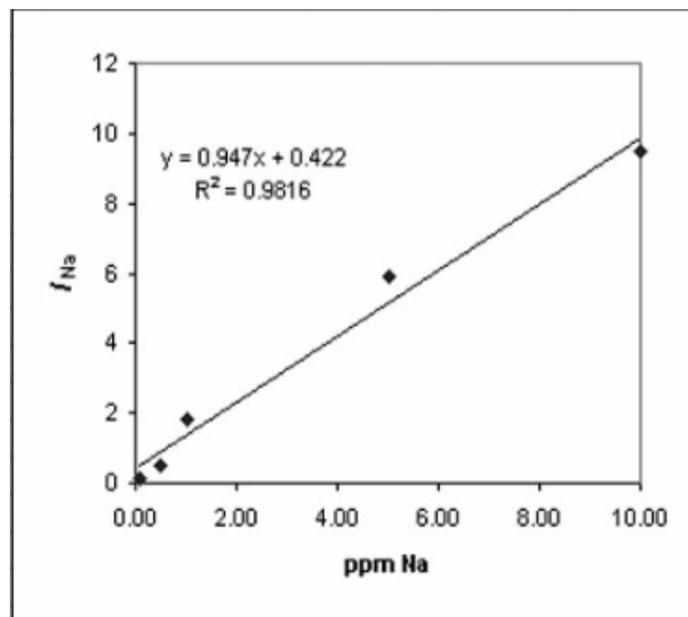
a = analito

$$R_p = k_p C_p V$$

$$R_a = k_a C_a V$$



$$\frac{R_p}{k_p C_p} = \frac{R_a}{k_a C_a}$$



Uma solução padrão contendo iodoacetona $6,3 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e p-diclorobenzeno $2,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (um padrão interno) deu áreas de pico de 395 e 787, respectivamente; 3,00 mL de uma solução desconhecida de iodoacetona foram tratados com 0,100 mL de p-diclorobenzeno $1,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e a mistura foi diluída para 10,00 mL. As áreas dos picos foram de 633 e 520 para a iodoacetona e p-diclorobenzeno, respectivamente. Encontre a concentração de iodoacetona nos 3,00 mL da solução desconhecida original.

Sensibilidade de calibração

-É uma medida de sua habilidade em discriminar entre pequenas diferenças na concentração de um analito.

-Dois fatores limitam a sensibilidade: a *inclinação da curva de calibração* e a reprodutibilidade ou precisão do dispositivo de medida.

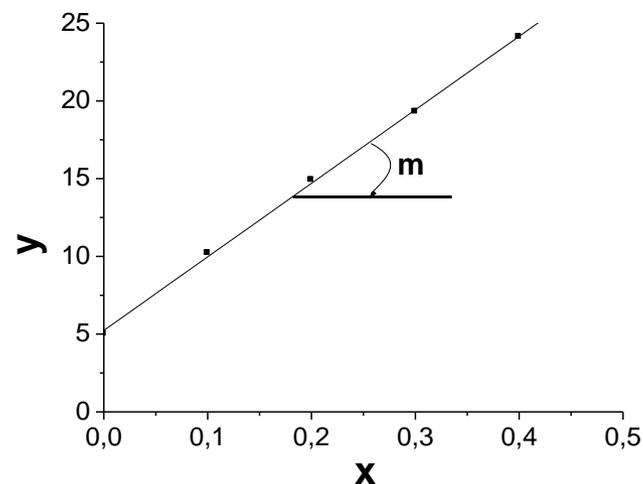
-Para dois métodos que tenham a mesma precisão, aquele que tem a curva de calibração *mais inclinada* será o *mais sensível*.

-Definição: INCLINAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO A UMA DADA CONCENTRAÇÃO DE INTERESSE (m).

Sensibilidade analítica: $\gamma = m/s_s$

m = inclinação da curva de calibração

s_s = desvio padrão da medida



Limite de detecção

-Pode ser definido como a concentração mais baixa de um analito que pode ser distinguida com confiança razoável do branco operacional (uma amostra que contém o analito em concentração zero)

-Este limite depende da razão entre a magnitude do sinal analítico e o tamanho das flutuações estatísticas no sinal do branco.

$$S_m = \bar{S}_{br} + k s_{br}$$

$$LD = \frac{S_m - \bar{S}_{br}}{m} = \frac{3s_{br}}{m}$$

S_m = sinal analítico mínimo distinguível

\bar{S}_{br} = sinal médio do branco

k = constante = 3

s_{br} = desvio padrão das medidas do branco

LD = limite de detecção

m = inclinação da curva de calibração

Sinal < LD



Espécie não detectada ao limite de detecção da concentração x , porém há presença de sinal analítico não presente no branco.

Limite de quantificação

-É a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e veracidade.

-Pode ser considerado como sendo a concentração do analito correspondente ao valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 desvios padrão.

Sinal < LQ



Espécie não detectada ao limite de determinação ou quantificação da concentração x , porém há presença de sinal analítico não presente no branco.

O cálculo do desvio padrão do branco pode ser feito com base na variação das medidas do branco analítico, da linha de base ou de um padrão de concentração muito baixa da(s) espécie(s) analisada(s). A escolha depende da técnica e/ou instrumentação analítica, sendo função do parâmetro que está sendo medido.

Especificidade e seletividade

-A especificidade e a seletividade estão relacionadas ao evento da detecção.

-Um método que produz resposta para *apenas um analito* é chamado *específico* e respostas para vários analitos, mas que pode *distinguir a resposta* de um analito da de outros, é chamado *seletivo* (livre de interferência).

Recuperação ou fortificação:

-Consiste na adição de uma quantidade conhecida de analito à amostra para testar se a resposta da amostra corresponde ao esperado a partir da curva de calibração. As amostras fortificadas são analisadas da mesma forma que as desconhecidas.

-Deve-se adicionar pequenos volumes de um padrão concentrado para evitar mudança significativa no volume de amostra.

$$\% \textit{recuperação} = \frac{C_{\textit{amostrafortificada}} - C_{\textit{amostranão-fortificada}}}{C_{\textit{adicionada}}} \times 100$$

Exemplo: Sabe-se que em uma amostra desconhecida existem 10,0 µg de um analito por litro. Uma adição intencional de 5,0 µg L⁻¹ foi feita numa porção idêntica da amostra desconhecida. A análise da amostra modificada forneceu uma concentração de 14,6 µg L⁻¹. Determine o percentual de recuperação da substância intencionalmente adicionada.

Repetibilidade ou repetitividade:

Máxima diferença aceitável entre duas repetições, vale dizer dois resultados independentes, do mesmo ensaio, no mesmo laboratório e sob as mesmas condições.

- a) Mesma amostra;
- b) Mesmo analista;
- c) Mesmo equipamento;
- d) Mesmo momento;
- e) Mesmo ajuste;
- f) Mesma calibração

Reprodutibilidade:

Máxima diferença aceitável entre dois resultados individuais para um mesmo processo e com demais condições como especificado.

- a) Amostras diferentes do mesmo ponto amostral, ou
- b) Diferentes analistas, ou
- c) Diferentes equipamentos, ou
- d) Diferentes técnicas, ou
- e) Diferentes calibrações, ou ajustes.

Exatidão:

1. *Testes de calibração*: a cada dez análises realizadas um padrão de concentração conhecida e diferentes dos usados para construir a curva de calibração deve ser analisado.

2. *Recuperação da substância fortificada*.

3. *Amostra de controle de qualidade*: são medidas do controle de qualidade que ajuda a eliminar vícios introduzidos pelo analista, que sabe a concentração das amostras de verificação de calibração. Amostras de composição conhecida são fornecidas ao analista como se fossem desconhecida.

4. *Branco*.

Precisão:

1. *Amostras repetidas* (repetibilidade).

2. *Porções repetidas da mesma amostra* (reprodutibilidade).

Apresentação de resultados calculados

Algarismos significativos

O termo algarismo representa qualquer um dos dez primeiros números, incluindo zero.

O número de algarismos significativos é o número mínimo de dígitos para escrever um dado valor em notação científica sem a perda da exatidão.

O zero é um algarismo significativo, exceto quando ele é o primeiro algarismo do número.

142,7 → 4 algarismos significativos ($1,427 \times 10^2$)

1,4270 $\times 10^2$ → CORRETO?

$6,302 \times 10^{-6}$ → 4 algarismos significativos (0,000006302)

As quantidades observadas devem ser registradas com um algarismo duvidoso.

O último algarismo significativo (à direita) numa quantidade medida terá sempre uma incerteza associada a si.

A incerteza mínima deverá ser de ± 1 no último dígito.

Em geral, quando se lê a escala de qualquer aparelhagem, deve-se interpolar entre as marcações.

Há incerteza em qualquer quantidade medida, mesmo que o instrumento de medida possua uma leitora digital que não flutue.

Alguns números são exatos – com um número infinito de dígitos significativos não-escritos. Para calcular a altura média de 4 pessoas, você deverá dividir a soma das alturas (a qual é uma quantidade medida com alguma incerteza) pelo número inteiro 4. São exatamente 4 pessoas, e não $4,000 \pm 0,002$ pessoas!!!!

Um volume que está entre 20,5 mL e 20,7 mL deve ser escrito como? 20,6 mL ou 20,60 mL?

O arredondamento deve ser feito somente na resposta final (não em resultados intermediários).

Adição e subtração

-se os números a serem adicionados ou subtraídos têm igual número de algarismos significativos: resposta deve ficar com o mesmo número de casas decimais do número individual

$$\text{Ex: } 5,345 + 6,728 = 12,073$$

-se os números a serem adicionados ou subtraídos não possuírem o mesmo número de algarismos significativos: limita-se pelo de menor número

$$\text{Ex: } 18,9984032 + 83,80 = 102,7984032 \rightarrow 102,80$$

$$\text{Ex: } 1,632 \times 10^5 + 4,107 \times 10^3 + 0,984 \times 10^6 = \text{?????}$$

A soma ou diferença entre duas ou mais quantidades não pode ter precisão maior do que a da quantidade que tem a maior incerteza.

Multiplicação e divisão

-limita-se ao número de dígitos contidos no número com menos algarismos significativos

$$\text{Ex: } 3,26 \times 10^{-5} \times 1,78 = 5,80 \times 10^{-5}$$

$$\text{Ex: } 4,3179 \times 10^{12} \times 3,6 \times 10^{-19} = 1,6 \times 10^{-6}$$

$$\text{Ex: } 34,60 / 2,46287 = 14,05$$

A potência de 10 não influencia em nada o número de algarismos significativos que devem ser mantidos.

Logaritmos e antilogaritmos

Um logaritmo é composto de uma característica e uma mantissa. A característica é a parte inteira e a mantissa é a parte decimal.

Ex: $\log 339 = 2,530$

Característica

Mantissa

O número de algarismos significativos *na mantissa* de $\log 339$ deve ser igual ao número de algarismos significativos existentes em 339. A *característica 2*, corresponde ao expoente $3,39 \times 10^2$.

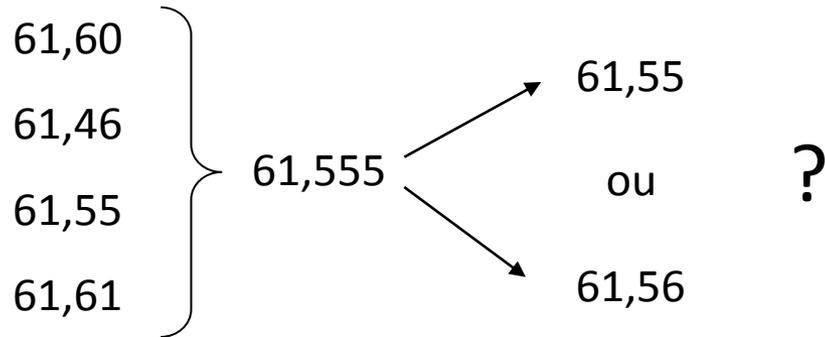
Convertendo um logaritmo em seu antilogaritmo, o número de algarismos significativos no *antilogaritmo* deve ser igual ao número de algarismos significativos existentes na *mantissa*.

Ex: $\text{antilog}(-3,42) = 10^{-3,42} = 3,8 \times 10^{-4}$

Ex: $\log 0,001237 = \text{????}$

Arredondamento de dados

Ex:



Regra: arredondar o número 5 para o número par mais próximo → eliminação de tender a arredondar apenas em uma única direção.