

VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE CORANTES EM MISTURA AQUOSA

Rayany M. R. Santana¹; Rayssa K. M. Gomes¹; Vanessa O. M. Cavalcanti¹; Alex A. Lucena; Marcos A. S. Oliveira¹; Daniella C. Napoleão¹; Marta M. M. B. Duarte¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Engenharia Química, Recife, Pernambuco, Brasil

Palavras-Chave: Espectrofotometria, Confiabilidade analítica, UV/Vis

Introdução

Diferentes técnicas instrumentais são utilizadas para identificar e acompanhar a concentração de compostos químicos, dentre elas está a cromatografia. No entanto, embora esta técnica apresente alta sensibilidade e seletividade, suas análises demandam alto custo de investimento e operação, incluindo geralmente a necessidade de preparação de amostra (Dastkhon *et al.* 2018). Por este motivo, métodos espectrofotométricos vêm sendo utilizados para analisar uma série de compostos, visto que são mais simples e acessíveis para análises de rotina. Um exemplo é o uso da espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta visível (UV/Vis), que consegue identificar e quantificar substâncias que absorvem radiação em comprimentos de onda específicos (Ntrallou; Gika; Tsochatzis, 2020).

Neste contexto, o desenvolvimento de metodologias que sejam confiáveis para a realização de análises quantitativas de substâncias químicas é extremamente importante. Para garantir essa confiabilidade, faz-se necessário validar o método com base em alguns parâmetros (Raposo; Ibelli-Bianco, 2020). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Brasil, por exemplo, possui uma normativa que dispõe sobre a validação de métodos analíticos, na qual é afirmado que todo método utilizado na rotina de controle de qualidade de produtos deve ser validado. Ou seja, deve haver uma documentação das evidências de que a metodologia empregada é adequada ao uso a que se destina (Ribani *et al.* 2004). Assim, garante-se que os resultados analíticos para uma amostra são confiáveis. Dentre os parâmetros fundamentais para a validação de um método analítico estão a linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) (Raposo; Ibelli-Bianco, 2020).

A linearidade informa sobre a capacidade que um método analítico possui para obter resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, em uma determinada faixa de trabalho. Sua determinação pode ser feita com base no valor do coeficiente de correlação (r) da curva analítica (Harris, 2017). A precisão, por sua vez, verifica a proximidade entre os resultados obtidos para uma mesma amostra. Pode ser expressa de três maneiras: repetibilidade (ensaios realizados sob as mesmas condições), precisão intermediária (verifica a influência de efeitos aleatórios dentro dos laboratórios) ou reprodutibilidade (constata a reprodução dos dados quando se varia algum parâmetro operacional) (Skoog *et al.* 2014). A precisão é comumente determinada pela razão entre o desvio padrão e a concentração média obtida (desvio padrão relativo) (Brasil, 2017; INMETRO, 2020).

A exatidão informa sobre o quão próxima encontra-se a resposta de um método analítico com o valor real na amostra. Ela pode ser verificada de diversas formas, como por exemplo, utilizando ensaios de recuperação e/ou estudo colaborativo (analista-laboratório) ou através da comparação com um material de referência certificado. Espera-se que a diferença entre os valores obtidos seja a menor possível, mas garantindo um nível de confiança para resultados ‘oscilantes’, dependendo da região da curva analítica (Harris, 2017). No ensaio de recuperação, analisa-se a quantidade do analito recuperada no processo em comparação com o valor real presente na amostra. Um exemplo dessa determinação é o processo de fortificação da amostra, no qual soluções com diferentes concentrações do analito são adicionadas de forma que a concentração final (referente à soma das duas concentrações) seja determinada em seguida (INMETRO, 2020). A recuperação em termo percentual é expressa pela Equação 1.

$$R(\%) = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (1)$$

Em que, C_1 diz respeito à concentração do analito na amostra fortificada, C_2 é a concentração do analito na amostra não fortificada e, por último, C_3 é a concentração do analito adicionado à amostra fortificada, todas em $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Por sua vez, o LD representa a menor quantidade do analito capaz de ser detectada, mas não necessariamente quantificada no experimento. Já o LQ é a menor concentração do analito quantificável através de um procedimento experimental. Para estes dois, a determinação é feita através de parâmetros da curva analítica ou pela razão sinal ruído. Quando se utiliza os dados da curva, os valores de LD e LQ podem ser calculados através das Equações 2 e 3, respectivamente (Harris, 2017; Hage; Carr, 2012).

$$LD = 3,3 \left(\frac{s}{S} \right) \quad (2)$$

$$LQ = 10 \left(\frac{s}{S} \right) \quad (3)$$

Onde, s é a estimativa do desvio padrão do branco ou do menor ponto da curva para a equação da linha de regressão, enquanto S é a inclinação da curva analítica.

Diante do que foi exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a confiabilidade analítica de uma metodologia para detecção e quantificação de corantes têxteis através da técnica de espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta visível. Tal avaliação foi realizada a partir de diferentes parâmetros de validação, a citar: linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

Material e Métodos

Neste estudo, desenvolveu-se um método analítico para acompanhar a concentração de uma mistura de 4 corantes têxteis, sendo eles: preto direto 22 (PD22), vermelho direto 23

(VD23), vermelho direto 227 (VD227) e azul reativo 21 (AR21). Estes foram selecionados após a aplicação de um questionário junto a uma lavanderia têxtil do Estado de Pernambuco, resolvendo-se estudar os quatro mais utilizados em seu processo produtivo. As absorvâncias para concentrações de 1 a 30 mg·L⁻¹ foram medidas no comprimento de onda de 508 nm, onde previamente constatou-se a maior absorvância da solução de corantes. A validação da metodologia para detecção e quantificação desses compostos foi realizada com base na norma técnica do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) (INMETRO, 2020), determinando-se os parâmetros linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ).

O primeiro parâmetro analisado foi a linearidade, cuja avaliação se deu a partir dos valores de absorvância obtidos para dez réplicas autênticas de cada concentração da curva analítica. Para determinação deste parâmetro, realizou-se uma análise estatística dos dados de cada ponto da curva, através dos testes de Grubbs (Grubbs; Beck, 1972) e de Cochran (1943). Logo após, construiu-se uma curva analítica, determinando-se o coeficiente de correlação linear (r) e avaliando o comportamento dos resíduos.

A repetibilidade das amostras foi determinada de modo a definir a precisão do método analítico, sendo expressa pelo percentual do coeficiente de variância (CV). Para garantir que os dados são precisos em toda a faixa de trabalho, estudaram-se 4 diferentes concentrações (baixa, média e alta), todas com 10 repetições. O CV foi estimado através da razão percentual entre a estimativa do desvio padrão das réplicas autênticas de cada ponto das curvas e as médias das absorvâncias para todos os pontos.

De modo a avaliar a exatidão, utilizou-se o método da fortificação, analisando-se diferentes concentrações da solução de corantes, a partir de quinze determinações independentes, que contemplaram toda a região da faixa de trabalho da curva analítica. Para isto, a partir de soluções diluídas da mesma solução estoque (1, 5, 20 e 30 mg·L⁻¹), prepararam-se três diferentes soluções (1+5, 1+20 e 1+30 mg·L⁻¹), com razão volumétrica 1:1 e cinco replicatas em cada nível. A exatidão do método foi expressa com base no percentual de recuperação (%recuperação) do corante, de concentração conhecida, que foi adicionada à amostra.

Por último, a partir de parâmetros da curva analítica, calcularam-se os valores de LD e LQ. Os cálculos foram realizados com base na estimativa do desvio padrão das absorvâncias obtidas em dez leituras do menor ponto da curva e a sua respectiva inclinação (coeficiente angular da reta), a qual foi observada na avaliação da linearidade. Sendo assim, o LD foi obtido a partir de 3,3 vezes a razão entre o desvio e a inclinação, enquanto o valor de LQ foi expresso por 10 vezes esta razão.

Após a etapa e procedimentos para validação, a curva analítica foi utilizada em análises quantitativas da solução da mistura de corantes antes (com concentração inicial de 5, 10, 15, 20 e 30 mg·L⁻¹) e após submissão a um tratamento de degradação via processo oxidativo avançado (POA). Neste caso, empregou-se o processo foto-Fenton irradiado por luz solar (pH 3, [FeSO₄] = 4 mg·L⁻¹ e [H₂O₂] = 100 mg·L⁻¹) para oxidar as moléculas dos corantes e, por conseguinte, reduzir a coloração da solução. A concentração das soluções foi determinada ao longo de 60 min.

Destaca-se que a quantificação dos corantes nos efluentes gerados pela lavanderia têxtil citada, que cedeu o PD22, VD23, VD227 e AR21, está em fase preliminar de execução, já tendo sido agendada uma visita para a coleta de amostras.

Resultados e Discussão

Na etapa da validação da metodologia, a análise da linearidade levou em consideração os valores das absorbâncias para cada uma das concentrações avaliadas para a mistura de corantes. Na Tabela 1 estão apresentados os valores médios das absorbâncias medidas, seguidos dos valores dos parâmetros dos testes de Grubbs ($G_{<}$ e $G_{>}$) e Cochran (variância).

Tabela 1 - Resultados das médias das absorbâncias com valores obtidos para $G_{<}$ e $G_{>}$ do teste de Grubbs e suas respectivas variâncias para o teste de Cochran.

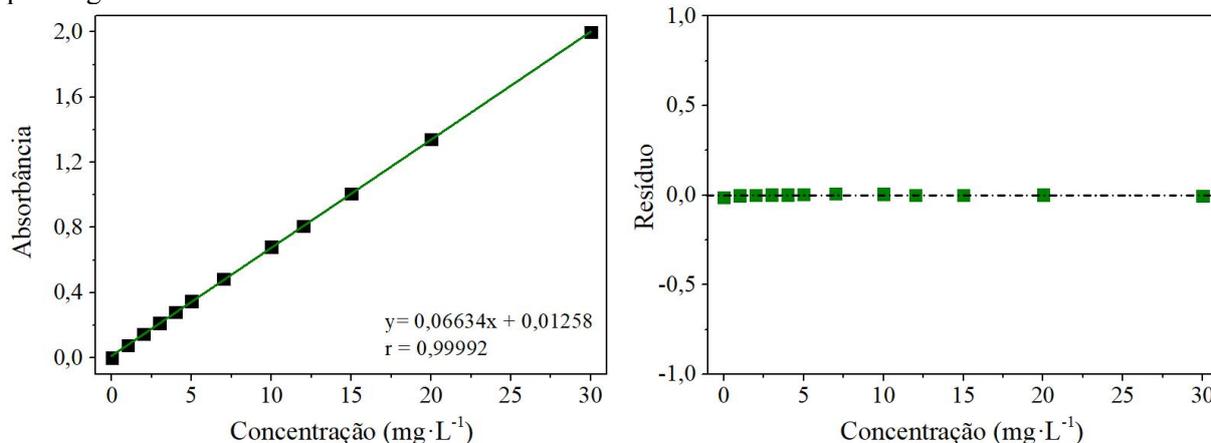
Concentração ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Média da absorbância	$G_{<}$	$G_{>}$	Variância
1	0,076	2,212	1,749	$3,0 \times 10^{-6}$
2	0,145	1,744	1,980	$1,6 \times 10^{-6}$
3	0,213	1,438	1,943	$4,2 \times 10^{-6}$
4	0,281	1,804	1,742	$4,3 \times 10^{-6}$
5	0,348	1,863	2,097	$9,8 \times 10^{-6}$
7	0,484	1,588	1,876	$23,2 \times 10^{-6}$
10	0,681	1,839	1,911	$36,0 \times 10^{-6}$
12	0,808	1,784	1,973	$66,3 \times 10^{-6}$
15	1,006	2,104	1,913	$44,3 \times 10^{-6}$
20	1,341	1,905	1,638	$71,9 \times 10^{-6}$
30	1,998	1,486	1,981	$54,0 \times 10^{-6}$
Variância máxima = $71,9 \times 10^{-6}$				
Soma das variâncias = $356,7 \times 10^{-6}$				
C calculado = 0,2015				

$G_{\text{tabelado}} = 2,23$ (Nível de confiança = 95%)

$C_{\text{tabelado}} = 0,2098$ (Nível de confiança = 95%)

Analisando a Tabela 1, verifica-se que os valores calculados de $G_{<}$ e $G_{>}$, obtidos para dez medições a um nível de 95% de confiança, são menores que o valor tabelado de 2,23, indicando a inexistência de valores discrepantes (*outliers*). Por meio do teste de Cochran, uma vez constatado que $C_{\text{calculado}} < C_{\text{tabelado}}$, observou-se ainda a homocedasticidade das variâncias. Com base nesses resultados estatísticos, foi possível construir uma curva analítica (Figura 1).

Figura 1 - Curva analítica para quantificação da mistura de corantes em solução e os resíduos deixados pela regressão.



Com base na Figura 1, a linearidade da curva foi avaliada através do coeficiente de correlação de Pearson (r), cujo valor atendeu aos padrões recomendados pelos órgãos regulamentadores. Este encontrava-se próximo a 1, sendo superior aos valores de 0,90 e 0,99 que são preconizados pelo INMETRO (2003) e pela ANVISA (BRASIL, 2003), respectivamente, e que garantem a linearidade da curva. Quanto aos resíduos, verifica-se um comportamento aleatório em torno do ponto (0,0), sem qualquer tendência. Com isto, constatou-se verdadeiramente a linearidade da curva analítica, a qual poderá ser utilizada para quantificação dos corantes, atestando que os resultados gerados por meio dela serão linearmente proporcionais à concentração dos analitos.

Em seguida, avaliou-se o parâmetro precisão, através da repetibilidade. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Teste da precisão analisado através do coeficiente de variância para diferentes concentrações da curva analítica.

Concentração (mg·L ⁻¹)	Média da absorbância	CV(%)
1	0,076	2,28
5	0,348	0,90
20	1,341	0,63
30	1,998	0,19

CV(%) = coeficiente de variância em percentual

Na Tabela 2, verificou-se que para todas as concentrações analisadas, o coeficiente de variação ficou abaixo dos valores máximos de aceitação para repetibilidade estabelecidos pelo INMETRO (2020), que é de até 11,0% para a concentração de 1 mg·L⁻¹ e de até 6,4% para a de 50 mg·L⁻¹ (>30 mg·L⁻¹). Com isso, uma vez que os resultados alcançados são menores que os valores percentuais mencionados, afirma-se que o método empregado foi preciso, sendo capaz de gerar resultados reproduzíveis.

Na sequência, avaliou-se a exatidão, com base no %recuperação. Compararam-se os valores de concentração obtidos experimentalmente com os valores teóricos previstos para as diferentes concentrações da curva analítica, tal como pode ser constatado na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados obtidos para o teste de exatidão expresso através do %recuperação.

Concentração teórica (mg·L ⁻¹)	Concentração experimental (mg·L ⁻¹)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	CV (%)
3,0	2,86	95,25	95,65	0,23
	2,87	95,75		
	2,87	95,75		
	2,87	95,75		
	2,87	95,75		
10,5	10,75	102,36	102,59	0,30
	10,76	102,51		
	10,78	102,65		
	10,75	102,36		
	10,82	103,09		
25,5	26,29	103,09	103,47	0,39
	26,39	103,50		
	26,54	104,10		
	26,32	103,20		
	26,38	103,44		

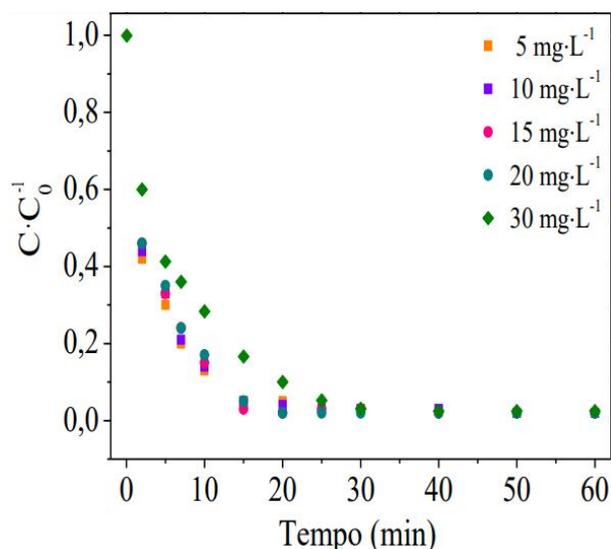
CV(%) = coeficiente de variação em percentual

Através da análise da Tabela 3, observa-se que os percentuais de recuperação variaram entre 95,25% e 104,10%, apresentando um CV de até 0,39, que foi determinado a partir das quintuplicatas realizadas. Sendo assim, afirma-se que o método analítico está de acordo com o INMETRO (2020), que estabelece percentuais de recuperação entre 80 e 110%, para concentrações de analito entre 1 e 30 mg·L⁻¹. Logo, a metodologia analítica pôde ser considerada exata, o que significa que os dados gerados por meio da curva analítica serão confiáveis e próximos ao valor verdadeiro.

Por fim, calcularam-se os valores de LD e LQ, os quais foram iguais a 0,04 e 0,13 mg·L⁻¹, respectivamente. A partir destes resultados, verifica-se que será possível detectar concentrações dos corantes acima de 0,04 mg·L⁻¹, no entanto, apenas concentrações iguais ou superiores a 0,13 mg·L⁻¹ poderão ser quantificadas com segurança através da curva analítica.

De posse da curva validada, determinaram-se as concentrações dos corantes antes e após o tratamento via POA foto-Fenton, conforme mencionado anteriormente. Os dados obtidos foram plotados em um gráfico $C \cdot C_0^{-1}$ versus tempo, o qual está exposto na Figura 2.

Figura 2 - Dados gerados através da curva analítica no acompanhamento cinético da degradação dos corantes têxteis PD22, VD23, VD227 e AR21 em mistura e em diferentes concentrações iniciais. Condições: pH = 3, $[\text{FeSO}_4] = 4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e $[\text{H}_2\text{O}_2] = 100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.



De acordo com a Figura 2, houve um decaimento da concentração das soluções ao longo dos 60 min de tratamento, a qual pôde ser determinada por meio da curva analítica construída nesta pesquisa. Uma vez evidenciada a validade desta curva após o estudo de diferentes parâmetros, pode-se afirmar que os dados obtidos são verdadeiros. Não menos importante, destaca-se a eficiência do processo de tratamento utilizado no trabalho, o qual já em um estudo preliminar foi capaz de reduzir a concentração das soluções de corantes, merecendo ser avaliado de modo mais aprofundado em pesquisas posteriores. Nelas, está incluída a remediação dos efluentes têxteis da lavanderia, que ainda não foram coletados.

Conclusões

Sendo assim, o presente estudo permitiu o desenvolvimento de uma metodologia capaz de detectar e quantificar com segurança os corantes têxteis através da técnica de espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta visível. A validação da curva analítica em amostra laboratorial foi conduzida com sucesso, onde os parâmetros analisados (linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação) apresentaram resultados em conformidade com as exigências dos órgãos competentes, mostrando que por meio dela é possível obter dados confiáveis, exatos e proporcionais. À vista disso, conclui-se que, dentro do escopo atual da pesquisa, o método proposto demonstra ser eficiente e promissor. Contudo, é válido salientar que o seu completo e efetivo potencial apenas poderá ser determinado após a sua aplicação em efluentes industriais, os quais são matrizes mais complexas.

Agradecimentos

FACEPE, CNPq, FACEPE (APQ 0947-3.06/22), FADE/UFPE e Lavanderia Nossa Senhora do Carmo (Caruaru -PE).



Referências

- Brasil. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução nº 166, de 24 de julho de 2017. **Critérios para a validação de métodos analíticos**. Diário Oficial da União, Brasília, 25 de julho de 2017.
- Cochran, W. G. Analysis of variance for percentages based on unequal numbers. **Journal of the American Statistical Association**, 38(223), 287-301, 1943.
- Dastkhon, M.; Ghaedi, M.; Asfaram, A.; Jannesar, R.; Sadeghfard, F. Magnetic based nanocomposite sorbent combination with ultrasound assisted for solid-phase microextraction of Azure II in water samples prior to its determination spectrophotometric. **Journal of colloid and interface science**, 513, 240-250, 2018.
- Grubbs, F. E.; Beck, G. Extension of sample sizes and percentage points for significance tests of outlying observations. **Technometrics**, 14(4), 847-854, 1972.
- Harris, D. C. **Análise química quantitativa**. 9a ed. Rio de Janeiro: LTC, 2017.
- Hage, D. S.; Carr, J. D. **Química analítica e análise quantitativa**. 1a ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2012.
- Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – (INMETRO). **DOC-CGCRE-008** Orientação sobre validação de métodos analíticos. Revisão 09, 2020.
- Ntrallou, K.; Gika, H.; Tsochatzis, E. Analytical and sample preparation techniques for the determination of food colorants in food matrices. **Foods**, v. 9, n. 1, p. 58, 2020.
- Raposo, F.; Ibelli-Bianco, C. Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 129, 115913, 2020.
- 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.
- Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. **Fundamentos de química analítica**. 9a ed. São Paulo: Cengage Learning, 2014.