

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.

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

CURVA DE CALIBRAÇÃO OU CURVA ANALÍTICA

- Uma curva de calibração mostra a resposta de um método analítico para quantidades conhecidas de constituinte.
- Soluções contendo concentrações conhecidas de constituinte são chamadas de ***solução padrão***.
- Soluções contendo todos os reagentes e solventes usados na análise, sem adição do constituinte que se deseja analisar, são chamadas de ***solução em branco***. O branco mede a resposta instrumental do procedimento analítico para impurezas ou espécies interferentes nos reagentes.

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 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 medicamento:

Branco: $i_{\text{oxidação}} = 0,10 \mu\text{A}$

Padrão: $[\text{AA}] = 2 \mu\text{mol/L}$; $i_{\text{oxidação}} = 2,39 \mu\text{A}$

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

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

$$K = 1,145 \mu\text{A.L}/\mu\text{mol}$$

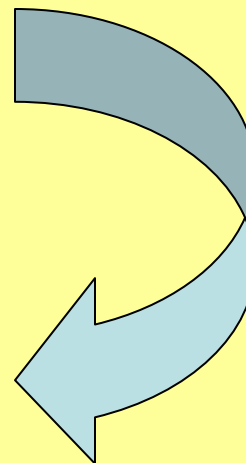
$$K = 1,145 \text{ A.L/mol}$$

Amostra: $[\text{AA}] = x \mu\text{mol/L}$; $i_{\text{oxidação}} = 6,11 \mu\text{A}$

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

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

$$[\text{AA}] = 5,24 \mu\text{mol/L}$$

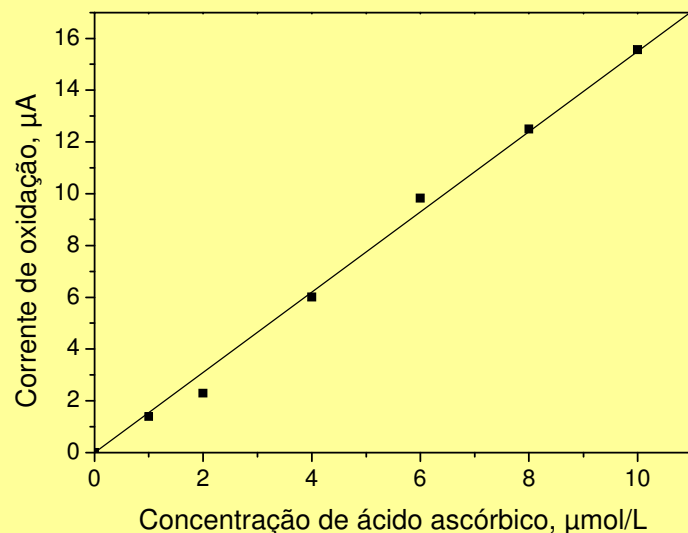


Curva de Calibração Externa

- 1ª Etapa: Soluções padrão: Prepara-se soluções de concentrações conhecidas e diferentes do constituinte em análise. Geralmente estas soluções são obtidas por conveniente diluição de uma solução padrão estoque.
- 2ª Etapa: Medidas de sinal analítico: Medidas do sinal instrumental para as soluções padrão e branco (5 níveis de concentração no mínimo).
- 3ª Etapa: Construção do gráfico do sinal obtido x concentração do analito.

Exemplo: Determinação amperométrica de ácido ascórbico (vitamina C) em medicamentos.

[AA], $\mu\text{mol/L}$	corrente de oxidação, μA			faixa	corrente corrigida, μA			média
0	0.08	0.1	0.12	0.04	0	0	0	0
1	1.51	1.45	1.52	0.07	1.41	1.35	1.42	1.39
2	2.44	2.37	2.35	0.09	2.34	2.27	2.25	2.29
4	6.12	6.13	6.08	0.05	6.02	6.03	5.98	6.01
6	9.92	9.91	9.97	0.06	9.82	9.81	9.87	9.83
8	12.61	12.59	12.98	0.39	12.51	12.49	sem dado	12.5
10	15.74	15.67	15.6	0.14	15.64	15.57	15.5	15.57

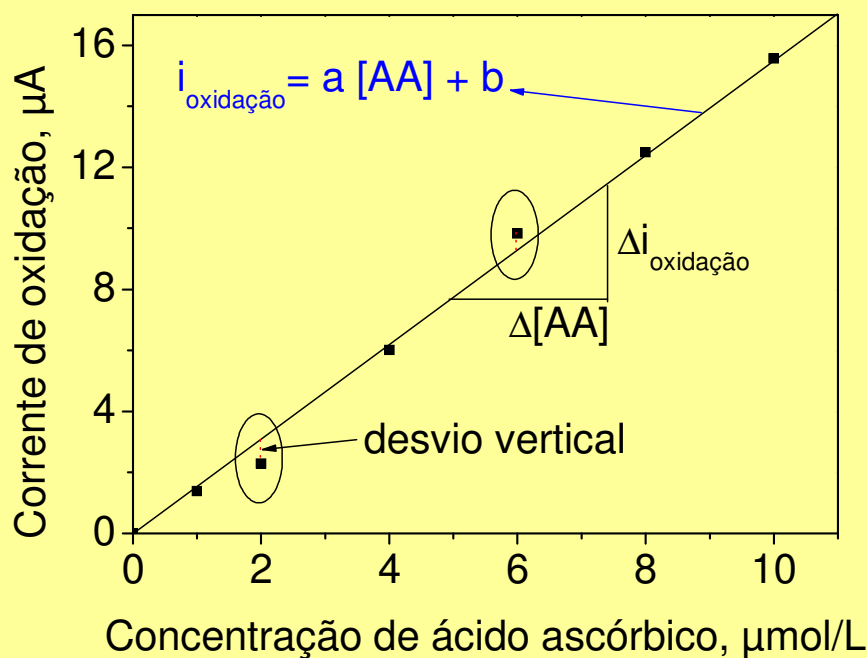


$$Q = \frac{|12,98 - 12,61|}{12,98 - 12,59} = 0,95$$

$$Q_{calc} > Q_{tab} (0,94)$$

- Ajuste da curva de calibração externa:
Consiste em traçar a melhor reta que se ajuste aos pontos experimentais que possuem algum erro e não descrevem exatamente uma reta.

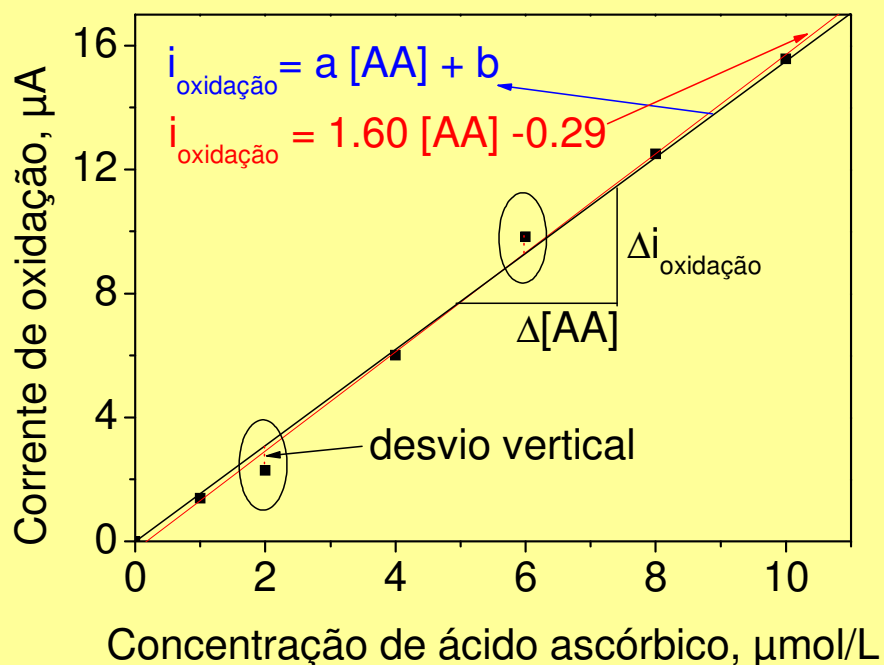
MÉTODO DOS MÍNIMOS QUADRADOS



- ❖ Pressupõe que os erros nos valores de y são muito maiores que os erros nos valores de x.
- ❖ As incertezas (desvios-padrão) em todos os valores de y são semelhante.

$$a = \frac{n \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}$$

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



Estimativa das incertezas para a inclinação, interseção e y

[AA]	iox	[AA].iox	[AA].[AA]	d = iox - 1.60[AA] + 0.29	d.d
0	0	0	0	0.29	0.0841
1	1.39	1.39	1	0.08	0.0064
2	2.29	4.58	4	-0.62	0.3844
4	6.01	24.04	16	-0.1	0.01
6	9.83	58.98	36	0.52	0.2704
8	12.5	100	64	-0.01	1.00E-04
10	15.57	155.7	100	-0.14	0.0196
31	47.59	344.69	221		0.775

Desvio padrão y:

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum d_i^2}{n-2}} = 0,39$$

Desvio padrão a:

$$s_a = \sqrt{\frac{s_y^2 n}{D}} = 0,04$$

Desvio padrão b:

$$s_b = \sqrt{\frac{s_y^2 \sum x_i^2}{D}} = 0,24$$

Incerteza de x

$$s_x = \frac{s_y}{|a|} \sqrt{\frac{1}{k} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{y}_c - \bar{y})^2}{a^2 \sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$Y = b + a * X$$

$$D = 586$$

Parameter	Value	Error
b	-0.28669	0.24177
a	1.5999	0.04303

R	SD	N	P
0.9982	0.39369	7	<0.0001

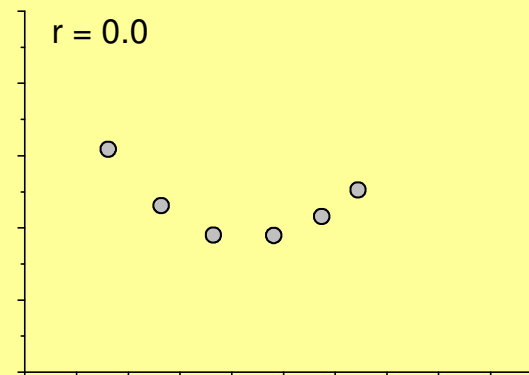
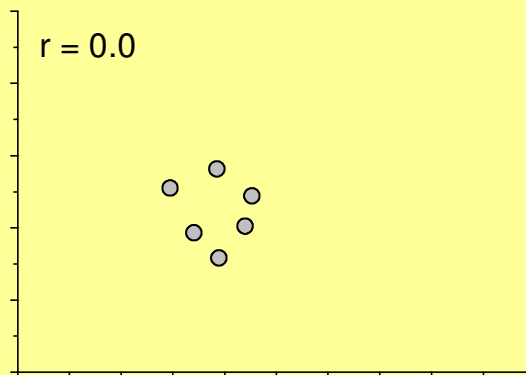
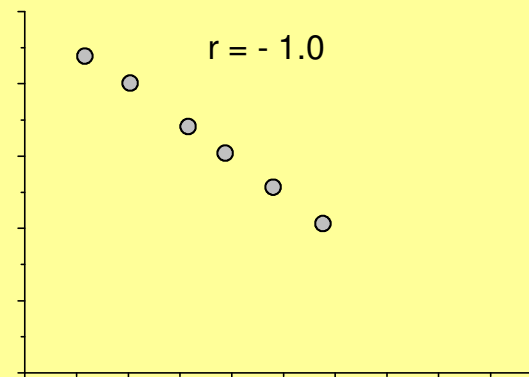
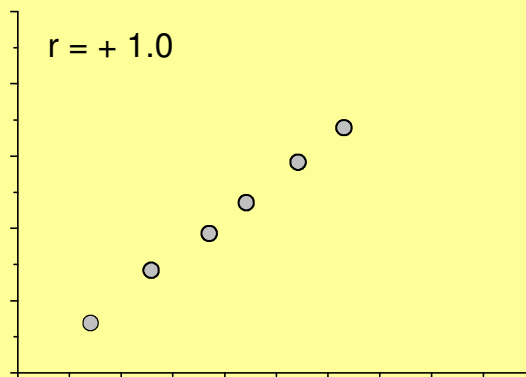
Onde; k é o número de vezes que a amostra desconhecida é medida, n é o número de pontos da curva de calibração

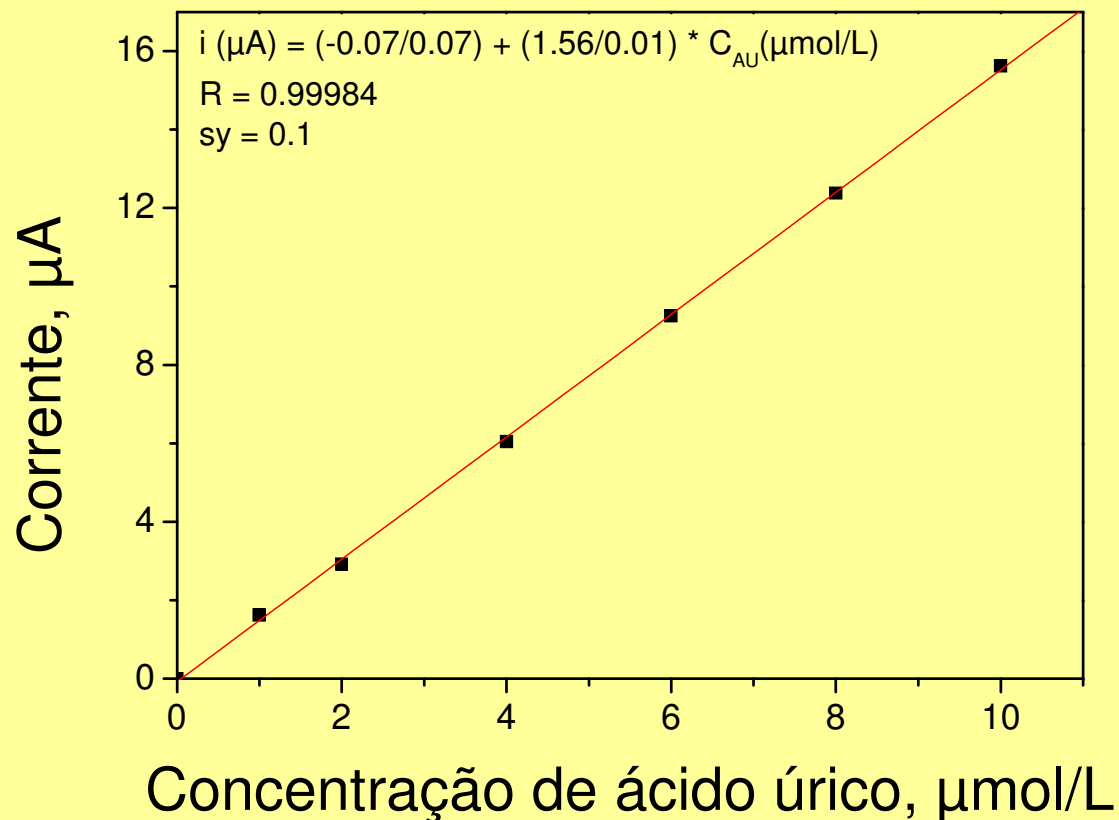
Obs.: A primeira casa decimal do desvio-padrão é o último algarismo significativo do coeficiente angular e do coeficiente linear.

COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO

➤ O coeficiente de correlação indica o grau de correlação entre as duas variáveis, ou quanto a reta de regressão se ajusta aos pontos. Uma correlação de + 1,0 ou uma correlação de - 1,0 indica um perfeito ajuste. Correlação é a medida da associação linear entre duas variáveis.

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





$$i = -0,07 + 1,56C_{AU}$$

$$5,72 = -0,07 + 1,56C_{AU}$$

$$C_{AU} = 3,71 \mu\text{mol} / L$$

$$C_{AU} = (3,71 \pm 0,04) \mu\text{mol} / L$$

$$sensibilidade_analítica = \frac{1,56}{0,01} = 156 \mu\text{AL} / \mu\text{mol}$$

$$LD = \frac{3s}{a} = \frac{3 \times 0,07}{1,56} = 0,13 \mu\text{mol} / L$$

$$LQ = \frac{10s}{a} = \frac{10 \times 0,07}{1,56} = 0,45 \mu\text{mol} / L$$

ADIÇÃO DE PADRÃO

➤ Na curva de adição de padrão, quantidades conhecidas de constituintes são adicionadas à amostra desconhecida. Do aumento do sinal instrumental, deduz-se quanto de constituinte estava na amostra original. Este método requer uma resposta linear para o constituinte.

➤ Usamos o método das adições de padrão quando for difícil ou impossível fazer uma cópia da matriz da amostra. Em geral, a amostra é “contaminada” com uma quantidade ou quantidades conhecidas de uma solução padrão contendo o analito.

❖ **Calibração Pontual** - duas porções da amostra são tomadas, uma porção é medida como de costume, mas uma quantidade conhecida da solução padrão é adicionada à segunda porção. Assumi-se uma relação linear entre a resposta e a concentração do analito.

$$\frac{[X]_i}{[S]_f + [X]_f} = \frac{I_X}{I_{S+X}} \quad \begin{array}{l} X = \text{amostra} \\ S = \text{padrão} \end{array}$$

Para um volume inicial V_0 da amostra desconhecida e para o volume adicionado V_s de padrão com concentração $[S]_i$, o volume total é $V = V_0 + V_s$ e as concentrações são:

$$[X]_f = [X]_i \left(\frac{V_0}{V} \right) \quad [S]_f = [S]_i \left(\frac{V_s}{V} \right)$$

Exemplo: Uma amostra de vitamina C apresentou uma corrente de oxidação de 6,11 μA . Então 5,00 mL de uma solução 2 $\mu\text{mol/L}$ de um padrão de vitamina C foi adicionados a 95 mL da amostra de vitamina C. Essa amostra reforçada forneceu um sinal de 8,15 μA . Encontre a concentração original de vitamina C no medicamento.

$$\frac{[AA]_i}{2x\frac{5}{100} + [AA]_i x\frac{95}{100}} = \frac{6,11}{8,15}$$
$$[AA]_i = 0,075 + 0,7125[AA]_i$$
$$[AA]_i = 0,26\mu\text{mol} / L$$

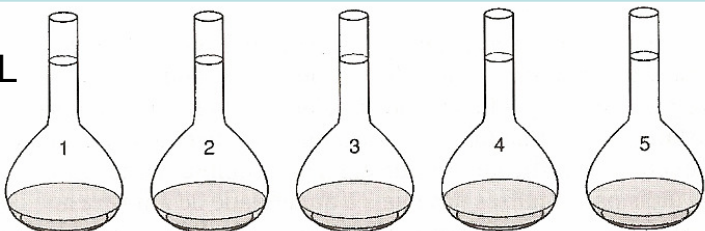
❖ Curva de adição de padrão

São feitas as adições de quantidades conhecidas da solução padrão do analito a várias porções da amostra e uma curva analítica com as múltiplas adições é obtida.

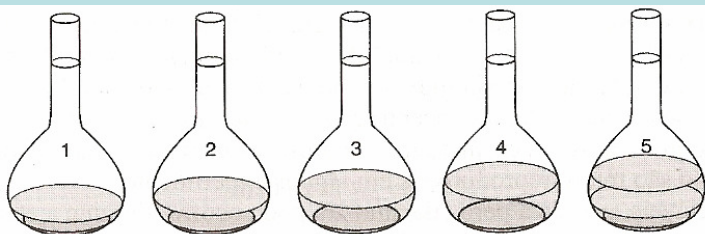
➤ Procedimento gráfico para a adição de padrão:

5,0 mL de amostra desconhecida em cada balão volumétrico

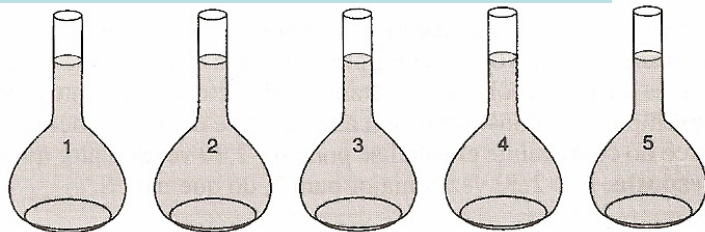
$V_{\text{final}} = 50,00 \text{ mL}$



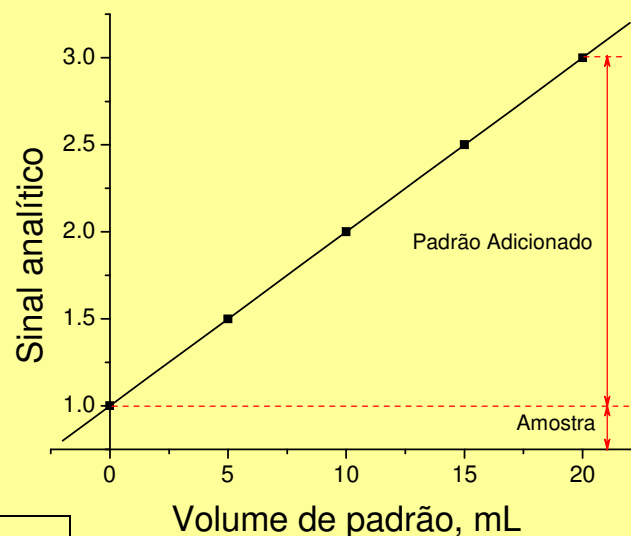
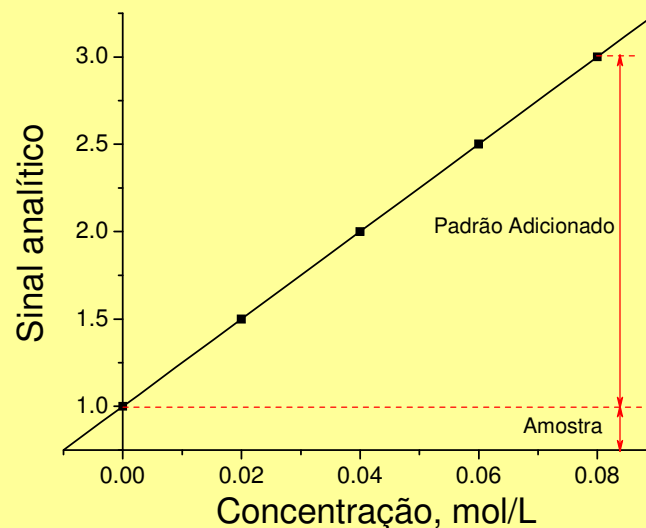
Adiciona-se 0, 5, 10, 15 e 20 mL de padrão 0,2 mol/L



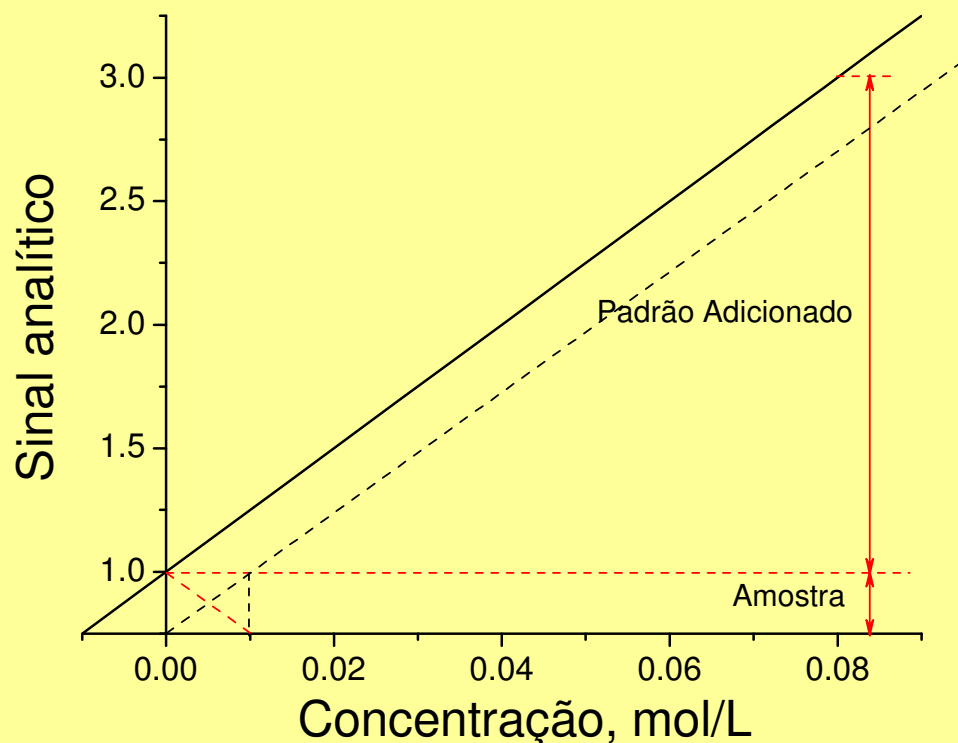
Complete o balão até a marca de aferição



Balão	1	2	3	4	5
[S], mol/L	0,00	0,02	0,04	0,06	0,08



- Curva de adição de padrão usando concentrações das soluções-padrão:



X = concentração do analito na amostra

$$y = b + aX$$

$$y = 0 = b + aX$$

$$X = \left| \frac{-b}{a} \right|$$

$$X = \left| \frac{-b}{a} \right| x \frac{V_{total}}{V_{amostra}}$$

$$s_c = \frac{s_y}{|a|} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\bar{y})^2}{a^2 \sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

Onde; n é o número de pontos

- Curva de adição de padrão usando volume das soluções-padrão:

$$s_{analito} = s_{padrão} + s_{amostra}$$

$$s_{analito} = K \frac{[P]V_{padrão}}{V_{total}} + K \frac{V_{amostra}[X]}{V_{total}}$$

$$s_{analito} = aV_{padrão} + b$$

$$\frac{a}{b} = \frac{K[P]}{KV_{amostra}[X]}$$

$$aV_{amostra}[X] = b[P]$$

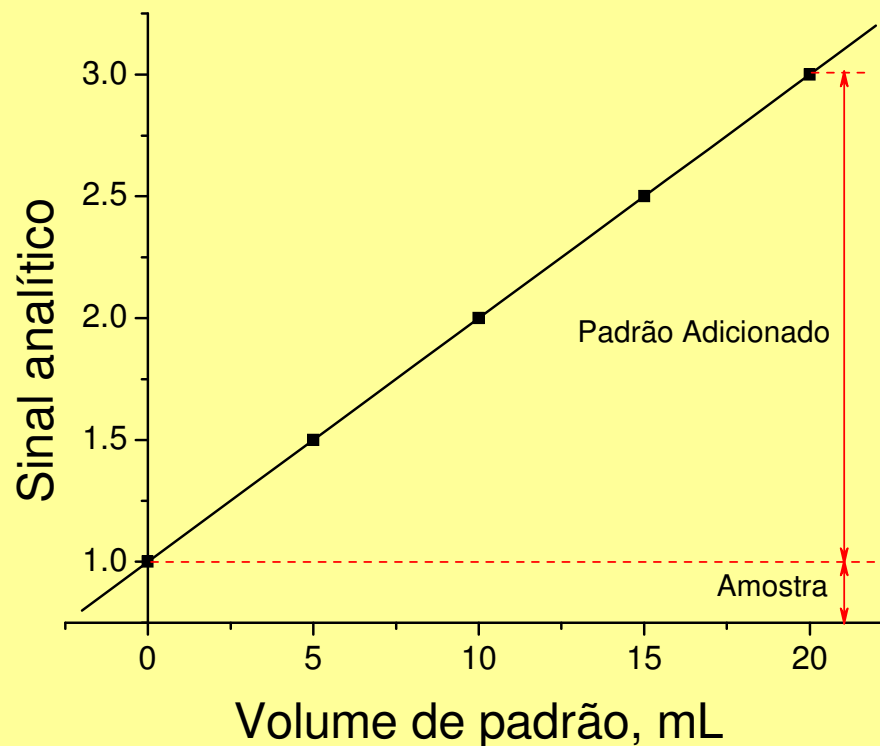
$$[X] = \frac{b[P]}{aV_{amostra}}$$

$$s_v = \frac{s_y}{|a|} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\bar{y}_c)^2}{a^2 \sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

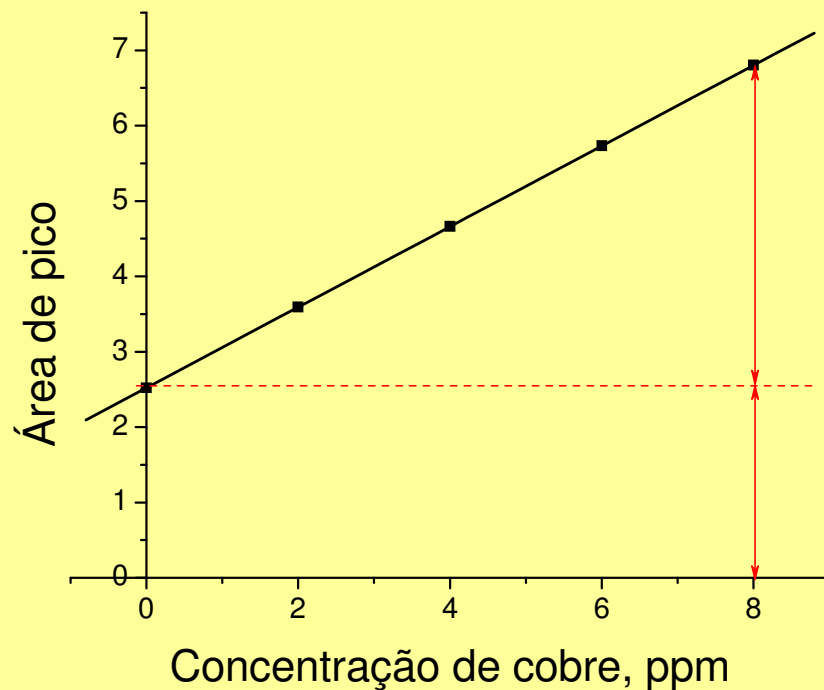
$$s_c = s_v \left(\frac{[P]}{V_{amostra}} \right)$$

$$\text{onde; } a = K \frac{[P]}{V_{total}}$$

$$b = K \frac{V_{amostra}[X]}{V_{total}}$$



➤ Determinação de cobre em cachaça:



[Cu], ppm	área
0	2,52
2	3,59
4	4,66
6	5,73
8	6,80

$$\begin{aligned} \text{área} &= 2,52 + 0,535x[\text{Cu}] \\ \text{área} = 0 &= 2,52 + 0,535x[\text{Cu}] \\ [\text{Cu}] &= 4,71 \text{ ppm} \end{aligned}$$

Análise pontual:

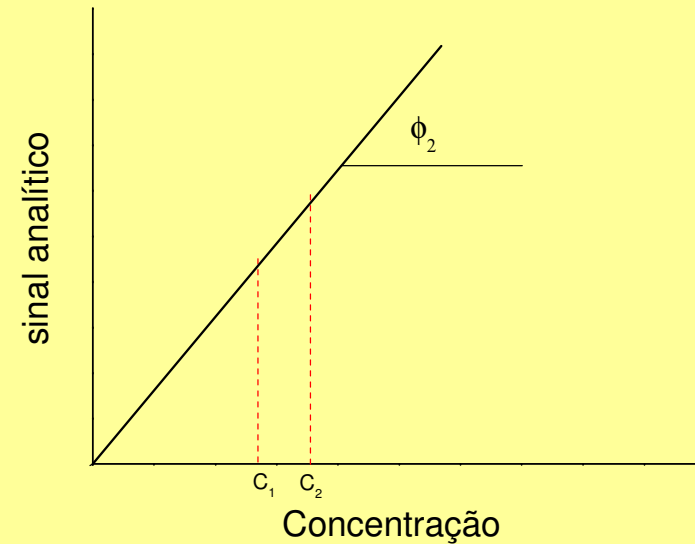
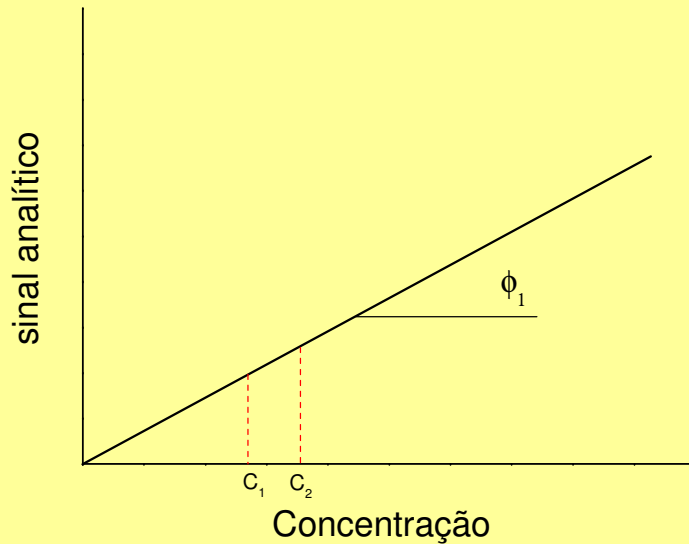
$$\begin{aligned} \frac{[\text{Cu}]_i}{4 + [\text{Cu}]_i} &= \frac{2,52}{4,66} \\ 4,66[\text{Cu}]_i &= 10,08 + 2,52[\text{Cu}]_i \\ [\text{Cu}]_i &= 4,71 \text{ ppm} \end{aligned}$$

➤ SENSIBILIDADE ANALÍTICA:

É a capacidade de responder de forma confiável e mensurável às variações de concentração do analito.

Também expressa a capacidade técnica em diferenciar dois valores de concentração próximos, assim a sensibilidade do método depende da inclinação da curva.

Exemplo: 10,1 g/L e 10,2 g/L



$$sensibilidade_analítica = \frac{a}{S_a}$$

$$sensibilidade_da_calibração = a$$

➤ SELETIVIDADE OU ESPECIFICIDADE:

Depende de quanto o método é indiferente à presença na amostra de espécies que poderiam interferir na determinação do analito.

A espécie de interesse deve ter sinal analítico isento de interferências que possam levar a confusão na identificação ou dar margem a não confiabilidade ao resultado final.

➤ LIMITE DE DETECÇÃO:

O limite de detecção (LD) é a menor concentração que pode ser distinguida com um certo nível de confiança. Toda técnica analítica tem um limite de detecção. Para os métodos que empregam uma curva analítica, o limite de detecção é definido como a concentração analítica que gera uma resposta com um fator de confiança k superior ao desvio padrão do branco (amostra com concentração de 1 a 5 vezes maior que o limite de detecção estimado), s .

$$LD = \frac{ks}{a}$$

a é a sensibilidade da calibração (a) e k é escolhido como 2 (92,1 %) ou 3 (98 %).

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 OU DETERMINAÇÃO:

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração que pode ser determinada em confiabilidade de precisão e exatidão aceitáveis, para aquela condição analítica. Para o limite de quantificação considera-se que não se atingiu o limite da técnica/método ou equipamento. Para os métodos que empregam uma curva analítica, o limite de quantificação é definido como a concentração analítica que gera uma resposta com um fator de confiança igual a 10.

$$LQ = \frac{10s}{a}$$

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.

➤ 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.

$$\%recuperação = \frac{C_{amostra_fortificada} - C_{amostra_não_fortificada}}{C_{adicionada}} \times 100$$

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 foi feita numa porção idêntica da amostra desconhecida. A análise da amostra modificada forneceu uma concentração de 14,6 µg/L. Determine o percentual de recuperação da substância intencionalmente adicionada.

➤ REPETIBILIDADE OU REPETIVIDADE:

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

➤ REPRODUTIVIDADE OU 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 contruir 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. Brancos.

➤ PRECISÃO:

1. Amostras repetidas (repetibilidade).
2. Porções repetidas da mesma amostra (reprodutibilidade).