

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ESPECTROFOTOMÉTRICA NO UV/VISÍVEL ADAPTADA PARA DETERMINAÇÃO DE FOSFATO EM MANANCIAIS HÍDRICOS DE PELOTAS/RS

MAYLA TALITTA VIEIRA COSTA¹; ROBERTO MARTINS DA SILVA DÉCIO JÚNIOR²; ANDERSON ANDREI NOSCHANG², IDEL CRISTIANA BIGLIARDI MILANI³

¹Universidade Federal de Pelotas – mayla_thalita@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – roberto.decio.jr@gmail.com, noschang.anderson@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – idelmilani@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

O fósforo é um elemento essencial à vida aquática (BAUMGARTEN et al., 2010). É um mineral encontrado na água em quantidade variável, principalmente na forma de fosfato, sendo um dos principais nutrientes responsáveis pelo desenvolvimento e formação de microrganismos, assim como a estabilização da matéria orgânica. A sua presença em águas superficiais se deve a contribuição por fontes antropogênicas, sendo estas: despejos domésticos, industriais, presença de detergentes fosfatados, entre outros. Dependendo de seu aporte e em condições específicas, pode conduzir ao fenômeno de eutrofização dos corpos hídricos (VON SPERLING, 1996).

Sendo assim, é de extrema importância desenvolver-se metodologias eficientes para determinação da concentração de fósforo em ambientes aquáticos. Essa eficiência do método analítico é verificada através da sua validação, que se faz necessária para o entendimento do estudo, pois garante as características de desempenho e demonstra que o procedimento adotado é cientificamente coeso. Ter validado um resultado significa que o procedimento, que inclui desde as condições de operação do equipamento até toda a seqüência analítica, seja aceito como correto (SILVA; ALVES, 2006).

Neste contexto, o presente estudo objetivou validar uma adaptação da metodologia proposta por BAUMGARTEN et al. (2010), para análise e quantificação do fósforo presente em águas naturais do município de Pelotas/RS.

2. METODOLOGIA

Reagentes e Solução Padrão trabalho de fosfato

O preparo da solução padrão trabalho de fosfato foi feita a partir da solução da diluição da solução estoque de 5000µM de P-PO₄³⁻, utilizando vidrarias volumétricas calibradas. Já as soluções utilizadas para provocar as reações do método foram de molibdato de amônio, ácido sulfúrico 5N, ácido ascórbico e antimônio tartarato de potássio.

Equipamentos

Utilizou-se o espectrofotômetro UV/Visível Bel® modelo S-2000 e balança analítica Bel® modelo Top Loading série MW. Para o preparo de todas as soluções foram utilizadas vidrarias volumétricas e pipetadores automáticos.

Desenvolvimento do Método Analítico

No processo de validação da metodologia analítica utilizou-se os seguintes parâmetros para obtenção dos resultados: Especificidade e Seletividade, Linearidade, Exatidão, Precisão, Limites de detecção e quantificação e Robustez, segundo o preconizado pelo “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos” (Brasil, 2003).

O ensaio de Especificidade e Seletividade baseou-se numa varredura de 700nm até 930nm no espectrofotômetro em duas amostras de soluções padrão de fosfato de 5,0 μ M, sendo adicionado numa delas amostra do Canal São Gonçalo, a fim de verificar se não há grandes variações nos resultados na presença de impurezas da matriz deste principal manancial hídrico da cidade.

A Linearidade foi verificada determinando, em triplicata, a absorbância de 9 concentrações (1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 10,0; 15,0; 25,0 e 35,0 μ M) e verificando sua linearidade através da curva obtida no Microsoft Office Excel, definindo a equação e o coeficiente da correlação linear (mínimo aceitável: $R^2 = 0,99$).

A precisão e a exatidão foram verificadas através da medição das concentrações, medidas em triplicata, de padrões de fósforo de 1 μ M, 15 μ M e 30 μ M, frente a curva construída na linearidade. A exatidão foi avaliada analisando a proximidade dos resultados obtidos em relação ao valor verdadeiro, na forma de Erro relativo (ER), calculado pela equação 1:

$$ER(\%) = 100 \times CME/CT \quad (1)$$

onde CME é a concentração média encontrada, e CT , a concentração teórica. Já a precisão, foi avaliada através do Desvio Padrão Relativo (DPR - máximo aceitável: 5%) das concentrações encontradas no mesmo dia e pelo mesmo analista (repetibilidade), e na repetição da bateria de testes em outro dia, por outro analista, no mesmo laboratório e com o mesmo equipamento (precisão intermediária).

Os limites de detecção e quantificação foram determinados, como recomendado em BRASIL (2003), através das seguintes equações:

$$LD = \frac{3 \times DPa}{IC} \quad (2)$$

$$LQ = \frac{10 \times DPa}{IC} \quad (3)$$

onde Dpa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y das 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação, e IC é a inclinação da curva de calibração.

Para avaliar a robustez do método, o parâmetro analítico a ser variado foi o pH de uma amostra do Canal São Gonçalo, estando uma no seu pH original - 7,22 - e outra com pH igual a 6,15. Estes valores estão próximos aos valores extremos de pH encontrados em monitoramentos anteriores do Canal. As concentrações das amostras foram medias em triplicata em cada estado de pH, utilizando-se então do Desvio Padrão Relativo para avaliar a variação resultado dos diferentes estados de pH.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Especificidade

De acordo com os dados obtidos, pôde ser analisado através da figura 1 que o pico de absorção máxima, em ambos os padrões, foi em torno de 860nm, muito próximo ao comprimento de onda utilizado em BAUMGARTEN et al. (2010). (885nm).

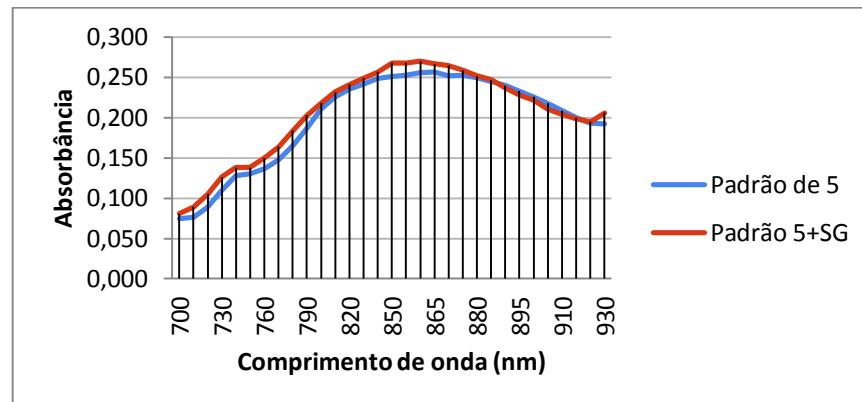


Figura 1. Especificidade do método obtido com padrão de 5,0 μ M de fosfato e com um padrão de ~5,0 μ M (obtido com a adição amostra do Canal São Gonçalo –SG- o padrão de 5,0 μ M)

Linearidade

A análise de regressão linear dos mínimos quadrados apresentou um coeficiente de correlação de 0,9998, indicando linearidade dentro dos limites das concentrações estudadas, obtendo-se a equação da reta $y = 0,0188 + 0,0014x$.

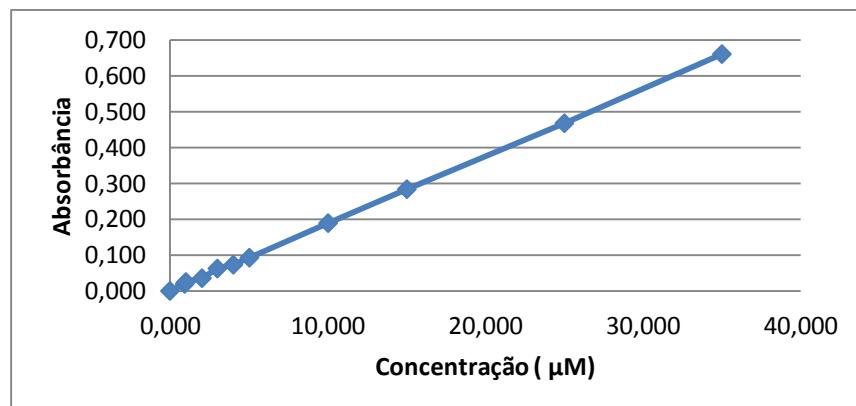


Figura 2: Curva obtida no teste de Linearidade

Exatidão e Precisão

Os resultados dos testes para Exatidão e precisão encontram-se na Tabela 1 abaixo:

	CT (μM)	CME (μM)	DP	DPR (%)	ER (%)
Analista 1	1	0,95	0,03	3,22	95,39
	15	15,39	0,16	1,06	102,58
	35	30,87	0,32	1,04	102,88
Analista 2	1	0,92	0,03	3,34	91,84
	15	15,49	0,43	2,78	103,29
	35	31,04	0,24	0,79	103,48

Tabela 1: Resultados dos testes de exatidão e precisão

Percebe-se que os valores de DPR ficaram dentro dos 5% aceitáveis. Além disso, o erro não superou os 5%, o que se mostra satisfatório no contexto de amostras ambientais.

Limites de Detecção e Quantificação

Através das curvas obtidas no teste de linearidade e das equações 2 e 3, obtemos limites de detecção e quantificação, respectivamente, de 0,24 e 0,80 μ M, verificando assim que o método possui sensibilidade adequada aos objetivos pretendidos, sem sofrer grande desvio devido a fatores intrínsecos do equipamento.

Robustez

A concentração média das seis medições foi de 6,12 μ M, com um Desvio padrão Relativo de 1,2%, menor que 5%, ou seja, o método é robusto em relação à variações de pH do Canal São Gonçalo.

4. CONCLUSÕES

Após análises feitas conclui-se que a metodologia adaptada é válida, apresentando resultados coesos e confiabilidade requerida para um método analítico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAUMGARTEN, M. G. Z., WALLNER-KERSANACH, M., NIENCHESKI, L. F. H. **Manual de Análises em Oceanografia Química**. 2 ed. Rev. e aum. – Rio Grande: Editora da FURG, 2010.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). R. E, nº 899 de 29 de maio de 2003 – Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Acessado em 15 de junho de 2015. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?mode=PRINT_VERSION&id=15132>

ALVES, L. D. S., ROLIM, L. A., FONTES, D. A . F., ROLIM-NETO, J., SOARES, M. F. R., SOBRINHO, J. L .S. Desenvolvimento de método analítico para quantificação do Efavirenz por espectrofotometria no UV-Vis. **Química Nova**, v.33, n.9, p.1967 – 1972, 2010.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S., SILVA, C. H. T. P., NASCIMENTO J. E., MONTEIRO, J. M., ALBURQUERQUE, U. P., AMORIM, E. L. C. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de Bauhinia cheilantha (Bongard) Steudel. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 683-689, out./dez., 2008.

RESOLUÇÃO CONAMA, O CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Nº 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005. Acessado em 21 de Julho de 2015. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>