



## **Coordenação Geral de Acreditação**

# **MEDIÇÕES ANALÍTICAS SOBRE A TÉCNICA DE ESPECTROFOTOMETRIA UV-Vis**

**Documento de caráter orientativo**

**DOQ-CGCRE-096**

**Revisão: 00 - ABR/2021**



## SUMÁRIO

- 1 Objetivo
- 2 Campo de Aplicação
- 3 Responsabilidade
- 4 Histórico das Revisões
- 5 Documentos de Referência
- 6 Documentos Complementares
- 7 Siglas
- 8 Definições
- 9 Introdução
- 10 Espectrofotometria
- 11 Rastreabilidade Metrológica dos Ensaios por Espectrofotometria UV-Vis
- 12 Boas Práticas de Laboratório em Espectrofotometria
- Anexo A

### 1 OBJETIVO

Este documento tem como objetivo fornecer aos laboratórios de ensaio acreditados e postulantes à acreditação, que utilizam a técnica de espectrofotometria de ultravioleta-visível, orientações básicas sobre o uso de espectrofotômetros UV/Vis.

### 2 CAMPO DE APLICAÇÃO

Este documento aplica-se à Dicla, aos laboratórios de ensaio acreditados e postulantes à acreditação, que utilizam métodos espectrofotométricos, e aos avaliadores e especialistas que atuam nos processos de acreditação de laboratórios de ensaio. Este documento não se aplica a fotocolorímetros e colorímetros.

### 3 RESPONSABILIDADE

A responsabilidade pela revisão deste documento é da Dicla.

### 4 HISTÓRICO DAS REVISÕES

Revisão	Data	Itens revisados
0	ABR/2021	- Documento inicial.

### 5 DOCUMENTOS DE REFERÊNCIA

Aplicam-se as últimas edições dos seguintes documentos:

ABNT ISO GUIA 30	Materiais de referência – Termos e definições selecionados
ABNT ISO GUIA 31	Materiais de referência – Conteúdo de certificados, rótulos e documentação associada

(continua)



ABNT ISO GUIA 33	Materiais de referência – Boas práticas no uso de materiais de referência
ABNT ISO GUIA 35	Materiais de referência – Princípios gerais e estatísticos para certificação
ABNT NBR ISO 17034	Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência
ASTM E958 - 13	“Standard Practice for Estimation of the Spectral Bandwidth of Ultraviolet-Visible Spectrophotometers”.
CENAM	Guía Técnica Sobre Trazabilidad e Incertidumbre en las Mediciones Analíticas que Emplean la Técnica de Espectrofotometría de Ultravioleta-Visible; México, 2008
Cienfuegos, F.; Vaitsman, D.	“Análise Instrumental”, 2000
Debossan, L. F., Carvalho, E. M. S., Souza, M. A., Gomes, J. F. S.	“A importância da calibração de espectrofotômetros para a indústria de petróleo e petroquímica”, V Mostra de Trabalhos de Cursos Técnicos, Unicamp, São Paulo, 2015
Gomes, J. F. S., Guedes, M. B., Couceiro, I. B., Grieneisen, H. P.	“Desempenho de Espectrofotômetros UV/VIS/IVP: Emprego dos Materiais de Referência”, ENQUALAB, São Paulo, 2008
Harris, D.C.	“Análise Química Quantitativa”, 7ª ed., LTC, 2008.
IUPAC 1986	Quantitative Characterization of Procedures Using Ultraviolet and Visible Molecular Absorption Spectrophotometry
NIT-Dicla-021	Expressão da Incerteza de Medição
NIT-Dicla-030	Rastreabilidade ao Sistema Internacional de Unidades na Acreditação de Laboratórios
Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A.	“Princípios de Análise Instrumental” 5ª ed., Bookman, 2002.
Technical guide	UV/Vis Spectrophotometer Calibration Procedures; International Accreditation New Zealand; maio de 2005
VIM 2012	Vocabulário Internacional de Metrologia – Conceitos fundamentais e gerais e termos associados
Vogel, A.I.	“Análise Química Quantitativa”, GH Jeffrey e col., 6ª ed., Guanabara Koogan, 2002.

## 6 DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

ABNT NBR ISO/IEC 17025	Requisitos Gerais para Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração
ASTM E387 - 04, 2014	“Standard Test Method for Estimating Stray Radiant Power Ratio of Dispersive Spectrophotometers by the Opaque Filter Method”.
ASTM E925 - 09, 2014	“Standard Practice for Monitoring the Calibration of Ultraviolet-Visible Spectrophotometers whose Spectral Bandwidth does not Exceed 2 nm”.
ASTM E1866 - 97, 2013	“Standard Guide for Establishing Spectrophotometer Performance Tests”.
DOQ-Cgcre-008	Orientação sobre validação de métodos analíticos



## 7 SIGLAS

AA	Absorção atômica
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials (Sociedade Americana para Ensaios e Materiais)</i>
Cgcre	Coordenação Geral de Acreditação
CT	Comissão Técnica
Dicla	Divisão de Acreditação de Laboratórios
Doq	Documento Orientativo da Qualidade
IEC	<i>International Electrotechnical Committee (Comitê Internacional Eletrotécnico)</i>
Inmetro	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ISO	<i>International Organization for Standardization (Organização Internacional para Normalização)</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry (União Internacional de Química Pura e Aplicada)</i>
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MR	Material de Referência
MRC	Material de Referência Certificado
NBR	Norma Brasileira
RBC	Rede Brasileira de Calibração
SI	Sistema Internacional de Unidades
UV	Ultravioleta
Vis	Visível

## 8 DEFINIÇÕES

### 8.1 Absorbância, $A$

O logaritmo na base 10 do inverso da transmitância ( $T$ ).

### 8.2 Comprimento de Onda, $\lambda$

A distância, medida ao longo da linha de propagação, entre dois pontos que estão em fase ou ondas adjacentes e cuja unidade no SI é o nanômetro (nm).

### 8.3 Concentração, $C$

A quantidade de soluto dissolvida em uma dada quantidade de solvente ou em uma dada quantidade de solução.

### 8.4 Largura de banda espectral

Do inglês *Spectral Bandwidth* (SBW) é definida como a largura ou intervalo da banda de luz emitida pela fenda de um monocromador medido no centro do pico máximo. A banda espectral também serve como um limitante para as calibrações dos espectrofotômetros. Atualmente, só se consegue calibrar espectros com largura de banda máxima de 10 nm. A impossibilidade de calibrar instrumentos com maior largura de banda se deve à impossibilidade de gerar rastreabilidade nas medições.



### 8.5 Largura de fenda espectral

É a largura ou intervalo total de distribuição dos comprimentos de onda em relação ao pico máximo do comprimento de onda selecionado no instrumento. Este parâmetro está diretamente vinculado à fenda física do monocromador. A largura da fenda espectral é sempre maior que a largura de banda espectral.

### 8.6 Linearidade fotométrica

É a capacidade de um sistema fotométrico de proporcionar uma relação linear entre a luz incidente sobre o detector e alguma quantidade mensurável proporcionada ao sistema.

### 8.7 Transmitância, $T$

A relação entre a energia radiante transmitida pela amostra e a energia radiante incidente na amostra.

### 8.8 Ultravioleta, UV

Região do espectro eletromagnético de aproximadamente 10 nm a 380 nm. O termo ultravioleta sem qualificação adicional normalmente refere-se à região de 200 nm a 380 nm.

### 8.9 Visível, Vis

Região de energia radiante do espectro eletromagnético visível ao olho humano normal (aproximadamente de 380 nm a 780 nm).

## 9 INTRODUÇÃO

Os resultados das medições são garantidos pela rastreabilidade metrológica e pela estimativa de incerteza de medição. A confiança em um resultado de uma medição é de suma importância para a tomada de decisões.

O resultado de um ensaio é de modo geral a declaração da conformidade ou não conformidade com o requisito estabelecido por uma norma ou especificação. Este resultado pode ser sustentado conforme:

- a) o exame direto de um atributo;
- b) a conclusão sobre um atributo a partir do resultado da medição; ou,
- c) a realização direta de medições.

A calibração de instrumentos, padrões e uso de materiais de referência, são elementos fundamentais na tarefa de garantir a rastreabilidade das medições, que se inicia nos padrões nacionais de medida para chegar à maior quantidade de usuários possível. Ao avaliar a conformidade, os institutos nacionais de metrologia e os laboratórios de calibração acreditados têm a responsabilidade de estender a rastreabilidade das medições aos laboratórios de ensaio e, assim, aos demais usuários. Por sua parte, os laboratórios de ensaio, apoiados na confiabilidade das medições, são responsáveis pela avaliação da conformidade de produtos e serviços em relação às normas, documentos de referência, documentos orientativos ou especificações, garantindo assim a rastreabilidade das medições.

O propósito deste documento orientativo é estabelecer os critérios e requisitos na aplicação da técnica de medição por espectrofotometria UV-Vis, para obter medições com rastreabilidade metrológica e incerteza confiáveis.



Não é pretensão deste documento substituir outros documentos orientativos, apenas é uma complementação ao que já existe em termos de rastreabilidade metrológica e avaliação de incerteza de medição.

## 10 ESPECTROFOTOMETRIA

A espectrofotometria é definida como qualquer processo analítico que utiliza a luz, ou seja, absorção de energia eletromagnética por moléculas. Este processo depende tanto da concentração quanto da estrutura dessas moléculas. Em função do intervalo de frequência da energia eletromagnética aplicada, a espectrofotometria de absorção, de modo didático, pode ser considerada na região de ultravioleta, visível ou infravermelho. Estas técnicas podem ser utilizadas para identificação e/ou quantificação de substâncias. Serão tratadas, neste documento, as medidas realizadas utilizando-se absorção de radiação eletromagnética, nas regiões ultravioleta (200 nm - 380 nm) e visível (380 nm - 780 nm) do espectro eletromagnético.

### 10.1 A lei de Bouguer-Lambert e Beer

Levando-se em consideração que cada substância tem um espectro característico é possível identificar uma substância desconhecida comparando-se a curva de absorção desta substância com a curva de absorção de substâncias conhecidas. Além disso, é possível determinar a quantidade de uma substância em uma solução analisada, se o espectro de absorção dessa substância for conhecido.

Exemplificando, considerando-se um bloco de material absorvente, seja esta amostra um material sólido, líquido ou gasoso. Um feixe paralelo de luz passa por um monocromador (um prisma, uma rede de dispersão ou mesmo um filtro) para selecionar o comprimento de onda (a luz de um único comprimento de onda é denominada monocromática). A luz monocromática com potência  $I_0$  incide no bloco perpendicularmente à superfície. Após passar através de uma espessura  $d$  do material, que contém  $n$  átomos, íons ou moléculas absorventes, sua potência decresce para  $I$  como resultado da absorção, dessa forma  $I \leq I_0$ .

Quando não há absorção de luz,  $I = I_0$  e  $A = 0$ . No entanto, se 90% da luz for absorvida, 10% será transmitida e  $I = I_0/10$ . Desta razão temos  $A = 1$ . Se apenas 1% da luz for transmitida,  $A = 2$ .

A Lei de Bouguer-Lambert e Beer estabelece que a absorbância é diretamente proporcional à concentração da espécie absorvente. A fração de luz que passa por uma amostra (Transmitância) está relacionada logaritmicamente, e não linearmente, com a concentração da amostra.

$$A = \xi \times d \times C$$

Onde:

$A$  = Absorbância

$d$  = Caminho da radiação, expresso geralmente em *cm* ou outra unidade de comprimento;

$C$  = Concentração, podendo ser expresso em mol/L ou em outras unidades de concentração;

$\xi$  = Absortividade molar, definida como  $\frac{A}{cd}$ , alternativamente conhecida como Coeficiente molar de extinção; em que;  $d$  está expresso em *cm* e  $C$  em mol/L.

A relação logarítmica de  $I_0/I$  com a concentração surge porque em cada porção infinitesimal do volume total, a diminuição na energia é proporcional à energia incidente naquela seção. Assim que a luz passa pela amostra, a perda de energia em cada camada sucessiva diminui, porque a magnitude da energia incidente que alcança cada camada está diminuindo.



Poucas exceções são encontradas para a generalização de que a absorvância está relacionada linearmente com o caminho ótico. Por outro lado, desvios da proporcionalidade entre a absorvância medida e a concentração quando  $d$  é constante são encontrados frequentemente. Alguns desses desvios são fundamentais e representam limitações reais dessa lei. Outros ocorrem em consequência de desvios instrumentais ou desvios químicos, como resultado de mudanças químicas associadas com variações de concentração.

## 10.2 Espectrofotômetro UV-Vis

Um espectrômetro ótico é um instrumento que dispõe de um sistema ótico capaz de provocar a dispersão da radiação eletromagnética incidente, e com o qual podem-se fazer medidas da radiação transmitida num certo comprimento de onda da faixa espectral. Um fotômetro destina-se a medir a intensidade da radiação transmitida ou uma função desta intensidade. Um espectrômetro e um fotômetro, combinados em um espectrofotômetro, podem gerar um sinal que corresponde à diferença entre a radiação transmitida por um material utilizado como referência (solventes ou soluções utilizadas como branco de reações) e a radiação transmitida pela amostra analisada, num certo comprimento de onda.

O espectrofotômetro é constituído por quatro componentes básicos: fonte de luz, seletor de comprimento de onda, recipiente para amostra, transdutores de radiação e processadores de sinal.

Para medidas de absorção molecular, necessita-se de uma fonte contínua cuja potência não varie bruscamente em uma faixa considerável de comprimento de onda. Três tipos de fonte de luz são normalmente utilizados em espectrofotômetros UV-Vis: lâmpadas de deutério para a emissão de luz UV, lâmpadas de filamento de tungstênio para a emissão de luz Vis e mais recentemente lâmpadas de arco de xenônio que emitem tanto luz UV como Vis. Para os seletores de comprimento de onda, são encontrados dois tipos: filtros e monocromadores.

Com relação aos transdutores de radiação, idealmente devem apresentar alta sensibilidade, alta relação sinal-ruído e uma resposta constante sobre um intervalo considerável de comprimento de onda. Existem dois tipos gerais de transdutores de radiação: um responde a fótons, conhecidos como detectores fotoelétricos ou quânticos que têm uma superfície ativa capaz de absorver radiação; o segundo responde ao calor, largamente empregados para detecção de radiação infravermelha. O processador de sinal nada mais é do que um dispositivo eletrônico que amplifica o sinal elétrico do transdutor.

As análises espectroscópicas necessitam de radiação constituída de um grupo estreito de comprimento de onda, limitado e contínuo, chamado de banda. Quanto mais estreita for a largura da banda melhor será o desempenho do dispositivo, maior será a sensibilidade para medidas de absorvância, podendo fornecer seletividade afim de se obter uma relação linear entre o sinal ótico e a concentração.

Nas análises utilizando espectrofotômetros UV-Vis, uma amostra líquida é geralmente colocada numa célula de quartzo denominada de cubeta, que possui faces planas de sílica ( $\text{SiO}_2$ ) fundida ou quartzo para se trabalhar na região de ultravioleta (abaixo de 350 nm). O vidro de silicato é apropriado apenas para medidas no visível na região entre 350 nm e 2000 nm. As cubetas mais comuns possuem largura de 1,0 cm. Vale ressaltar que as cubetas devem ser usadas e mantidas sem impressões digitais, gordura ou outros depósitos nas paredes, pois alteram significativamente as características de transmitância da cubeta. Sendo assim as superfícies transparentes das cubetas nunca devem ser tocadas durante o manuseio e é obrigatória uma cuidadosa limpeza antes e após o uso.

Além da diferença entre os componentes constituintes de um espectrofotômetro, podem-se citar três tipos de equipamentos: os de feixe simples, feixe duplo e multicanal.



Os equipamentos de feixe simples possuem apenas um feixe de luz, e são limitados a uma leitura por vez, ou seja, a amostra e a referência devem ser colocadas alternadamente na direção do feixe. Para medidas em vários comprimentos de onda, a referência deve ser lida em cada comprimento de onda. Este tipo de equipamento não é o melhor para alguns usos como, por exemplo, em experimentos de cinéticas, onde as medições de absorvância acontecem em função do tempo e tanto a intensidade da fonte de luz como a sensibilidade do detector sofrem variações no tempo, demandando ajustes constantes.

Nos instrumentos de feixe duplo, a luz passa alternadamente pelas cubetas da amostra e de referência, direcionada por um motor que gira um espelho para dentro e para fora do caminho de luz. Quando o divisor rotatório não está desviando o feixe, a luz passa pela amostra, e o detector mede a energia radiante que se denomina de  $I$ . Quando o alternador desvia o feixe para a cubeta de referência, o detector mede  $I_0$ . O feixe é desviado várias vezes por segundo e o conjunto de circuitos compara automaticamente  $I$  e  $I_0$  para obter a transmitância e a absorvância. Este processo proporciona uma correção automática para as mudanças da intensidade da fonte e da sensibilidade do detector com o tempo e o comprimento de onda, porque a energia que sai das duas amostras é comparada frequentemente.

Com relação à leitura das amostras, em um equipamento de espectrofotometria, podemos citar as duas formas mais comumente utilizadas: a forma manual, onde cubetas de vidro ou quartzo (dependendo do comprimento de onda) são colocadas nos compartimento de amostras e de referência e, então, inseridas lidas e a forma de fluxo contínuo, utilizando bombas peristálticas para circular a amostra por dentro da célula de fluxo contínuo e a mesma que permanece fixa dentro do espectrofotômetro, a leitura vai acontecendo continuamente na medida que a amostra vai circulando pela célula.

## 10.3 Mensurando

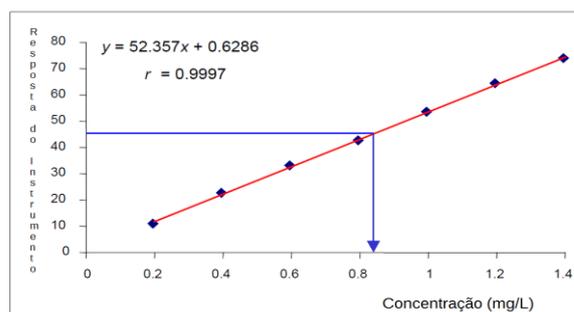
### 10.3.1 Inserção de curvas de calibração

#### 10.3.1.1 Regressão Linear

##### 10.3.1.1.1 Introdução

A regressão linear é usada para estabelecer a relação de conformidade entre duas variáveis. Em química analítica, a regressão linear é amplamente usada na construção de funções de calibração em técnicas analíticas como a cromatografia, espectrometria de absorção atômica (AA), espectrofotometria UV/Vis, entre outras, em que são esperadas relações lineares entre as respostas analíticas e os valores de concentração dos padrões. A figura 1 apresenta como exemplo um gráfico de uma curva de calibração da resposta do instrumento vs. Concentração.

Figura 1 – Representação de uma curva de calibração (Adaptado de "Preparation of Calibration Curves – A Guide to Best Practice"; Vicki Barwick; LGC Limited e VAM; 2003)





Qualquer conjunto de pares de dados pode ser disposto graficamente um em relação ao outro e analisado, para observar a relação entre os pares de dados. Em química analítica, o conjunto de pares de dados frequentemente corresponde à resposta do instrumento e à concentração do analito. Se existe algum motivo pelo qual se acredita que o valor de uma variável depende do valor da outra, então esta variável é conhecida como variável dependente. A variável dependente normalmente é fixada no eixo **Y**. Em química analítica, a relação entre estas variáveis é fundamental. O objetivo da regressão é estabelecer esta relação em forma de uma equação e estudar outros aspectos da calibração.

A equação genérica que descreve uma linha reta é apresentada na equação 1:

$$Y = a + b * X \quad (\text{Equação 1})$$

Aonde **b** é o coeficiente angular ou a inclinação da reta e **a** é o intercepto ou a intercepção no eixo **Y**. A regressão linear pelo método dos mínimos quadrados é utilizada para estabelecer os valores da inclinação **b** e da intercepção **a**. A melhor equação que atenda a linha reta é obtida da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, ou seja, a linha que minimiza a soma da diferença dos quadrados entre as observações (medições) e os valores obtidos de **Y** com o uso da equação.

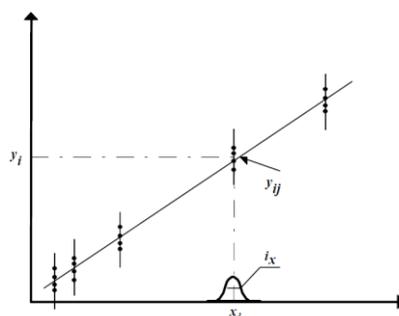
Para a confecção de uma curva de calibração, deve-se preparar um conjunto de padrões de concentração conhecida contendo o analito de interesse, obter a resposta do instrumento para cada padrão e estabelecer a relação entre a resposta do instrumento e a concentração do analito. Essa relação é usada para transformar as medições feitas em amostras, em estimativas de concentração do analito presente nas amostras.

#### 10.3.1.1.2 Premissas para uma Regressão Linear

- a) A regressão deve ser feita de **Y** (resposta do instrumento) em **X** (concentração).
- b) Os erros no eixo **X** devem ser desprezíveis. O laboratório deve possuir procedimentos documentados que garantam incertezas insignificantes no preparo dos padrões, em comparação com as variações aleatórias do instrumento.
- c) Os erros associados a **Y** devem ter uma distribuição normal, se existirem dúvidas quanto a esta distribuição, substituir um único valor pela média de no mínimo três medições de **Y** para cada valor de **X**, já que a média dos valores tem uma tendência a seguir uma distribuição normal, independentemente dos valores individuais medidos.  
O processo de validação do método do laboratório deverá responder se a variância dos erros experimentais é estatisticamente constante e só nesta situação pode ser aplicada a regressão linear simples (não ponderada), se a validação concluir que a variância dos erros não é estatisticamente constante ao longo da faixa, neste caso o laboratório está com um modelo heterocedástico nos erros e deverá aplicar a regressão linear ponderada. Não é pretensão deste documento abordar este tema, o laboratório deverá utilizar a vasta literatura disponível sobre o tema.
- d) A magnitude do erro nos valores de **Y** deve ser constante em toda faixa analisada. O desvio padrão deve ser constante. A regressão linear pelo método dos mínimos quadrados fornece peso igual para todos os pontos. Se houver pontos menos precisos que outros, dificilmente será obtida uma equação da reta bem ajustada (conforme exemplo apresentado na Figura 2).



Figura 2 – Normalização do erro associado a  $y$  por meio de replicatas (Adaptado de "Uncertainty Related with the Use of Linear Regression Analysis for the Correction of Calibrated Instruments"; A.S. Ribeiro e outros; XVII IMEKO World Congress; 2003)

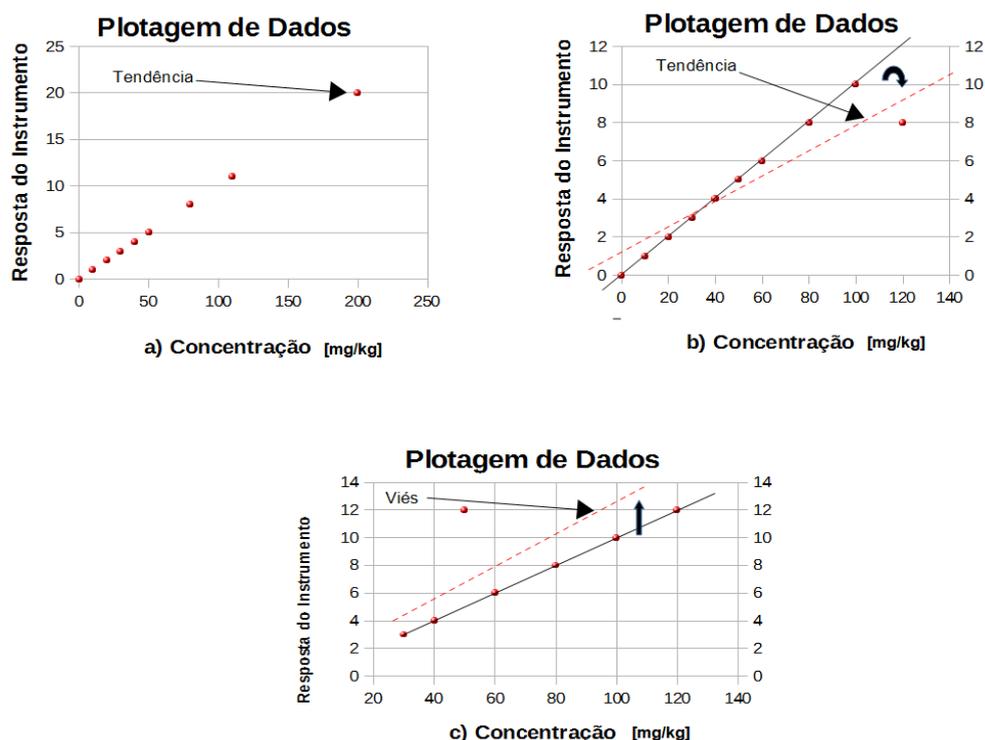


### 10.3.1.1.2 Avaliação visual do conjunto de dados da regressão

Antes de iniciar os cálculos de uma regressão, é recomendável primeiramente elaborar um gráfico para detectar qualquer ponto (medição) atípico ou de influência.

Os pontos atípicos (**outliers**) são os que visivelmente, no gráfico, não fazem sentido em relação ao conjunto completo de pontos. Tais pontos possuem grande influência nos valores médios calculados e, com maior intensidade, no desvio padrão. Normalmente, os pontos atípicos são produto de erros humanos ou de aberrações do processo analítico, como, por exemplo: falhas do instrumento ou inadequada preparação dos padrões. A Figura 3 apresenta exemplos da influência dos pontos atípicos num processo de plotagem de dados em uma curva de calibração.

Figura 3 – Pontos de Influência (Adaptado de "Practical Statistics for the Analytical Scientist a Bench Guide"; 2nd Edition; Stephen L. R. Ellison e outros; 2009)





Os pontos de influência, em uma curva de calibração, são aqueles que têm um efeito desproporcional com relação a sua posição na linha de regressão. Um ponto de influência pode ser um ponto atípico ou um ponto gerado por um inadequado planejamento experimental, como, por exemplo: o acúmulo de pontos fornecidos por padrões em uma parte da curva e poucos e distantes em outro extremo da curva. Os pontos de influência podem gerar um de dois efeitos na curva de calibração, ou uma forte tendência ou uma distorção (viés).

Pontos de influência nos extremos de uma curva de calibração podem mudar a posição da curva de calibração. Pontos de influência podem ser um grande problema se um ou dois pontos estão muito distantes de outros pontos no eixo **X** (Figura 3 - a); uma vez que pequenos erros na resposta da medição terão um efeito significativo na regressão da curva de calibração. Um ponto atípico (Figura 3 - b) pode mudar tanto a inclinação como a intercepção da curva, esses pontos atípicos têm uma alta influência na posição da curva de calibração.

Quando os pontos atípicos aparecem no meio da curva (Figura 3 - c), normalmente afetam pouco a inclinação da curva e esta pode se manter relativamente correta. No entanto, a intercepção da curva é afetada significativamente, já que a curva pode subir ou descer paralelamente à posição que deveria ter e isto pode ocasionar uma grave distorção (ou viés) nos resultados.

Para minimizar o impacto dos pontos atípicos, o analista deve adotar uma das seguintes estratégias:

- a) Confirmar que o ponto é um ponto atípico e não gerado por uma variação do processo analítico. Se for esse o caso, o analista deve, se necessário, inicialmente corrigir ou eliminar o dado, mas para tomar esta decisão o analista deve testá-lo estatisticamente. Existe uma variedade de testes de inconsistência que podem ser usados. Estes testes, por exemplo: Teste de Dixon, Teste de Grubbs, Teste de Cochran; etc., podem ser encontrados em vasta literatura de Estatística.
- b) Utilizar métodos estatísticos robustos quando o comportamento dos dados se distanciar da normalidade, isto é, métodos que são pouco afetados pelos pontos inconsistentes, como, por exemplo: usar a mediana em lugar da média de uma população.

#### 10.3.1.1.4 Cálculo da Inclinação “b” e Intercepto “a”

Para o cálculo da inclinação e intercepção pelo método dos mínimos quadrados, normalmente é usado um software como o OpenOffice calc ou o Microsoft Excel, mas antes de mostrar como usar estas ferramentas vejamos como é feito o cálculo manual.

A inclinação **b** é calculada com a seguinte equação:

$$b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} = \frac{\sum_1^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sum_1^n (X_i - \bar{X})^2} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

$X_i$  = Concentração de cada padrão utilizado para construir a curva

$Y_i$  = Resposta em absorvância do instrumento a cada padrão

Quando a reta passa pela origem, pode ser usada:

$$b = \frac{\sum X_i Y_i}{\sum X_i^2} \quad (\text{Equação 3})$$



Somente se recomenda que a reta passe pela origem quando a relevância do coeficiente linear é desprezível, novamente a validação do método tem esta responsabilidade.

A intercepção **a** é calculada com a seguinte equação:

$$a = \bar{Y} - b * \bar{X} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde  $\bar{Y}$  e  $\bar{X}$  são as médias dos valores localizados no eixo **Y** e no **X**, respectivamente.

Para o cálculo de “**a**” e “**b**” usando ferramentas de software comercial, utilizar os seguintes comandos:

=INCLINAÇÃO (Y<sub>1</sub>:Y<sub>i</sub>;X<sub>1</sub>:X<sub>i</sub>) Para calcular “**b**”

=INTERCEPÇÃO (Y<sub>1</sub>:Y<sub>i</sub>;X<sub>1</sub>:X<sub>i</sub>) Para o cálculo de “**a**”

Também pode ser usada a função:

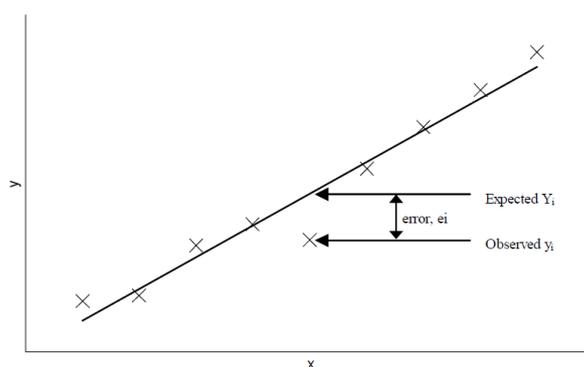
=PROJ.LIN(Y<sub>1</sub>:Y<sub>i</sub>;X<sub>1</sub>:X<sub>i</sub>;(0 ou 1);1)

Onde o valor zero será usado quando a reta passar pela origem e existir uma validação por parte do usuário de que suas curvas efetivamente passam pela origem.

#### 10.3.1.1.5 Desvio Padrão Residual e Variação Residual

Ao gerar uma curva de regressão por meio dos pontos (X<sub>i</sub>;Y<sub>i</sub>), ela normalmente não passa por todos os pontos que a originou, ocorrendo diferenças entre a curva gerada e o ponto X<sub>i</sub> as quais são denominadas de resíduos. A variação residual é o desvio padrão desses resíduos, conforme apresentado na figura 4.

Figura 4 – Resíduo entre o valor esperado e o valor observado - Mínimos quadrados dos resíduos (Adaptado de "Mechanical Engineering Experimentation; EM375 Statistics and Measurement Uncertainty – Least Squares Linear Regression Analysis"; Professor Colin Ratcliffe; <http://ratcliffe.site/USNA/index.php>; acessado em 02/03/2018)



Após a determinação da inclinação e do intercepto, pode-se calcular os resíduos bem como o desvio padrão residual.

O desvio padrão residual é a medida da dispersão dos valores das respostas do equipamento em relação aos valores obtidos pela equação da linha de regressão e seu cálculo é realizado considerando a seguinte equação:



$$s_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y})^2}{n-2}} \quad (\text{Equação 5})$$

como:

$$\hat{Y}_i = a + bX_i \quad (\text{Equação 6})$$

Substituindo-se:

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum (Y_i - a - bX_i)^2}{N-2}} \quad (\text{Equação 7})$$

Se o processo de validação indicar que  $a=0$  ou desprezível pode ser simplificado para:

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum (Y_i - bX_i)^2}{N-2}} \quad (\text{Equação 8})$$

Onde:

$Y_i$  = Valores experimentais de Y

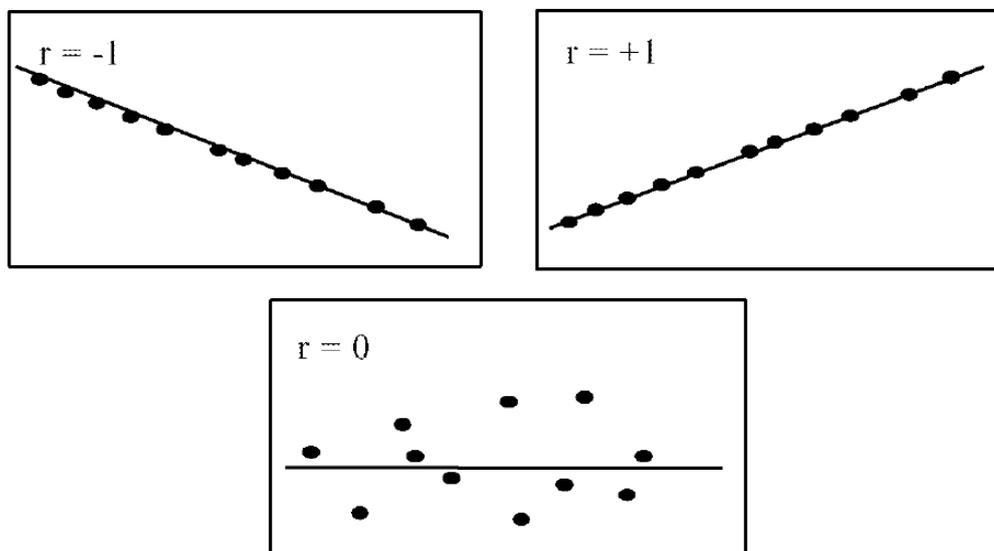
$\hat{Y}_i$  = Valores calculados de Y por meio da equação da regressão

N = Número de padrões utilizados para construir a curva

#### 10.3.1.1.5 Coeficiente de correlação "r" entre X e Y

O coeficiente de correlação (r) é o parâmetro que permite avaliar o grau de relacionamento linear entre dois conjuntos de dados (ou duas grandezas). Este coeficiente varia desde  $-1$  (relação negativa perfeita), passando por 0 (nenhuma relação), até  $+1$  (relação positiva perfeita), conforme pode ser observado a seguir na figura 5:

Figura 5 – Coeficiente de correlação entre X e Y (Adaptado de "Erros e Incertezas nas Medições"; Paulo Cabral; Instituto Electrotécnico Português (IEP); 2004)





A expressão analítica que permite determinar o coeficiente de correlação é:

$$r = \frac{S_{xy}}{\sqrt{S_{xx} S_{yy}}} \quad (\text{Equação 9})$$

$$r^2 = \frac{\sum \hat{Y}^2}{\sum Y^2} \quad (\text{Equação 10})$$

### 10.3.2 Avaliação da Incerteza de medição em ensaios espectrofotométricos

#### 10.3.2.1 Incerteza da curva de calibração

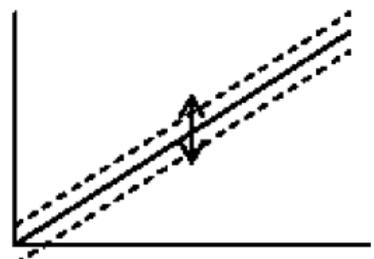
A incerteza da intercepção **a** e da inclinação **b** é dada por:

$$S_b = \frac{S_r}{S_x \sqrt{n-1}} \quad (\text{Equação 11})$$

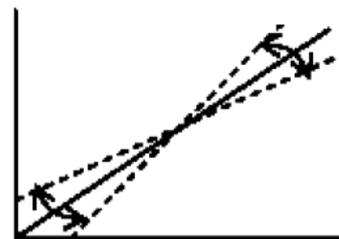
$$S_a = \pm \frac{S_r}{\sqrt{n}} \quad (\text{Equação 12})$$

O que se representa graficamente como mostrado na Figura 6:

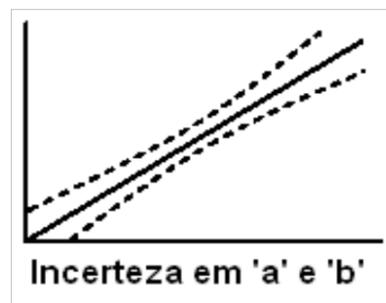
Figura 6 – Representação gráfica das incertezas dos coeficientes de uma reta (Adaptado de "Erros e Incertezas nas Medições"; Paulo Cabral; Instituto Electrotécnico Português (IEP); 2004)



Incerteza da intercepção (a)



Incerteza da inclinação (b)



Incerteza em 'a' e 'b'

Para a incerteza do analito desconhecido ( $X_v$ ), temos a seguinte relação:

$$u(\hat{X}_i) = \frac{S_r}{b} * \sqrt{\left[ \frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(Y_v - \bar{Y})^2}{b^2 * \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} \right]} \quad (\text{Equação 13})$$



$$u(\hat{X}_i) = \frac{Sr}{b} * \sqrt{\left[ \frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(X_v - \bar{X})^2}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} \right]} \quad (\text{Equação 14})$$

### 10.3.2.2 Outros componentes de incerteza

Outros componentes que podem gerar incerteza nos ensaios por espectrofotometria são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 Principais fontes de incerteza em ensaios por espectrofotometria UV/Vis

Etapa Operacional	Fontes de Incerteza	Grandezas
Amostragem	Coleta das amostras	Volume, Massa
Preparação das amostras	Secagem, digestão, diluições	Massa, Volume
Medição	Repetibilidade, precisão intermediária	Concentração de massa

### 10.4 Validação de Métodos em espectrofotometria

A validação de um método analítico, no caso, a espectrofotometria UV-Vis, é definida como o processo pelo qual é estabelecida, por estudos experimentais, que as características de eficiência do método espectrofotométrico correspondem aos requisitos necessários à aplicação analítica desejada.

Os parâmetros a serem avaliados, durante a etapa de validação de um método, variam de acordo com a aplicação, isto é, qualitativa ou quantitativa. Para métodos visando apenas a análise qualitativa, os parâmetros seletividade e limite de detecção são necessários. No entanto, para métodos quantitativos os principais parâmetros a serem avaliados são: seletividade, linearidade, precisão, tendência (recuperação), limite de detecção e limite de quantificação.

A seletividade ou especificidade é a capacidade de um método medir exatamente um composto na presença de outros componentes que possam estar presentes na amostra como impurezas, precursores de síntese, produtos de degradação e/ou componentes da matriz. A presença de qualquer outro composto (interferente) que absorva no mesmo comprimento de onda do analito pode resultar em erros na quantificação e identificação de uma determinada amostra. Se os possíveis interferentes forem conhecidos é possível fazer um espectro de ambos, interferente e analito, durante o desenvolvimento do método e escolher um comprimento de onda onde a absorção do analito seja mais significativa ou ainda onde não há absorção para o interferente.

Caso não haja possibilidade de escolha do melhor comprimento de onda, uma terceira alternativa é:

- selecionar um comprimento de onda em que o interferente e o analito possuem a mesma absorbância;
- realizar as medidas dos compostos separadamente e em conjunto e
- subtrair a absorbância do interferente.

A absorbância residual será a absorbância do analito. Caso a identidade e/ou espectro dos possíveis interferentes forem desconhecidos um experimento similar ao descrito anteriormente pode ser realizado. Se a concentração do analito for conhecida, seleciona-se o comprimento de onda em que a concentração melhor se aproxima do real, caso contrário, seleciona-se o comprimento de onda que resultar em menor concentração, o que deve ser o mais seletivo, pois interferentes tendem, na maioria das vezes, a aumentar a absorbância dos analitos.



A linearidade é definida como a capacidade de um método analítico obter resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra. Para medidas espectrofotométricas, a relação de linearidade é baseada na Lei de Bouguer-Lambert e Beer, em que a absorvância do analito é diretamente proporcional a sua concentração.

Se um comprimento de onda não apresentar linearidade, uma combinação de comprimentos de onda pode ser utilizada, além do uso de referência interna de comprimentos de onda, para eliminar erros na medida de linha de base também podem melhorar os resultados. Uma sugestão para avaliação das curvas de resposta pode ser encontrada no DOQ-Cgcre-008.

A precisão de um método avalia a proximidade dos resultados obtidos em uma amostragem múltipla. Os resultados relativos à precisão são expressos em valores de desvio padrão relativo. Se o nível de precisão adequado não for atingido, técnicas de redução de ruídos como, por exemplo, a média de comprimento de onda e as referências internas devem ser usadas para melhorar a repetibilidade da medição.

A tendência avalia a proximidade de valores obtidos com valores considerados como verdadeiros. Para avaliar o comprimento de onda mais adequado e que apresenta a melhor confiabilidade, espectros de soluções padrão preparadas com o uso de Material de Referência Certificado (MRC) são obtidos e construída uma curva de calibração com alguns comprimentos de onda selecionados. Seleciona-se, então, uma amostra cuja concentração do analito já tenha sido determinada por uma técnica diferente. Se esta amostra não existir, pode-se preparar uma amostra de concentração conhecida. O espectro da amostra é obtido e a amostra é quantificada em toda a faixa necessária de comprimentos de onda. Os resultados quantitativos, para cada comprimento de onda, são comparados com o valor conhecido, avaliando-se o erro de medição. Devido a problemas de ruído, o ideal é fazer uma série de medições da amostra e, então, calcular a média. Este método reduz a contribuição de ruídos e erros na exatidão.

O limite de detecção (LD) é definido como a menor concentração do analito que se pode detectar, porém não quantificar. O LD é o ponto cujo sinal do analito é igual a três vezes o valor do ruído medido. Exemplos de cálculos para o limite de detecção podem ser encontrados no DOQ-Cgcre-008.

O limite de quantificação (LQ) é definido como a menor concentração de analito que se pode quantificar com precisão e exatidão. Frequentemente, é assumido que o comprimento de onda de máxima absorvância fornecerá a melhor resposta. Contudo, devido aos ruídos instrumentais variarem significativamente com o comprimento de onda, essa premissa nem sempre é atingida. A melhor forma de se determinar o comprimento de onda ou o comprimento de onda que fornecerá a melhor resposta é obter o espectro da amostra padrão de menor concentração, várias vezes. A média e o desvio padrão relativo, dos valores obtidos para cada comprimento de onda, deve ser calculado. O comprimento de onda com a menor porcentagem de desvio padrão é, então, selecionado.

Com relação à robustez do método, pequenas variações e alterações nas condições instrumentais, a fim de se obter resultados concisos e repetitivos, devem ser realizadas durante a otimização do método. Outras informações, definições, número de replicatas para cada teste e critérios de aceitação podem ser encontrados no DOQ-Cgcre-008.

## **11 RASTREABILIDADE METROLÓGICA DOS ENSAIOS POR ESPECTROFOTOMETRIA UV/VIS**

A calibração de espectrofotômetros é primordial para a garantia da qualidade dos resultados das medições para análises de amostras e quantificação de substâncias. Por esta razão, é fundamental identificar fatores que influenciam nos resultados de medição e verificar periodicamente o desempenho desses equipamentos. De acordo com a norma ABNT NBR ISO/IEC 17025, todo equipamento utilizado em medições que tenha efeito significativo sobre a exatidão ou validade do resultado deve ser calibrado antes de entrar em serviço, a fim de garantir a rastreabilidade metrológica das medições. Isto se deve à



diversidade de materiais utilizados nas análises, na periodicidade e na frequência de uso. Sendo assim, é importante que o espectrofotômetro esteja calibrado para que as medições espectrométricas tenham exatidão, oferecendo confiabilidade e rastreabilidade metrológica aos resultados de medição.

Existem duas escalas no espectrofotômetro que devem checadas e calibradas, a escala de comprimento de onda e a escala fotométrica, que estão relacionadas ao desempenho do instrumento e, portanto, influenciam a avaliação dos parâmetros medidos. Para a checagem intermediária e calibração dessas escalas, é indicado o uso de materiais de referência, específicos tanto para a checagem das escalas de comprimento de onda fotométrica quanto para a calibração, garantindo assim a rastreabilidade metrológica e confiabilidade aos resultados de medição realizados nas mais diversas áreas que utilizam em suas medições analíticas a técnica espectrofotométrica.

Uma abordagem de como deve ser realizada uma calibração ou uma checagem intermediária será apresentada no item 11.1.

### 11.1 Calibração e Checagem Intermediária

Em função da robustez dos espectrofotômetros, existe uma tendência em assumir que ele sempre apresenta um bom desempenho. No entanto, a prática analítica exige que o desempenho do instrumento seja checado em intervalos regulares. Este processo pode ser feito de duas formas:

- a) uma calibração que reúna todos os elementos de rastreabilidade e que cheque sua habilidade de executar rotinas analíticas, para isto a Rede Brasileira de Calibração (RBC) disponibiliza para os laboratórios que utilizam espectrofotômetros UV/Vis em suas rotinas de ensaios ou pesquisa a calibração destes instrumentos. A calibração é executada tomando como base a Norma ASTM E925 e os certificados de calibração trazem o teste de comprimento de onda e o teste de escala fotométrica. Para a execução da calibração os laboratórios utilizam um conjunto de MRC.
- b) a periodicidade das calibrações deve ser estabelecida com base na frequência e ambiente de uso do equipamento e principalmente nos resultados das checagens intermediárias.
- c) a frequência da checagem intermediária deve ser realizada de acordo com os procedimentos internos adotados em cada laboratório e/ou sempre que surgir a necessidade, devido à observação de medições com valores atípicos. Esta checagem é importante pois pode-se averiguar se as características de desempenho de um equipamento sofreram alteração, desde a última calibração, a ponto de afetar os resultados analíticos.

Para executar a checagem intermediária de um espectrofotômetro na escala fotométrica da escala Vis podemos seguir o seguinte procedimento:

- a) preparar 100 mL de uma solução ácida de sulfato de cobre procedendo-se da seguinte maneira: em um balão volumétrico de 100 mL, adicionar 10 mL de água purificada, logo em seguida adicionar 2,0 g de sulfato de cobre penta hidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) grau analítico e dissolver.
- b) adicionar 1 mL de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) grau analítico, homogeneizar e finalmente completar até 100 mL e homogeneizar novamente.
- c) para a solução de referência deve-se preparar em um balão volumétrico de 100 mL uma solução de ácido sulfúrico 1%, adicionando 50 mL de água purificada no balão volumétrico, seguido de 1 mL de ácido sulfúrico, homogeneizar, aguardar esfriar e completar com água purificada.
- d) a Absorbância esperada desta solução lida em células de 10 mm a diferentes comprimentos de onda pode ser encontrada na Tabela 2.

A solução de sulfato de cobre em diferentes concentrações pode ser usada também para checar a linearidade da escala fotométrica.

Tabela 2 - Valores de Absorbância para Solução de 20 g/L de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  em 1% de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 

Comprimento de Onda (nm)	Absorbância
600	0,068
650	0,224
700	0,527
750	0,817

Esses dados de absorbância servem como referência para as verificações. Adicionalmente, com o uso de reagentes de alta pureza em instrumentos com fenda espectral igual ou menor a 10 nm (quanto menor a fenda melhor a resposta do equipamento) a probabilidade de obter medições de absorbância com valores mais exatos aumenta. O erro esperado entre a medição e o valor de referência deve ser menor que 2 % da absorbância.

Para executar a checagem intermediária de um espectrofotômetro na escala fotométrica da escala UV podemos seguir o seguinte procedimento:

**a)** secar em estufa 1 g de dicromato de potássio de ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) 30 a 60 minutos a 140 °C - 150 °C, este material servirá para preparar duas soluções, a preparação dependerá da faixa de absorbância que será verificada.

**b)** solução A: pesar 50 mg  $\pm$  0,5 mg de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  e adicionar em um litro de uma solução de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )  $5 \times 10^{-3}$  mol/L. Esta solução é adequada para verificações na faixa de 0,2 a 0,7 de absorbância.

**c)** solução B: pesar 100 mg  $\pm$  1,0 mg de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  e adicionar em um litro de uma solução de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )  $5 \times 10^{-3}$  mol/L. Esta solução é adequada para verificações na faixa de 0,4 a 1,4 de absorbância.

**d)** as medições devem ser feitas em condições de temperatura na faixa de 15 °C a 25 °C, utilizar cubetas de quartzo ou qualquer outro material próprio para medições na faixa do UV de 10 mm de caminho ótico. Para o branco, deve ser usada uma solução de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )  $5 \times 10^{-3}$  mol/L.

**e)** se os resultados da medição estiverem apresentando diferenças significativas em relação aos valores da Tabela 3, pode significar que as cubetas utilizadas têm valores de passagem óptica muito diferente de 10 mm, os reagentes utilizados na preparação das soluções não são adequados ou a fenda espectral do espectrofotômetro em avaliação é maior que 10 nm.

Tabela 3 - Valores de Absorbância para a solução de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  em meio de  $5 \times 10^{-3}$  mol/L de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 

Comprimento de Onda (nm)	Absorbância Solução A	Absorbância Solução B
235 (min.)	0,626	1,251
257 (max.)	0,727	1,454
313 (min.)	0,244	0,488
350 (max.)	0,536	1,071

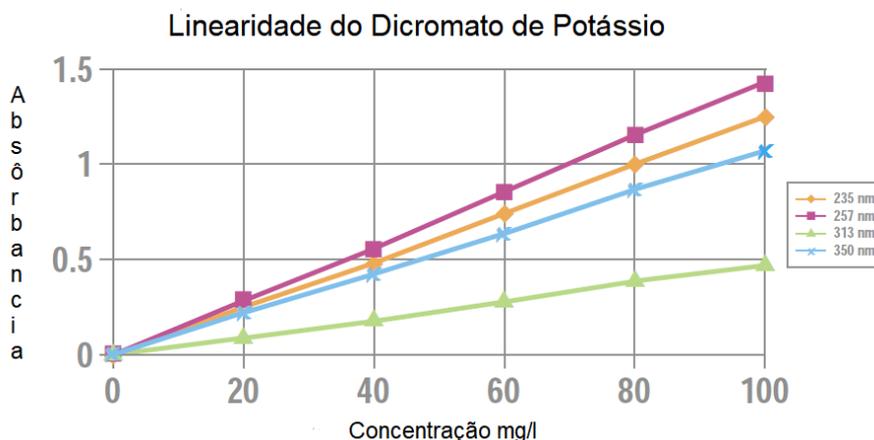
Em pequenas concentrações, a solução de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  em uma solução de 0,001 M de ácido perclórico obedece à Lei de Bouguer-Lamber e Beer e pode ser usada para checar a linearidade da escala fotométrica UV em absorbância dos espectrofotômetros. A Tabela 4 mostra os valores esperados de várias concentrações de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  em uma solução 0,001 M de ácido perclórico, utilizadas na calibração da escala fotométrica e linearidade UV de espectrofotômetros.

Tabela 4 - Valores de Absorbância para a solução de  $K_2Cr_2O_7$  em meio de  $0,001\text{ M}$  de  $HClO_4$ 

Concentração Nominal em mg/L de $K_2Cr_2O_7$	Valores de Absorbância (UA) por Comprimento de Onda			
	235 nm	257 nm	313 nm	350 nm
20,00	0,244	0,280	0,095	0,209
40,00	0,493	0,567	0,194	0,422
60,00	0,746	0,858	0,293	0,637
80,00	1,005	1,154	0,393	0,854
100,00	1,252	1,445	0,490	1,068

A linearidade é um parâmetro importante para checagem do desempenho de um espectrofotômetro, pois é um parâmetro altamente dependente da amostra. A Figura 6 representa graficamente a linearidade de um espectrofotômetro com o uso de soluções de dicromato de potássio.

Figura 7 - Representação da linearidade do espectrofotômetro com o uso de soluções de dicromato de potássio (Adaptado de "Certified Reference Materials for UV and Visible Spectroscopy"; Optiglass Limited)



As medições obtidas podem ser comparadas com medições obtidas durante todo o tempo de uso do equipamento, sempre com a quantificação de amostras controle e mediante monitoramento por meio de cartas controle.

Alguns espectrofotômetros possuem, de acordo com o fabricante, métodos já estabelecidos, neste caso a checagem pode ser realizada por meio da medição de amostras controle, em concentrações predeterminadas e o monitoramento por carta controle.

### 11.1.1 Uso de MRC

#### 11.1.1.1 Escala fotométrica

Os testes de escala fotométrica em transmitância ou absorbância (mais comum) são realizados utilizando os valores certificados de materiais de referência. Esses MRC são filtros neutros, cujos valores de transmitância (ou absorbância) são pouco variáveis em função do comprimento de onda. Esses filtros padrão são apresentados na forma de filtros de vidros de densidade neutra ou soluções padrão.



As soluções padrão utilizadas na calibração são, em sua grande maioria, inseridas em cubetas de quartzo seladas. Os padrões de densidade neutra podem ser de vidro ou sílica fundida, com ou sem película de recobrimento metálico. Tais padrões podem ser usados principalmente na calibração e checagem de espectrofotômetros convencionais, nas regiões do ultravioleta e visível.

Através da análise da variação de valores dos resultados das medições dos padrões, alguns fatores que indicam o comportamento do instrumento podem ser avaliados e uma eventual intervenção, como, por exemplo: correção da linha de base realizada no *software* do instrumento, linearidade de resposta, ruído fotométrico, estabilidade fotométrica, repetibilidade fotométrica, espalhamento da luz e exatidão de resultados.

Além disso, o teste da linearidade é previsto pela Norma ASTM E1866 que determina a precisão dos instrumentos na medição de absorção com relação ao aumento da concentração, bem como o de ruído fotométrico, que é a medida da relação sinal/ruído do instrumento. O teste é realizado em função do tempo, determinando a variação da absorção em uma faixa de comprimentos de onda, ou seja, determina a diferença entre os picos na distribuição espectral.

A estabilidade é um parâmetro que indica quão estável um espectrofotômetro é em um determinado tempo. Pode ser detectada sem a utilização de filtros ópticos, apenas analisando a variação dos valores em função do tempo. Este teste está previsto na Norma ASTM E1866.

Por outro lado, a Norma ASTM E387 recomenda avaliar a quantidade de luz espalhada. A luz espalhada é a dispersão de luz que alcança o detector em um comprimento de onda diferente da forma de onda selecionada. Isso ocorre pois o detector não consegue diferenciar a luz incidente da luz dispersa na amostra, por isso junta os dois sinais, provendo indicações erradas. Porém, esse comportamento depende também tanto da sensibilidade do detector quanto da distribuição espectral da fonte. Esse valor de quantidade de luz espalhada pode ser avaliado usando filtros de corte, como, por exemplo, a solução de iodeto de sódio.

#### 11.1.1.2 Escala de comprimento de onda

Na escala de comprimento de onda, os padrões utilizados são MRC com bandas de absorção específicas em distintos intervalos de comprimento de onda. Esses padrões, normalmente lâmpadas de descarga, podem ser usados como materiais de referência com bandas de absorção estreitas. Para a checagem da escala de comprimento de onda de espectrofotômetros, são indicados principalmente filtros de vidro de dídimo e de óxido de hólmio.

O filtro de dídimo é utilizado para medições com bandas de absorção nas regiões espectrais do visível e do infravermelho próximo, porém, nesta região, também podem ser utilizados 1, 2, 4-triclorobenzeno, filmes de poliestireno e óxidos de terras raras em vidro. Esta checagem também pode ser realizada por meio do uso de lâmpadas de descarga, tais como as lâmpadas de mercúrio e deutério.

O filtro de óxido de hólmio é empregado em medições nas regiões espectrais do ultravioleta e do visível por apresentar picos característicos nessa faixa do espectro e podem ser visualizados na Figura 8.

Outro material que pode ser utilizado para checagem na região espectral do ultravioleta é o filtro de vapor de benzeno ou por meio do uso de lâmpadas de descarga (como lâmpadas de mercúrio e deutério). Na região espectral do infravermelho próximo, podem ser utilizados o 1, 2, 4-Triclorobenzeno, óxidos de terras raras em vidro (SRM 2035) e filmes de poliestireno.



Figura 8 - Espectro de um filtro de vidro de óxido de hólmio com seus picos característicos (Adaptado de "Certified Reference Materials for UV and Visible Spectroscopy"; Optiglass Limited)



Os parâmetros a serem analisados para a checagem da escala de comprimento de onda de maior influência nos resultados de medição são: velocidade de varredura, largura de banda espectral e exatidão do comprimento de onda.

O alargamento da fenda na medição pode comprometer os números de bandas identificados no espectro, uma vez que esse alargamento tem influência nas bandas individuais e dificulta a localização de picos.

A velocidade de varredura, quando aumentada, pode gerar um desvio na posição da banda espectral.

Portanto, quando são feitas medições de comprimento de onda, devem-se padronizar esses dois parâmetros (largura de banda espectral e velocidade de varredura) para realizar a checagem, uma vez que ambos têm grande influência nos resultados de medição.

Cabe ressaltar que a periodicidade desta checagem também deve ser respeitada, considerando que tais fatores (ruído fotométrico, exatidão, espalhamento de luz etc.) podem modificar as características do instrumento e, com isso, ocorrer um aumento do valor de estimativa de incerteza.

Outra forma de assegurar a garantia da qualidade dos resultados ou a confiabilidade das medições é por meio das comparações intra e interlaboratoriais.

#### 11.1.1.3 Uso de MRC para determinação da curva de calibração

A curva de calibração realizada pelo laboratório para um analito específico deve ser construída com o uso de MRC. Esta curva de calibração é responsável pela garantia de rastreabilidade da medição e é a atividade mais importante desenvolvida nos ensaios pelo método espectrofotométrico. Não é suficiente o laboratório garantir a calibração do espectrofotômetro e o uso de MRC para determinação da curva de calibração, mas todos os aspectos envolvidos na preparação dos padrões, aspectos, tais como, a qualidade da água ou do solvente utilizado no preparo das soluções, balanças e material volumétrico devidamente calibrado, assim como a qualificação do pessoal.



## 12 BOAS PRÁTICAS DE LABORATÓRIO EM ESPECTROFOTOMETRIA UV/Vis

### 12.1 Requisitos no Laboratório

Antes de instalar e colocar em funcionamento um espectrofotômetro, o laboratório deverá reunir alguns requisitos básicos para garantir tanto a integridade do equipamento como seu bom funcionamento e a geração de resultados confiáveis.

#### 12.1.1 Condições ambientais

Os seguintes tópicos devem ser considerados com relação às condições ambientais:

- a) ausência de ambiente corrosivo, não deverá ser instalado o equipamento onde é feito o uso contínuo de reagentes corrosivos, como, por exemplo, instalar o espectrofotômetro na mesma sala que um espectrômetro de absorção atômica;
- b) evitar a exposição do equipamento à luz solar direta;
- c) ausência de vibrações;
- d) verificação do efeito das correntes de ar, no caso de uso de ar condicionado, sobre as respostas de medição do equipamento;
- e) levantamento detalhado do tipo de amostras e registro para aquelas que podem gerar gases;
- f) se for constatada a presença de gases, será necessária a incorporação de sistemas de exaustão de gases;
- g) a temperatura de trabalho do equipamento deverá ser entre 15 °C e 35 °C e a umidade de trabalho do equipamento deverá estar entre 35 %ur e 80 %ur (para que não ocorra condensação), para isso, no local deverá ser mantido um termohigrômetro para o monitoramento das condições de temperatura e umidade.

#### 12.1.2 Espaço

O espectrofotômetro deverá ficar sobre uma bancada bem nivelada e a distância mínima do equipamento e as paredes deverá ser superior a 100 mm. Esta condição garantirá que os sistemas de resfriamento de lâmpadas e placas eletrônicas trabalhem com sua eficiência máxima, evitando danos no equipamento.

#### 12.1.3 Condições elétricas

- a) Ausência de campos magnéticos;
- b) Deve ser verificada a rede elétrica para garantir que a tensão disponível é a adequada à necessidade do equipamento, conforme especificações do fabricante e que esteja livre de ruído ou variações bruscas. Quando for constatado que a rede elétrica não oferece estabilidade, um estabilizador deverá ser instalado no local;
- c) Presença de sistema de aterramento adequado para o equipamento.

### 12.2 Escolha, Limpeza e cuidados das cubetas

Os espectrofotômetros UV-Vis são utilizados principalmente para a leitura (absorbância ou transmitância) em líquidos ou soluções. Esses líquidos e/ou soluções são colocados em células chamadas de cubetas, que possuem faces planas. Diante disso, as cubetas devem ser completamente transparentes para todos os comprimentos de onda e podem ser confeccionadas com diferentes materiais. Cubetas de plástico ou acrílico são de baixo custo, no entanto, não são resistentes a todos os solventes e absorvem radiação em comprimento de onda abaixo de 300 nm, não sendo adequado seu uso para medições nessa região. Cubetas de vidro possuem um custo um pouco mais alto, comparado às cubetas de plástico, porém são mais duráveis. No entanto, essas cubetas absorvem radiação em comprimento de onda abaixo de 320 nm, não sendo recomendável seu uso nessa região. Cubetas de



quartzo são transparentes até o comprimento de onda de 210 nm, já as cubetas de sílica fundida são transparentes até 190 nm. Independentemente do tipo de material de confecção da cubeta há uma perda da transmissão de pelo menos 10 %.

Ainda, com relação aos tipos de cubeta, dependendo do tipo de aplicação, elas podem variar com relação ao comprimento do caminho ótico, ao volume de amostra e à dimensão. As cubetas mais comumente utilizadas são aquelas abertas no topo, retangulares e com caminho ótico que variam de 1 a 100 mm, sendo as mais utilizadas as de 10 mm. São vendidas em pares, para realização de medidas de amostra e de uma referência, geralmente a amostra do solvente branco, que é composto por solventes e/ou reagentes de dissolução ou diluição da amostra. A maioria dessas cubetas retangulares possui largura externa de 12,5 mm. Quando há a necessidade ou um pequeno volume de amostra disponível, existe a possibilidade de se utilizar cubetas com volume interno reduzido, podendo-se realizar medições com volumes com aproximadamente 60  $\mu\text{L}$ . Existem, ainda, cubetas que possibilitam a medida de volumes menores de 5  $\mu\text{L}$  e cubetas que podem ser utilizadas para medidas automatizadas ou para análise em fluxo. No entanto, para essas cubetas com volumes reduzidos, há uma diminuição na passagem da radiação eletromagnética, por consequência, perda de sensibilidade a qual tem relação com o grau de abertura e com a geometria do caminho ótico.

As cubetas devem ser manuseadas com cuidado, evitando-se tocar diretamente com as mãos, principalmente a superfície ótica, a fim de se evitar riscos físicos, contato pelas impressões digitais, com a gordura ou outros depósitos nas paredes, pois alteram significativamente as características de transmissão de uma célula, podendo causar erros nas medições de absorvância. Dessa forma, uma limpeza cuidadosa deve ser realizada antes e após o uso, e uma vez limpas, as superfícies óticas não devem ser tocadas, mesmo durante o manuseio. Se a superfície ótica se tornar levemente contaminada, a cubeta pode ser limpa, cuidadosamente, com um lenço de papel macio. Por outro lado, se a contaminação for severa, pode-se utilizar detergente sulfônico ou fluidos de limpeza, comercialmente disponibilizados pelos fabricantes de cubetas. Em casos severos, podem ser utilizados ácidos clorídrico ou nítrico, diluídos.

### 12.3 Cuidados com o espectrofotômetro UV-Vis

Um adequado uso e manutenção de qualquer equipamento de laboratório em geral e especificamente de espectrofotômetros é necessário para manter a eficiência e segurança no laboratório. O espectrofotômetro é um patrimônio de custo elevado. Algumas dicas são fornecidas e podem prolongar a vida útil do equipamento:

- a) uso de energia estável - se no local onde o equipamento está instalado não existe garantia de um suprimento estável de energia, é recomendável o uso de estabilizadores de voltagem de capacidade condizente com a demanda do equipamento.
- b) instale o equipamento em um lugar limpo e livre de pó, que proporcione um ambiente adequado. Evite colocar o equipamento em áreas onde há a presença de vapores ácidos, tais como salas de análise de absorção atômica (AA); igualmente, evite colocar, no mesmo local, equipamentos que geram vibrações (como centrífugas, por exemplo)
- c) garanta que as rotinas de manutenção preventiva sejam executadas por técnicos treinados e qualificados.
- d) aplique com frequência as rotinas automáticas de autoteste e verificação do próprio equipamento.
- e) faça inspeções visuais frequentes (no mínimo a cada 6 meses) e verifique visualmente o estado e integridade do equipamento e seus componentes, se eles estão sendo mantidos em conformidade com as especificações do fabricante.
- f) sempre verifique se a bancada que suporta o equipamento está em boas condições.
- g) cheque a estrutura geral do instrumento, verifique se os botões, controles, tampas, compartimentos e elementos mecânicos estão ligados, estão firmes e funcionando adequadamente.
- h) verifique se as etiquetas e identificações estão fixas, aderidas e legíveis.



- i) verifique se os acessórios estão limpos, não exibem rachaduras e que sua funcionalidade está normal.
- j) checar se os cabos e conexões estão em bom estado, não tem rupturas e estão firmemente conectados às tomadas de energia.
- k) verifique se há aparecimento de sinais de corrosão.
- l) sempre após o uso do equipamento, verifique se não existem derramamentos de solução tanto fora como no interior do equipamento, se for o caso limpe-os imediatamente.
- m) antes de colocar as cubetas no equipamento, seque-as e limpe-as.

Quando derrames acontecem, como proceder:

Em caso de derramamento de solução no compartimento de amostras, o equipamento deve ser limpo conforme o procedimento a seguir:

- a) desligue o instrumento e desconecte o cabo de força da tomada;
- b) use uma seringa para sugar a maior quantidade de líquido possível;
- c) seque o compartimento da amostra com hastes contendo algodão na extremidade;
- d) use lenço de papel macio ou tecido óptico, para limpar as janelas da fotocélula;
- e) limpe com um pano, umedecido com água destilada, a parte externa do equipamento, incluindo tela e teclado.

Se tiver alguma dúvida em relação à qualidade da limpeza ou suspeitas de qual material pode ter sido utilizado no interior do equipamento, neste caso, é melhor contatar um serviço de assistência técnica especializada.

### 12.3.1 Manutenção preventiva

Conforme o item 6.4.3 da Norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017, o laboratório deve ter um procedimento que descreva a manutenção planejada dos equipamentos. O procedimento deverá estabelecer a forma de controle de todos os registros das manutenções realizadas até o momento.

A manutenção preventiva compreende o conjunto de ações destinadas a prevenir a ocorrência de falhas, para evitar futuras quebras, provocadas pelo desgaste natural de peças e proporcionar um maior rendimento e durabilidade. Algumas características de uma manutenção preventiva são:

- a) poder ser programada;
- b) preservar a confiabilidade do equipamento;
- c) manter a integridade física do equipamento e prolongar sua vida útil;
- d) evitar ou atenuar a incidência de falhas.

As manutenções preventivas podem incluir, por exemplo, revisões parciais ou totais em intervalos específicos, lubrificação, ajustes, polimento de filtros, limpeza, atualização de *software* etc.

Algumas recomendações:

- a) no laboratório, a manutenção deve limitar-se à limpeza externa do equipamento e do compartimento de amostras. A troca de lâmpadas só pode ser feita por um técnico treinado e com experiência nessa atividade. Não se recomenda a abertura do equipamento por pessoas sem a devida qualificação técnica e experiência.
- b) quando a manutenção for executada por uma empresa externa, esta deverá ser feita por um técnico de comprovada competência técnica, caso contrário, podem ocorrer serviços superficiais ou negligentes. Quando não são executadas todas as rotinas e testes necessários, há a probabilidade de não serem detectados problemas, podendo causar problemas futuros.
- c) analisar criticamente o relatório de manutenção preventiva gerado.



**d)** executar a manutenção preventiva em intervalos não maiores do que dois anos; quando o uso do equipamento for intensivo, o período de manutenção deve ser reduzido para um ano.

Do ponto de vista da manutenção, os espectrofotômetros possuem quatro componentes que devem receber cuidados com certa periodicidade, a saber:

- a)** componentes mecânicos automáticos ou manuais, que executam as tarefas de posicionar os compartimentos de amostra e selecionar os comprimentos de onda;
- b)** componentes ópticos, que envolvem lâmpadas, espelhos, monocromadores e grades de difração;
- c)** componentes eletrônicos;
- d)** componentes de *software*.

Dependendo da intensidade de uso, tipo de substâncias analisadas no equipamento, ambiente em que se encontra o equipamento, esses componentes podem sofrer maior ou menor desgaste.

Quando acontece a visita do prestador de serviços, exija, no mínimo, o seguinte:

- a)** inspeção da instalação elétrica;
  - a.1)** saída elétrica com aterramento.
  - a.2)** a tomada está em boas condições e próxima do equipamento (não mais de 1,5 m).
  - a.3)** a voltagem está adequada para a necessidade do equipamento e sua variação não ultrapassa 5% da especificação estabelecida pelo fabricante.
  - a.4)** a polaridade das tomadas está correta.
  - a.5)** os testes devem ser desenvolvidos e registrados em relatório por um técnico qualificado.
- b)** verificação visual do equipamento;
  - b.1)** checar e registrar o estado da bancada de trabalho onde o instrumento está localizado, se existirem evidências que não estão sendo atendidos requisitos mínimos, além de ser reportado, o técnico deve comunicar ao responsável pelo laboratório.
  - b.2)** checar e registrar a estrutura geral do instrumento, assim como, o estado de conservação e funcionalidade de teclas, botões, partes mecânicas e identificações.
  - b.3)** checar, registrar e corrigir o ajuste de partes mecânicas do instrumento.
  - b.4)** checar, registrar e corrigir sinais de deterioração de cabos e conectores.
  - b.5)** checar e registrar se os cabos de energia não estão aquecendo por instalações inadequadas ou deterioração do isolamento do cabo.
  - b.6)** checar, registrar e corrigir a presença de pó ou incrustações nos cabos e plugues.
  - b.7)** checar e registrar a presença de aterramento e seu uso adequado.
  - b.8)** checar, registrar e corrigir se os fusíveis e indicadores estão limpos, livres de pó e corrosão.
  - b.9)** checar e registrar os componentes elétricos externos por sinais de sobreaquecimento.
- c)** troca de baterias;
  - c.1)** o prestador de serviços deve checar e registrar a voltagem ou uma indicação de bateria no equipamento e caso esta esteja gasta trocá-la. Dependendo do modelo de equipamento, alguns deles utilizam baterias de *backup*, para memorizar as curvas de calibração e métodos de análises assim como data, hora, usuários etc.
- d)** corrida de autoteste;
- e)** inspeção e limpeza externa do instrumento incluindo tela e teclado;
- f)** inspeção e limpeza do cabo de energia;
- g)** verificação da lâmpada, se ela está limpa e em bom estado;
  - g.1)** a lâmpada é um consumível com vida útil definida e deve ser trocada com periodicidade. Esta periodicidade depende da intensidade de uso do aparelho.
  - g.2)** executar os ajustes necessários.



- h) checagem dos fusíveis de proteção;
- i) verificação da bateria de *backup*;
- j) limpeza da parte interna do equipamento e compartimento e ventilador;
- k) teste completo de funcionalidade com MR;
- l) fornecimento de um relatório de manutenção relatando todas as atividades que foram desenvolvidas.

## 12.4 Preparação de amostras

### 12.4.1 Considerar:

- a) a natureza da amostra;
- b) o componente ou componentes que se deseja determinar;
- c) os outros componentes da amostra;
- d) a exatidão do comprimento de onda desejado;
- e) o tempo disponível para a execução do ensaio e as leituras;
- f) as medições de colóides ou material insolúvel produzirão resultados sem repetitividade, devido à continuidade da hidrólise do analito no solvente ou continuidade da reação;
- g) a dispersão da radiação por parte da amostra;
- h) a solução adequada do analito ou analitos de interesse, para a medição espectrofotométrica, deve ter as seguintes propriedades:
  - h.1) as espécies absorventes deverão ser estáveis por um período de tempo razoável, de forma a permitir a realização de medições repetíveis.
  - h.2) o analito ou analitos devem ser totalmente solúveis em tempo hábil.

### 12.4.2 Solventes Comuns

- a) água;
- b) soluções de HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaOH de aproximadamente 0,1 mol/L;
- c) soluções tampão de pH que não contenham substâncias absorventes, por exemplo, misturas de fosfato diácido de sódio com fosfato ácido de sódio, úteis nos intervalos de pH de 4,5 a 8,9;
- d) solventes orgânicos grau espectroscópico, por exemplo, piridina, benzeno, clorofórmio, etanol, etc.



---

## ANEXO A – RELAÇÃO DOS PARTICIPANTES NA ELABORAÇÃO DESTE DOCUMENTO

De forma a auxiliar aos laboratórios de ensaios, especialmente os postulantes à acreditação, na tarefa de validar os métodos por eles desenvolvidos, a Divisão de Acreditação de Laboratórios (Dicla) da Cgcre reuniu a sua **Comissão Técnica de Química (CT-05)**, congregando os especialistas, abaixo listados, que dedicaram um tempo de suas atividades à elaboração e revisão deste documento.

A Dicla agradece pela contribuição prestada no apoio ao fortalecimento da atividade de acreditação de laboratórios.

Membros do Grupo Técnico responsável pela emissão e revisão 01: **Felipe del Castillo** - Coordenador do trabalho – Evagon; **Larissa S. Canaes** – CQA Laboratórios.; **Orlando Cintra** – PROÁGUA AMBIENTAL; **Paulo Paschoal Borges** - Inmetro; **Sydney P. Sobral** – Inmetro; **Elcio Cruz de Oliveira** - Transpetro

---