

REVALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DE DETERMINAÇÃO DE PH ASSOCIADO À TROCA DE EQUIPAMENTO

RESUMO

A validação de um método analítico pode ser definida como o processo que permite demonstrar se os resultados obtidos são confiáveis, reprodutíveis e adequados a uma dada aplicação de interesse. A validação do instrumental utilizado deve preceder a validação da metodologia analítica e deve, sempre que possível, ser feita pelo fabricante. No entanto, o analista deve verificar periodicamente as especificações de desempenho, tais como sensibilidade, estabilidade, faixa de resposta linear, etc. O presente trabalho descreve um processo de revalidação de um método quantitativo relacionado à aquisição de um novo equipamento.

Palavras-chave: determinação de pH, potenciometria, revalidação de método

SUMMARY

The validation of an analytical method can be defined as the process that allows to demonstrate whether the results produced by the method are reliable, reproducible, and suitable for the intended applications. Instrument validation precedes method validation and should be provided by the suppliers. However, on exercising its analytical responsibility, an analyst should verify the manufacturer's specification on performance, sensitivity, stability, ranges of linear response *et alli*. This work concerns the revalidation of a quantitative method associated to the acquisition of a new equipment.

Keywords: determination of pH, potentiometry, revalidation of method

INTRODUÇÃO

Potenciometria direta aplicada a medidas de pH

A potenciometria é uma técnica analítica baseada na medida de potencial de células eletroquímicas na ausência de correntes apreciáveis. As células para medidas potenciométricas são formadas por um eletrodo de referência e um eletrodo indicador ligados a um instrumento capaz de medir a diferença de potencial entre eles (1).

Desde os anos 1930, o modo mais conveniente de determinar o pH tem sido por medida da diferença de potencial através de uma membrana de vidro que separa a solução do analito de uma solução de referência, com determinada acidez. A célula moderna típica para medida de pH é formada por um eletrodo indicador de vidro e de

um eletrodo de referência de prata/cloreto de prata ou de calomelano saturado, imerso na solução cujo pH deve ser determinado. O eletrodo indicador consiste em uma fina membrana de vidro sensível ao pH, selada na extremidade de um tubo de plástico ou de vidro. Um pequeno volume de ácido clorídrico diluído e saturado com cloreto de prata está contido no tubo (em alguns eletrodos, a solução interna é um tampão que contém o íon cloreto). Um fio de prata/cloreto de prata, em contato com esta solução, forma um eletrodo de prata-cloreto de prata que é conectado a um dos terminais do dispositivo que mede o potencial. O eletrodo de referência é conectado ao outro terminal. A Figura 1 mostra uma representação esquemática para a célula para medida de pH.

*Alaide Aline Xavier Leal^{1,2},
Cristiane Assumpção
Henriques¹ e
Aderval S. Luna¹*

¹Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

²FIOCRUZ, Bio-Manguinhos, Laboratório de Metrologia, Setor de Validação Analítica.

*Autora para correspondência: Universidade do Estado do Rio de Janeiro Instituto de Química / Programa de Pós-graduação em Engenharia Química R. São Francisco Xavier, 524 – Pavilhão Haroldo Lisboa da Cunha Sala 427 CEP: 20559-013 Rio de Janeiro. RJ Fone: (21) 2587-7631 – r. 46 E-mail: cah@uerj.br

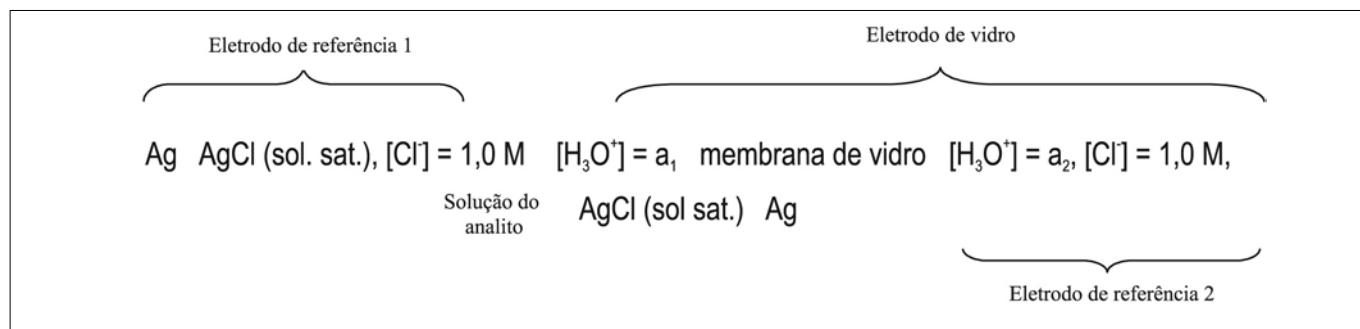


Figura 1. Diagrama de uma célula para medida de pH. Adaptado de SKOOG *et. al.* (2)

O eletrodo de vidro é uma ferramenta muito versátil para medidas de pH sob diferentes condições. O eletrodo pode ser usado sem interferências em soluções contendo oxidante e redutores fortes, gases e proteínas; o pH de fluidos viscosos ou mesmo semi-sólidos também pode ser determinado (2).

A utilidade do pH como medida de acidez ou alcalinidade de meios aquosos, a ampla disponibilidade de eletrodos de vidro comerciais e a recente comercialização de eletrodos de estado sólido a baixo custo transformaram as medidas potenciométricas de pH numa das técnicas analíticas mais comuns em toda ciência. Assim, é importante que o pH seja definido de modo a ser facilmente reproduzido ao longo do tempo em um mesmo laboratório e em diferentes laboratórios. Assim, é fundamental que o pH seja definido em termos operacionais, isto é, pelo modo no qual a medida é feita, como forma de garantir que o pH medido por um profissional seja o mesmo que o medido por outro. A definição operacional de pH está baseada na calibração direta do medidor com soluções padrão (composição estabelecida pelo National Institute of Standards and Technology - NIST) seguida da medida do pH da(s) solução(ões) desconhecida(s) (3).

O pH é uma grandeza que expressa a intensidade da acidez ou da basicidade de um determinado meio. É definido como logaritmo decimal do inverso da atividade dos íons hidrogênio na solução em estudo (a_{H^+}) (2).

$$pH = \log (1/a_{H^+}) = - \log a_{H^+} \quad (1)$$

Para soluções muito diluídas como, por exemplo, aquelas com força iônica menor que 0,1, a atividade pode ser substituída pela concentração molar (2).

O processo de validação analítica

A validação de um método analítico é o processo de estabelecimento das características de desempenho e suas limitações, bem como da identificação dos fatores de variabilidade e de sua extensão, os quais podem alterar essas características. É, portanto um processo de verificação da adequabilidade do

método é adequado a um determinado uso. Tornar um método analítico válido para uso é padronizar a sua execução, visando garantir que o mesmo seja realizado sempre com a obtenção de resultados compatíveis com as especificações do produto, de modo a garantir a utilização confiável das informações geradas (4).

Dentro de um conceito geral, um método analítico pode ser validado intralaboratorialmente ou interlaboratorialmente. O primeiro método, chamado de validação no laboratório, consiste em executar as etapas de validação dentro de um único laboratório, seja para validar um método novo que tenha sido desenvolvido localmente ou para verificar se um método adotado de outras fontes está bem aplicado. O segundo tipo, chamado de validação completa, envolve todas as características de desempenho e um estudo interlaboratorial que é utilizado para verificar como a metodologia se comporta com uma determinada matriz em vários laboratórios, estabelecendo a reprodutibilidade da metodologia e a incerteza expandida associada à metodologia como um todo. Quando um dado laboratório realiza a validação de métodos retirados de fontes normativas ou publicadas, o processo é denominado revalidação do método (5).

A revalidação não acontece somente nesta situação, mas também quando há a entrada de um novo analista, a aquisição ou a substituição de um equipamento, ou um novo fornecedor de reagentes ou materiais para o laboratório. Recomenda-se a revalidação a cada dois anos caso não haja nenhuma alteração das condições do método (6).

Como pré-requisitos de validação, todos os equipamentos analíticos e instrumentos em questão são submetidos a uma prévia calibração e ajuste, se necessário, ou qualificação quando aplicável. Padrões de referência, com pureza documentada, devem ser usados no transcorrer do estudo de validação. Toda vidraria utilizada deve ser classe A e é desejável que os materiais volumétricos sejam certificados individualmente. Os analistas de laboratório devem ser treinados nas técnicas analíticas para realizar as tarefas de validação (7).

O presente trabalho contempla a revalidação de um método quantitativo (determinação de pH) executado em um

laboratório de metrologia e validação. A revalidação foi necessária devido à aquisição de um novo instrumento para medida de pH. Trata-se, assim, de um exemplo típico da necessidade de verificação da metodologia analítica devido a alguma alteração na rotina da medição.

Foi realizada uma verificação da adequação do novo equipamento ao ensaio feito no laboratório e também da habilidade dos analistas com relação à operação do equipamento, através da avaliação da precisão e das equivalências dos equipamentos e dos analistas. Apenas os analistas que haviam participado da primeira validação deste ensaio, nesse laboratório, executaram os ensaios de revalidação, já que o limite máximo de variação permitido nas medições de pH foi estabelecido na primeira validação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Na verificação da adequação do equipamento novo ao laboratório foram selecionados três tipos de amostra – soluções tampão pH = 4, pH = 7 e pH = 10 (Merck, Darmstadt, Germany), dois analistas e dois equipamentos – o novo (Metrohm, modelo 781 pH/ion meter) e um antigo (WTW, modelo ionLab Level 2), no qual o método havia sido validado anteriormente. Todas as determinações foram realizadas no mesmo dia de acordo com o PROTOCOLO 913/2005, BIO-MANGUINHOS (8).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação da repetitividade, cujos resultados são apresentados na Tabela 1, cada analista separou seis alíquotas de cada amostra, aguardou o equilíbrio térmico com o ambiente e efetuou as medições do pH das soluções no mesmo momento, nos dois instrumentos disponíveis. A média das médias do coeficiente de variação, entre os dois analistas, de todos os tipos de amostra, foi igual a 0,052%, no equipamento I (novo), e a 0,077%, no equipamento II (antigo). De acordo com a validação anterior, mostrada na Tabela 2, este valor poderia ser menor ou igual à média dos coeficientes de variação resultantes das leituras das soluções tampão (pH = 4, pH = 7 e pH = 10), efetuadas no equipamento antigo (II), ou seja, até 0,17%.

Como as soluções possuíam o pH conhecido (soluções tampão), a exatidão pode ser estimada, tendo sido encontrado valor igual a 100% para todas as amostras, garantindo, assim, a qualidade das leituras de pH no laboratório.

Na avaliação da reprodutibilidade intralaboratorial – variando o equipamento e o analista – os cálculos dos ensaios de repetitividade foram aproveitados, já que essa avaliação foi realizada dentro de um grupo de ensaios variando alguma condição possível na rotina do laboratório. Os resultados obtidos, também mostrados na Tabela 1, indicam que o

Tabela 1. Resultados de precisão, repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial

Repetitividade			
Analista I - Equipamento I (Novo)		Analista II - Equipamento I (Novo)	
Médias (pH 4, 7 e 10)	3,993 / 7,007 / 9,923	Médias (pH 4, 7 e 10)	3,985 / 7,009 / 9,916
S_r / CV_r %	0,0050 / 0,057	S_r / CV_r %	0,0040 / 0,047
r_a (95%)	0,012	r_a (95%)	0,012
Exatidão % (pH 4, 7 e 10)	100 / 100 / 99	Exatidão % (pH 4, 7 e 10)	100 / 100 / 99
Analista I - Equipamento II		Analista II - Equipamento II	
Médias (pH 4, 7 e 10)	4,008 / 7,008 / 9,889	Médias (pH 4, 7 e 10)	3,997 / 7,006 / 9,865
S_r / CV_r %	0,0088 / 0,11	S_r / CV_r %	0,0031 / 0,044
r_a (95%)	0,024	r_a (95%)	0,0084
Exatidão % (pH 4, 7 e 10)	100 / 100 / 99	Exatidão % (pH 4, 7 e 10)	100 / 100 / 99
Reprodutibilidade Intralaboratorial			
Variando Equipamento pelo Analista I		Variando Equipamento pelo Analista II	
Médias (pH 4, 7 e 10)	4,000 / 7,007 / 9,898	Médias (pH 4, 7 e 10)	3,991 / 7,008 / 9891
S_R / CV_R %	0,019 / 0,25	S_R / CV_R %	0,018 / 0,23
R_a (95%)	0,052	R_a (95%)	0,050
Variando Analista pelo Equipamento I		Variando Analista pelo Equipamento II	
Médias (pH 4, 7 e 10)	3,989 / 7,008 / 9,898	Médias (pH 4, 7 e 10)	4,002 / 7,007 / 9870
S_R / CV_R %	0,021 / 0,24	S_R / CV_R %	0,018 / 0,22
R_a (95%)	0,056	R_a (95%)	0,043

S_r = desvio padrão da repetitividade; CV_r = coeficiente de variação da repetitividade; r = limite de repetitividade; S_R = desvio padrão da reprodutibilidade; CV_R = coeficiente de variação da reprodutibilidade; R = limite de reprodutibilidade

Tabela 2. Resultados de repetitividade do equipamento antigo (II) referentes à primeira validação

Parâmetros (unidade de pH)	Resultados do Equipamento II					
	3,78	4,00	6,87	7,00	7,41	10,00
Média	3,758	4,003	6,820	6,980	7,375	9,888
Desvio Padrão	0,0098	0,0103	0,0041	0,0063	0,0123	0,0484
CV %	0,2616	0,2580	0,0599	0,0906	0,1661	0,49
Repetitividade	0,0000	0,004	0,0000	0,002	0,004	0,025

Tabela 3. Resultados de repetitividade do equipamento novo (I)

Resultados			
Média	4,01 / 6,99 / 9,15	S_r	0,00067
Limite de Repetitividade (95%)	0,0018	CV_r %	0,0097

S_r = desvio-padrão da repetitividade; CV_r = coeficiente de variação da repetitividade

Tabela 4. Análise da variância da equivalência dos analistas e equipamentos. Modelo dos efeitos fixos

Fonte de variação	Efeito		Erro		F	p
	Graus de liberdade	Média quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática		
(1) Analista	1	0,000450	68	6,138144	0,000073	0,993193
(2) Equipamento	1	0,003556	68	6,138144	0,000579	0,980868
(1) * (2)	1	0,000002	68	6,138144	0,000000	0,999546

coeficiente de variação de reprodutibilidade médio foi de 0,23%, igual ao preconizado na validação anterior.

Para verificação da repetitividade sistema de medição novo, um analista separou uma alíquota de cada tipo de amostra e efetuou dez leituras das mesmas. O coeficiente de variação obtido, mostrado na Tabela 3, foi igual a 0,0097%, menor do que o determinado na primeira validação, no equipamento antigo, que foi igual a 0,014%.

As equivalências foram avaliadas para todas as amostras (pH = 4, pH = 7 e pH = 10), empregando-se os dados de precisão (repetitividade e reprodutibilidade) utilizando-se o teste F, pois só havia dois grupos de análise (dois equipamentos e dois analistas). De acordo com os dados apresentados na Tabela 4, não existe evidência para a rejeição da hipótese nula em relação aos analistas e aos equipamentos, portanto não existe diferença significativa entre os mesmos considerando o nível de significância ($p < 0,05$).

CONCLUSÕES

A prática de validação é essencial para definir se os métodos desenvolvidos ou adaptados estão completamente adequados aos objetivos a que se destinam, a fim de se obter resultados confiáveis que possam ser satisfatoriamente interpretados, possibilitando o conhecimento das limitações e da confiabilidade nas medidas realizadas nas análises. O método pode ser considerado validado, mesmo que alguns parâme-

tros não se enquadrem nos limites estabelecidos na literatura, mas que sejam criteriosamente conhecidos e, portanto, adequados aos objetivos do laboratório. Conseqüentemente, a validação analítica, a estimativa de incerteza, o controle estatístico do método e a qualificação de equipamentos analíticos fazem parte dos sistemas de qualidade de laboratórios analíticos. Assim, esse trabalho mostrou, a importância da revalidação dos métodos antes de sua implantação no laboratório e da verificação da validação a cada vez que chegarem analistas e equipamentos novos no laboratório.

Referências

1. Ewing's Analytical Instrumentation Handbook, 3th edition, edited by Cazes J. (2005).
2. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**, Bookman Companhia Editora, 5ª edição, 2002.
3. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**, 20th edition, Washington, 1998.
4. SILVA, A. & CARVALHO, M. *Como iniciar validação de métodos*. **Metrologia & Instrumentação**, v. 44. 2004. (www.banasmetrologia.com.br)
5. LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. RiMa, 62p., 2004.
6. BARROS, C. B. & HIRATA, Y. S. *Validação de métodos analíticos*. REMESP, 2005.
7. NICOLÓSI, M. *Validação de métodos analíticos*. **Controle de Contaminação**, 34 (6), 12-21. 2003.
8. BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 913/2005, 2005.