

ANÁLISE QUANTITATIVA POR CROMATOGRAFIA

Antônio Luiz Pires Valente (*in memoriam*), [Fabio Augusto](#) e Cássio Ricardo Fares Riedo
Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, CP 6154,
13084-862 Campinas, São Paulo - Brasil

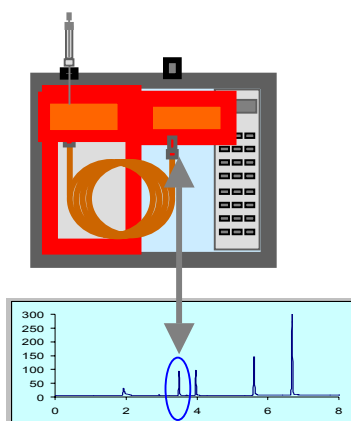
RESUMO

Este é um texto de apoio ao aplicativo multimídia **Análise Quantitativa por Cromatografia** (disponível em Aplicativos e Programas). A sua finalidade é a de oferecer ao leitor material similar, na forma impressa, ao do multimídia. Este texto é mais detalhado do que o apresentado no aplicativo, mas tem um número muito menor de figuras. É também uma forma complementar para a apresentação das informações e interpretações, podendo servir tanto como material de apoio como resumo do material original.

Palavras-chave: Cromatografia, Curva Analítica, Tratamento de Dados, Teste de Huber

Introdução

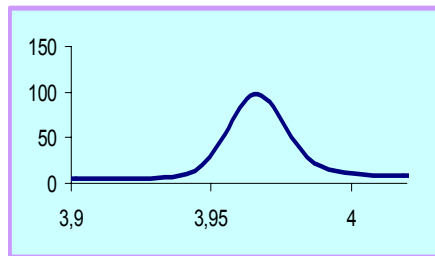
A análise quantitativa em cromatografia é baseada em estabelecer o valor da área da **banda** cromatográfica. Na cromatografia em coluna, isto é, gasosa (CG) e em cromatografia líquida (comumente de alta eficiência, CLAE) a banda é registrada como um pico (Figura 1) que, idealmente deve ter formato gaussiano.



O parâmetro quantitativo fundamental em cromatografia é a área da banda cromatográfica.

Figura 1. Esquema de um cromatógrafo gasoso e de um cromatograma obtido por cromatografia gasosa.

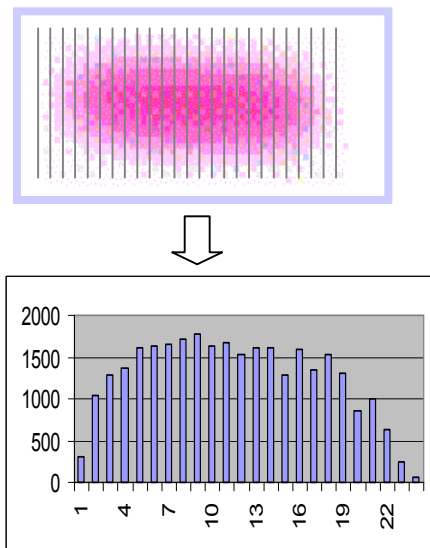
Em cromatografia gasosa de alta resolução, onde são usadas colunas capilares, não é incomum que os picos tenham perfil gaussiano, como demonstrado no detalhe da Figura 2, que é o pico destacado em azul da Figura 1.



Na prática da cromatografia são observados picos gaussianos.

Figura 2. Detalhe do pico destacado em azul na Figura 1, mostrando que ele tende ao perfil gaussiano.

Similarmente ao que ocorre na cromatografia em coluna, as manchas observadas em cromatografia em camada delgada (CCD) também tendem à distribuição gaussiana. Isto é mostrado na Figura 3, em que as quantidades de analito numa mancha foram obtidas para secções verticais:

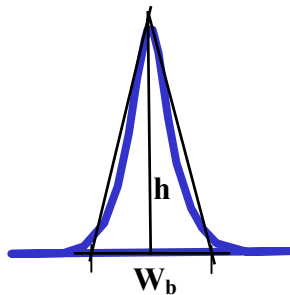


As bandas cromatográficas tendem ao perfil gaussiano.

Figura 3. Distribuição das quantidades (figura inferior) de analito numa mancha (figura superior) de CCD.

Portanto, nos casos mostrados nas figuras anteriores, nas correspondentes bandas cromatográficas as quantidades dos analitos tendem ao perfil gaussiano, isto é, aumentam das bordas para o centro da mancha e, simetricamente, diminuem do centro para a outra borda.

Quando a banda cromatográfica é registrada na forma de pico, a sua área pode ser calculada, como mostrado abaixo, como a área do triângulo isósceles que “engloba” o pico cromatográfico (Figura 4).

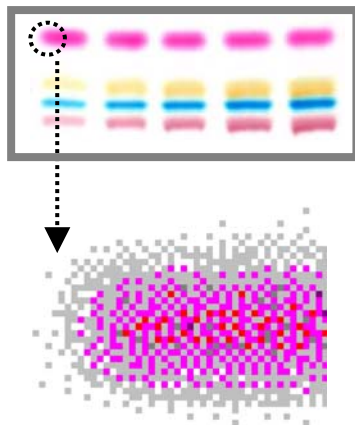


Cálculo da área de um pico cromatográfico por triangulação:

$$A = \frac{1}{2} \cdot h \cdot W_b$$

Figura 4. $A = \frac{1}{2} h \cdot W_b$. Cálculo da área de um pico cromatográfico por triangulação.

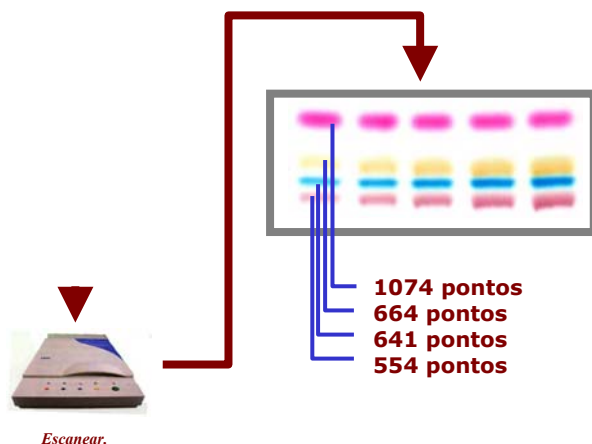
Na cromatografia em camada delgada a área da mancha é estabelecida por **densitometria**, cujo princípio está representado na Figura 5.



A densitometria faz a contagem do número de pontos de uma imagem.

Figura 5. O princípio da densitometria: o número de pontos que define a mancha (como “vista” por um densitômetro ou computador) é proporcional à área da mancha.

O procedimento e princípio de obter áreas em CCD a partir de imagens digitalizadas e arquivadas em computador está representado na Figura 6: as placas – no caso com manchas visíveis de corantes – são digitalizadas e com o arquivo gerado realiza-se a contagem dos pontos (pixels é o termo usado na área de computação) que compõem cada mancha. A contagem pode ser feita manualmente – com muita paciência – ou por meio de um programa que conte os pixels. O número de pontos é proporcional à área da correspondente mancha e, conseqüentemente, proporcional à quantidade de analito nela existente. Esta metodologia representa o **princípio** de estabelecimento de áreas cromatográficas.



O número de pontos que compõem uma mancha escaneada é proporcional à sua área.

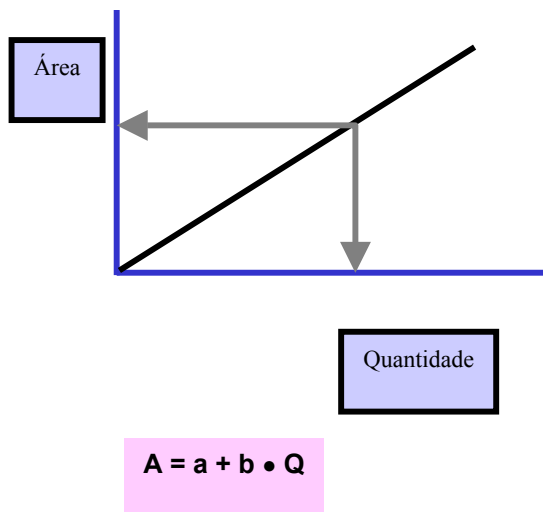
Figura 6. Princípio do estabelecimento de área de uma mancha de CCD por meio de escaneamento da placa cromatográfica.

Apesar do **método** de determinar áreas ser diferente para CG e CLAE, o princípio é o mesmo do usado em CCD.

O uso das áreas cromatográficas – a curva analítica

É medindo-se as áreas cromatográficas que se estabelecem as quantidades de analitos em amostras analisadas e a melhor forma de realizar quantificações é a baseada numa Curva Analítica¹. A Curva Analítica (Figura 7) é a relação entre sinais – no caso as áreas – e quantidades do analito a ser quantificado.

¹ Curva Analítica é o nome sugerido pela IUPAC para substituir o termo Curva de Calibração.



Toda análise efetivamente quantitativa exige o uso da curva analítica.

Figura 7. Esboço de uma Curva Analítica linear (representada pela equação de uma reta).

Obtendo uma Curva Analítica

O primeiro passo para obter a curva analítica é preparar um conjunto de soluções com um **padrão** do analito que se deseja quantificar em amostras. Portanto, é **necessário** conhecer a identidade do analito e dispor dele na forma de padrão (puro ou, se isso não for possível, com pureza exatamente conhecida e determinada independentemente).

Cinco a seis soluções costumam ser suficientes para este trabalho. Estas soluções são aplicadas lado a lado na placa cromatográfica e é realizada a corrida cromatográfica. Como não é incomum que numa análise tenha-se que quantificar vários analitos, as soluções podem conter todos eles, do que resultará uma cromatoplaça como a mostrada nas Figuras 5 e 6. Então as áreas das manchas são obtidas (Figura 6) e tabeladas, como mostrado na Tabela 1.

Dispondo de dados como o da Tabela 1 aplica-se a eles uma Regressão Linear para obter a equação da curva analítica, isto é, a relação funcional entre Sinais e Quantidades. Para o caso dos dados da Tabela 1, a equação de reta que relaciona as áreas com as concentrações do V40² é:

Tabela 1. Concentrações preparadas e áreas obtidas para as correspondentes manchas cromatográficas – o analito é o corante Vermelho 40 (V40).

C (g/L)	Área
2,8	117
5,7	135
8,4	162
11,2	194
14,1	207

² O V40 é um corante artificial usado em alimentos.

$$A = 91,7 + 8,5 \cdot C \quad (\text{Equação 1})$$

Note-se que a curva analítica é definida como a relação entre sinais e quantidades; no entanto, na Equação 1 as quantidades são representadas pelas concentrações das soluções. Isto implica que os volumes de amostra aplicados na placa cromatográfica foram **iguais**, pois, $C = Q / V$ (C = concentração; Q = quantidade; V =volume).

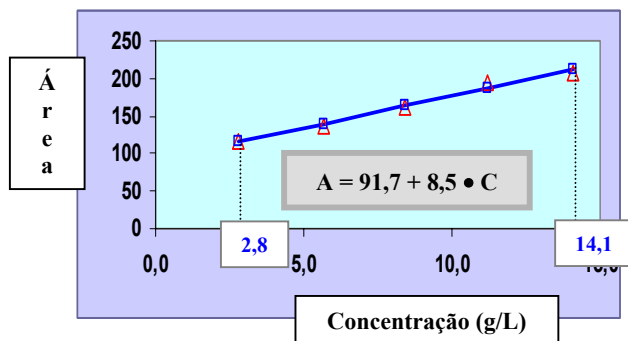
Usando a curva analítica

Dispondo da equação da curva analítica pode-se calcular as quantidades do analito em amostras. As amostras são aplicadas em outra placa (mesmo volume usado das soluções-padrão), a corrida é realizada sob as mesmas condições usadas para o conjunto de padrões e as áreas do analito nas amostras são determinadas. Suponhamos que para uma amostra esta área foi estabelecida como de 184 pixels. Este valor é substituído na equação (1) da curva analítica e obtém-se a quantidade do analito na amostra (no caso a sua concentração):

$$184 = 91,7 + 8,5 \cdot C;$$

$$C = (184 - 91,7) / 8,5;$$

$$C = 10,9 \text{ g L}^{-1}$$



Numa curva analítica interpolam-se resultados. As extrapolações não refletem resultados efetivamente quantitativos.

Figura 8. Gráfico da curva analítica obtida para os dados da Tabela 1.

Nesta Figura 8 estão destacados os valores inferior ($2,8 \text{ g L}^{-1}$) e superior ($14,1 \text{ g L}^{-1}$) das concentrações usadas para obter a curva analítica. O valor acima calculado $C = 10,9 \text{ g L}^{-1}$ é intermediário entre estes extremos. Portanto, ele foi **interpolado** usando-se a Equação 1. Como somente se conhece o comportamento da curva entre

aqueles extremos, **somente** interpolações são válidas para fins efetivamente quantitativos. Extrapolações não são aceitáveis. *Isto é uma regra geral em Química Analítica.*

A confiabilidade dos dados (e da Curva Analítica)

A curva analítica é obtida com dados experimentais, que sempre estão sujeitos a erros e desvios. Por isto, os dados costumam oscilar e pode ser difícil ou impossível obter uma equação que os represente com confiabilidade. Um dos motivos é a inevitável flutuação dos volumes aplicados na placa cromatográfica. Um recurso para contornar esta dificuldade – além do cuidado com operações experimentais tecnicamente corretas – é trabalhar com dados em **replicatas**.

Em CCD isto corresponde a, por exemplo, preparar três placas cromatográficas e aplicar em cada uma delas as soluções de concentrações variadas dos padrões. A Tabela 2 mostra que, em cada placa aplicam-se amostras com cinco concentrações: 0,3; 0,6; 0,9; 1,2 e 1,5 g L⁻¹. Assim, por concentração, dispõe-se de triplicata das áreas cromatográficas.

É comum que após obter as triplicatas calculem-se as **médias** das áreas correspondentes a cada concentração, para se aplicar a regressão linear sobre estas médias e concentrações. *Sem um critério adequado isto pode levar a erros.*

Tomemos como exemplo a menor concentração e suas áreas 462, 416 e 462, cuja média é igual a 447. No entanto, uma simples inspeção visual da Tabela 2, torna evidente que a área 416 não deve ser usada no cálculo da média; desprezando este valor obtem-se uma média mais representativa, que é igual a 462. O valor 416 é claramente oriundo de algum erro, possivelmente devido ao volume aplicado de amostra e, se usado no cálculo, descaracteriza o significado da média. Diz-se que ele é um valor **anômalo**, o qual, conseqüentemente, não deve ser considerado. Ocorre que na Tabela 2 existem outros anômalos, e como é um conjunto de 15 dados fica difícil identificar todos eles por inspeções “visuais” como a acima referida. No entanto existe um conjunto de critérios bastante seguro para identificar e desprezar anômalos, que é baseado na Curva de Linearidade.

Tabela 2. Áreas medidas em triplicatas para as cinco concentrações.

C(g/L)	Área	Área2	Área3	Média
0,3	462	416	462	447
0,6	929	924	924	926
0,9	1386	1525	1340	1417
1,2	1843	1848	1827	1839
1,5	2310	2079	2305	2231



são cinco áreas por placa

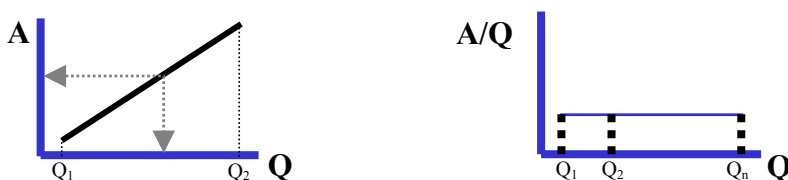
A representatividade de médias sempre deve ser verificada.

A Curva de Linearidade

A Curva de Linearidade origina-se de um princípio bastante simples: *admite-se* que os dados ajustam-se a uma equação de reta do tipo

$$y = a + b \cdot x \quad (\text{Equação 2}),$$

a qual tem um coeficiente angular, **b**, constante. Experimentalmente o que isto significa? Significa que *idealmente* os quocientes entre as áreas medidas e correspondentes concentrações seriam constantes, como mostrado na Figura 9 (A / Q).

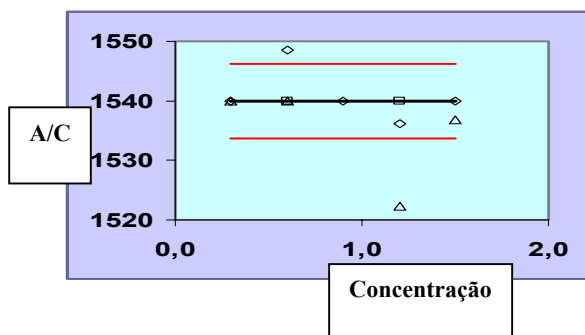


Com a curva de linearidade pode-se identificar dados anômalos.

Figura 9. A Curva de Linearidade (à direita): razões A/Q (correspondentes) vs Q resultaria (idealmente) numa reta paralela com o eixo X.

Portanto, usando os dados da Tabela 3 calculam-se os valores A/C, que são plotados em relação às correspondentes concentrações. Disto resulta o gráfico da Figura 10.

Tabela 3. Valores de concentração e quocientes de Área por Concentração (A/C).



C (g/L)	(A/C) ₁	(A/C) ₂	(A/C) ₃
0,3	1540	1386	1540
0,6	1549	1540	1540
0,9	1540	1694	1489
1,2	1536	1540	1522
1,5	1540	1386	1537

Figura 10. Curva de linearidade para os dados da Tabela 3. Os valores de A/C superiores a 1546 e inferiores a 1534 – indicados com campo sombreado na Tabela 3 – foram rejeitados.

Nas considerações da Tabela 3 e da Figura 10 não indicamos *porque* os pontos superiores a 1546 e inferiores a 1534 foram rejeitados. Isto é pormenorizado a seguir.

A rejeição sistemática de anômalos

Para rejeitar anômalos com base na curva de linearidade, usando o procedimento chamado Teste de Huber, é necessário: (1) estabelecer um valor central (linha preta na Figura 10) e, acima e abaixo dela, intervalos de confiança (linhas vermelhas) que definem quais os dados aceitáveis – isto é, os que pertencem ao intervalo de confiança. É necessário um critério para estabelecer o valor central de forma que ele não dependa dos dados anômalos. Isto é feito obtendo-se a **mediana** dos dados.

Para estabelecer o valor central a mediana (**md**) é preferível à média, porque o valor da mediana **não** é afetado pelos anômalos. Para obter a **md** ordenam-se os dados (área/concentração) e, no presente exemplo, como são 15 dados, a **md** é o oitavo deles, isto é 1540. Portanto, o valor central deste conjunto de A/C é $md = 1540$, como realçado na Tabela 4. O próximo passo é estabelecer os intervalos de confiança. Antes, porém, uma observação: a média deste conjunto é 1525 (marcado em vermelho na Tabela 4), um valor bastante menor do que o da **md**, e claramente inadequado para representar o conjunto.

Tabela 4. Valores ordenados em quocientes de Área por Concentração (A/C).

1386	1386	1489
1522	1536	1537
1540	1540	1540
1540	1540	1540
1540	1549	1694

1525

Estabelecendo os intervalos de confiança

O primeiro passo é calcular as diferenças absolutas entre cada valor de **A/C** e a **md**. Por exemplo, para o primeiro valor de A/C:

$$|A/C_1 - md| = |1522 - 1540| = 18 \quad (\text{Equação 3}).$$

A seguir é obtido o chamado desvio absoluto da mediana (**mad**) dos quinze valores $|A/C_i - md|$ e o intervalo de confiança (IC) é calculado como:

$$IC = k \cdot mad \quad (\text{Equação 4})$$

onde **k** é um fator que pode variar de 2 a 8. Para os dados em consideração $mad = 3,1$; usando-se $k = 2$ os valores do intervalo superior e do inferior, que são os limites para desprezar resultados anômalos, são obtidos por:

O intervalo de confiança representa a faixa de variação que você deve esperar para o seu experimento.

$$IC_{s,i} = md \pm k \cdot mad = 1540 \pm 2 \cdot 3,1 \quad (\text{Equação 5})$$

ou seja,

$$IC_s = 1546; \quad IC_i = 1534;$$

de forma que os dados rejeitados são destacados pelos sombreados mostrados na Tabela 5.

Naturalmente esta definição de intervalos de confiança - e do critério para rejeições de anômalos - deve ser comentada. Em primeiro lugar, o critério parece ser excessivamente subjetivo pois, afinal, quem decide o valor de k e, portanto, da rigidez com que os dados são desprezados é o analista. Mas, de fato, com bom senso o critério deixa de ser “absolutamente subjetivo”. Este bom senso implica, entre outras coisas, em adicionar mais um parâmetro na avaliação do resultado final (que é a equação da curva analítica). Este outro parâmetro chama-se **resíduo**, r_s .

Quais são os dados rejeitados?

Antes de discutir os resíduos é necessário estabelecer quais os dados a serem rejeitados. Na Tabela 4 estão os dados **A/C** rejeitados, *mas não é com estes que se constrói a curva analítica*. No entanto, aos valores indicados na Tabela 5 correspondem a áreas que estão na Tabela 2, que são, respectivamente, (considerando colunas-linhas): 416, 929, 1525, 2079, 1340 e 1827. **Portanto, estas são as áreas a serem rejeitadas.**

O uso dos resíduos

Após eliminar os dados anômalos *supõe-se* que os remanescentes representem adequadamente a relação existente entre **Área e Concentração** – *é com áreas e concentrações que se constrói a curva analítica*. Portanto, a regressão linear é aplicada às áreas não rejeitadas da Tabela 5, obtendo-se a seguinte equação para a *possível* curva analítica:

$$A = 2,10 + 1537,7 \cdot C; \quad r = 1,000 \quad (\text{Equação 6})$$

Tabela 5. Reprodução da Tabela 3 indicando os dados rejeitados.

C (g/L)	(A/C) ₁	(A/C) ₂	(A/C) ₃
0,3	1540	1386	1540
0,6	1549	1540	1540
0,9	1540	1694	1489
1,2	1536	1540	1522
1,5	1540	1386	1537

Observe que, no teste de Huber, o estabelecimento do valor do coeficiente k não é totalmente arbitrário.

Os resíduos representam o grau de confiabilidade de interpolação de dados com a sua curva analítica.

Nesta equação (6) pode-se substituir os valores das concentrações (0,3 g L⁻¹ a 1,5 g L⁻¹) para obter valores interpolados de áreas (A_{int}). Então são calculadas as diferenças relativas (%) entre estes A_{int} e as **médias** das correspondentes áreas experimentais (\bar{A}_{exp}). Por exemplo, para a concentração de 0,3 g L⁻¹ a $\bar{A}_{exp} = 462$ e a A_{int} = 463, de forma que:

$$r_s = 100 (A_{int} - \bar{A}_{exp})/100 = + 0,3\% \text{ (Equação 7).}$$

Os valores r_s (calculados para todas as concentrações) são os resíduos, isto é, as medidas de quanto as áreas interpoladas se afastam das experimentais. Para o exemplo considerado os resíduos estão relacionados na Tabela 6.

Agora dispõe-se de mais informações para decidir se a escolha de k = 2 foi adequada para o critério de rejeição.

Os resíduos mostrados na Tabela 6 sugerem que o erro máximo a ser cometido em interpolações com a equação obtida para a curva analítica estariam em torno de 0,3 %. Para cromatografia em camada delgada pode-se considerar este como um resultado muito bom. Por outro lado, considerando os sinais dos resíduos existe suficiente compensação entre resíduos positivos e negativos. Ademais, o coeficiente de correlação obtido r = 1,000 é indicativo de ótima precisão da curva obtida. Portanto, pelo conjunto de argumentos acima pode-se concluir que a seleção de k = 2 foi um critério adequado para a rejeição de resultados. O contrário ocorreria se, por exemplo, dos 15 dados fossem rejeitados 7 ou 8; neste caso seria necessário repetir o procedimento com k = 3 e reanalisar os resultados. Outra possibilidade seria dos resíduos serem excessivamente elevados e apresentarem uma distribuição claramente não-aleatória entre valores positivos e negativos (caso onde o modelo linear de calibração não é aplicável). Estes casos poderiam sugerir erros experimentais e, inevitavelmente, a repetição de todo o procedimento cromatográfico.

Tabela 6. Valores de áreas interpoladas e resíduos.

A int	r_s (%)
463,4	+ 0,3
924,7	- 0,1
1386,0	0,0
1847,3	- 0,1
2308,6	0,0

Um resumo do procedimento

Dispondo das áreas cromatográficas o que se faz é (as etapas de 1 a 6 constituem o chamado *Teste de Huber*, baseado em medianas para rejeição de anômalos):

1. Dividir as áreas pelas correspondentes concentrações, para plotar um esboço de curva de linearidade: A/C vs C .
2. Calcular a **md** das razões A/C .
3. Calcular as diferenças absolutas entre as **A/C** e **md**.
4. Obter a mediana **mad** dessas diferenças absolutas.
5. Calcular os $IC = k \cdot mad$ e estabelecer os limites superior e inferior $IC_{S,I} = md \pm k \cdot md$.
6. Rejeitar as A/C de valor acima ou abaixo dos $IC_{S,I}$ e, conseqüentemente, as correspondentes áreas.
7. Aplicar a regressão linear às médias das áreas não rejeitadas e concentrações para obter uma equação para a curva analítica.
8. Substituir os valores das concentrações nesta equação para obter áreas interpoladas e calcular os resíduos.

Uma generalização da curva de linearidade e um critério mais genérico para a aplicação do teste de Huber

As discussões anteriores foram baseadas no fato de que **se** a curva analítica obedece a uma equação do primeiro grau, $A = a + b \cdot C$ ou, como mostrado na equação 2, $y = a + b \cdot x$, ela tem um coeficiente angular, ou a sua primeira derivada, constante. Isto também aplica-se quando o *coeficiente angular*, **b**, é diferente de zero, pois: então,

$$b = \frac{A - a}{C} \quad (\text{Equação 8}).$$

A equação 8 permite generalizar o critério de **quais** dados aplicar o teste de Huber. Consideremos um segundo exemplo de obtenção de curva analítica.

Obtendo a Curva Analítica quando o coeficiente linear é muito diferente de zero

Na Tabela 7 está outro conjunto de dados obtidos por cromatografia em camada delgada. Ao calcular as razões A/C com estes dados e plota-las na forma de uma curva de linearidade obtém-se o gráfico da Figura 11.

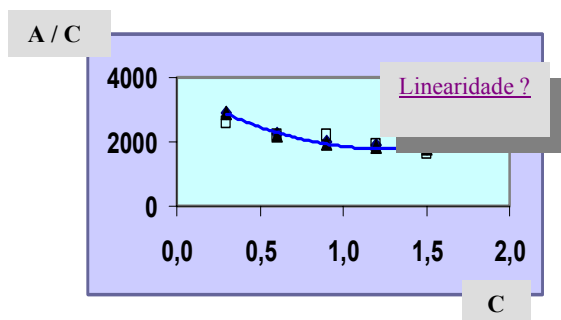


Figura 11. Gráfico obtido com os dados de área e concentração da Tabela 7.

É visível na Figura 11 que **inexiste** uma curva de linearidade. Isto ocorre porque a correspondente curva analítica tem (como se verá a seguir) um coeficiente linear bastante diferente de zero.

Em outros termos, todas as áreas obtidas experimentalmente têm embutido o valor correspondente ao coeficiente linear. Isto é cada área experimental tem um componente **A_i** proporcional à correspondente concentração, **mais** um valor constante **a**, de forma que os quocientes A/C são sucessivamente menores,

$$\frac{A_i + a}{C_1} > \frac{A_{ii} + a}{C_2} > \dots > \frac{A_n + a}{C_n}$$

o que faz com que o gráfico de A/C vs C tenha o aspecto não linear e decrescente mostrado na Figura 11.

A generalização vista na equação 8:

$$b = \frac{A - a}{C},$$

auxilia no contorno a esta dificuldade.

Tabela 7. Áreas em triplicata obtidas para as concentrações da coluna 1.

C	Área 1	Área 2	Área
0,3	872	785	872
0,6	1341	1334	1334
0,9	1796	1976	1737
1,2	2252	2258	2232
1,5	2720	2448	2714

A curva de linearidade tem um aspecto de curva de segundo grau quando o coeficiente linear da curva analítica é muito diferente de zero.

Se as quinze áreas A_i , as concentrações C_i e o coeficiente linear a são substituídos nesta equação obtêm-se quinze valores para o coeficiente linear a .

No entanto, qual o valor de a para tais cálculos, já que ele está “embutido” nas áreas experimentais?

O fato é que este valor pode ser estimado aplicando-se uma regressão linear sobre os dados da Tabela 6. Esta “regressão exploratória” resulta na equação:

$$A = 434,0 + 1493,4 \cdot C; r = 0,9981 \text{ (Equação 9)}$$

de forma que o provisório $a = 434,0$ pode ser substituído na Equação 9 para obterem-se valores b_i correspondentes às concentrações C_i .

Quando isto é feito obtêm-se os valores b_i 1-3 listados na Tabela 8. Os valores b_i da Tabela 8 (que idealmente seriam constantes), são submetidos ao teste de Huber (com $k = 2$) resultando na rejeição de $b_i = 1169, 1713, 1343$ e 1447 e correspondentes valores de áreas (785, 1976, 2448 e 1737) na Tabela 7. Então, às médias das áreas remanescentes e correspondentes concentrações aplica-se a regressão linear, obtendo-se a equação da curva analítica:

$$A = 416,5 + 1533,8 \cdot C; r = 1,0000 \text{ (Equação 10).}$$

Os resíduos % calculados a partir desta Equação 9 são (respectivamente da menor para a maior concentração): + 0,5; 0,0; - 0,1; - 0,4 e 0,0, indicando que o critério de aplicar o teste de Huber aos valores b_i (obtidos com a Equação 9 a partir de um valor estimado de b conforme a Equação 10) é adequado para obter uma curva analítica com coeficiente linear diferente de zero. **Este critério é geral, de forma que também se aplica quando este coeficiente linear pode ser considerado como estatisticamente nulo.**

Tabela 8. Valores do coeficientes angulares (b) obtidos pelas substituições de A e C (Tabela 7) na Equação 9.

C (g/L)	b_i 1	b_i 2	b_i 3
0,3	1460	1169	1460
0,6	1512	1500	1500
0,9	1513	1713	1447
1,2	1515	1520	1498
1,5	1524	1343	1520

O critério geral é baseado no fato de que uma reta tem coeficiente angular constante.

O uso do método da padronização interna

Os dois exemplos anteriores de obtenção de curva analítica foram baseados no **Método da Padronização Externa (MPE)**, isto é, preparam-se várias soluções com concentrações diferentes do analito e aplica-se na placa volumes iguais destas soluções (Figura 12).

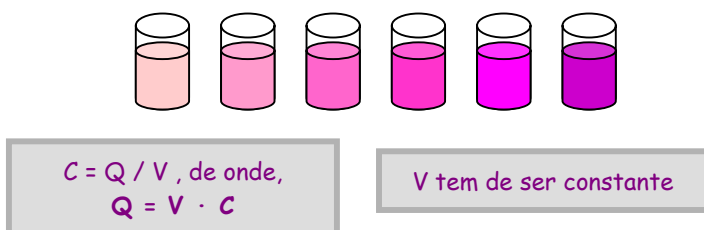


Figura 12. Representação esquemática do princípio do Método da Padronização Externa (MPE).

O Método da Padronização **Externa** tem, dentre outras, uma condição rígida: os volumes aplicados devem ser iguais, o que dificilmente se consegue na prática, de forma que **as áreas cromatográficas** podem oscilar substancialmente, levando a resultados como os apresentados na Tabela 9 e Figura 13.

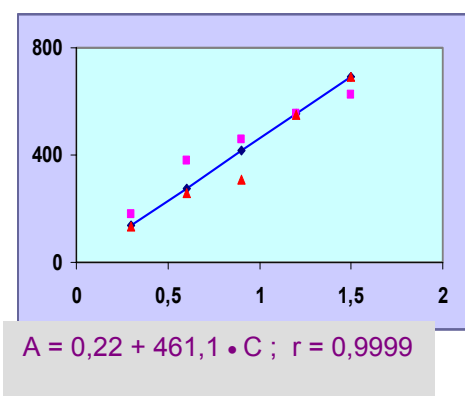


Figura 13. Gráfico e equação da curva analítica obtida para os dados da Tabela 9.

A curva analítica acima só tem aparência de boa qualidade, pois ela foi obtida depois que oito dos quinze dados originais foram rejeitados pelo teste de Huber. Isto é certamente demasiado, pois foram rejeitadas mais de 50 % da **informação**. Este problema, que ocorreu por excessiva flutuação dos volumes de amostra aplicados,

Tabela 9. Conjunto de dados de Áreas e Concentrações. Os dados com sombreado foram rejeitados após o teste de Huber. A correspondente curva analítica é mostrada na Figura 13.

C (g/L)	A ₁	A ₂	A ₃
0,3	138	180	135
0,6	277	379	258
0,9	416	457	310
1,2	553	554	548
1,5	693	624	692

pode ser contornado com o **Método da Padronização Interna (MPI)**.

O método da padronização interna

O MPI consiste em adicionar às soluções usadas para obter a curva analítica um composto, de forma que sua concentração seja a mesma em todas as soluções (Figura 14). Este composto é denominado de **padrão interno (PI)**.

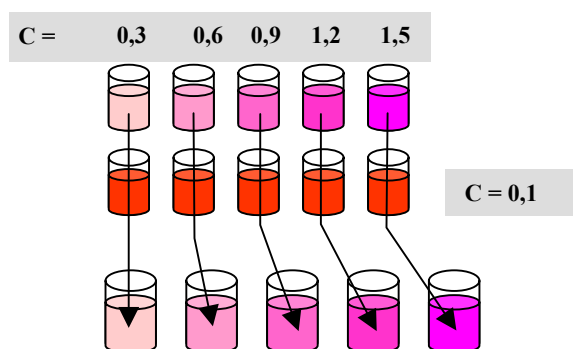


Figura 14. MPI: cinco soluções do analito com concentrações variadas, às quais é adicionado o PI em concentração única.

Depois de preparadas as soluções do analito mais o **PI** elas são aplicadas na placa, efetua-se a corrida cromatográfica e medem-se as áreas. As áreas do analito (variáveis) são divididas pela área do **PI** (que deveria ser constante), obtendo-se as razões de área, $Rz(A)$. As concentrações do analito são divididas pela concentração (valor único) do **PI**, obtendo-se as razões de concentração $Rz(C)$. Para o exemplo em questão estes dados estão na Tabela 10.

Agora a curva analítica é do tipo $Rz(A)$ vs $Rz(C)$, supostamente uma reta. Portanto, o teste de Huber é aplicado sobre os quocientes $Rz(A) / Rz(C)$ – que correspondem à inclinação da curva $Rz(A)$ vs $Rz(C)$. Com isto são rejeitados os dados destacados em sombreado na Tabela 11.

Aos dados não rejeitados aplica-se a regressão linear obtendo-se a seguinte equação de reta:

$$Rz(A) = -0,006 + 0,1083 \cdot Rz(C) \quad (\text{Equação 11})$$

$$r = 0,9999$$

O método da padronização interna atenua os problemas oriundos da incerteza do volume de amostra aplicado.

Tabela 10. Triplicatas das Razões de Concentração e Razões de Área.

$Rz(C)$	$Rz(A_1)$	$Rz(A_2)$	$Rz(A_3)$
3	0,33	0,40	0,32
6	0,64	0,86	0,59
9	0,97	1,09	0,96
12	1,31	1,30	1,26
15	1,60	1,46	1,65

Tabela 11. $Rz(C)$ e $Rz(A)$ (triplicata) às quais é aplicado o teste de Huber. Os dados destacados foram rejeitados.

$Rz(C)$	$Rz(A_1) / Rz(C)$	$Rz(A_2) / Rz(C)$	$Rz(A_3) / Rz(C)$
3	0,110	0,133	0,107
6	0,106	0,144	0,098
9	0,108	0,121	0,107
12	0,109	0,109	0,105
15	0,106	0,097	0,110

Esta equação permite interpolar razões de áreas (a partir das correspondentes razões de concentração com os seguintes resíduos: -1,9; +0,6; +0,4; +0,3; -0,4.

Estes resultados são melhores do que os obtidos sem o recurso do MPI, isto é para os dados de áreas e concentrações da Tabela 6, quando oito de quinze dados foram rejeitados. Resta Compreender o porque da melhora, o que é simples: como o **PI** está **junto** com o analito em todas as soluções cromatografadas, a oscilação de volume de uma aplicação para outra afeta, na mesma proporção, as áreas de ambos. Portanto, quando elas são divididas o efeito da variação do volume aplicado é atenuado.

Finalmente, para quantificar o analito na amostra, adiciona-se a ela o **PI** na mesma concentração usada anteriormente e, com a razão de áreas obtidas para a amostra interpola-se a correspondente razão de concentrações e calcula-se a concentração desconhecida do analito.

Conclusões

A análise quantitativa implica na obtenção de uma curva analítica para o analito a ser quantificado. Dificilmente pode-se usar outro composto para obter a curva, porque a sensibilidade de resposta do detector (a inclinação da curva analítica) pode, aliás costuma, ser típica do composto. Com a equação da curva interpolam-se valores de quantidade (que pode ser concentração quando o volume aplicado é constante) do analito em amostras desconhecidas.

Extrapolações não são válidas, porque o comportamento linear (só avaliamos curvas descritas por equações do primeiro grau, que são as mais comuns) só foi estabelecido na faixa estudada. Para determinar a região de linearidade usa-se o princípio da curva de linearidade, apoiado num método de identificação e rejeição de dados anômalos – os que desviam-se da linearidade por razões experimentais. Caso a curva analítica tenha coeficiente linear igual ou muito próximo de zero, a rejeição com o teste de Huber pode ser realizada com sucesso diretamente sobre os quocientes de Área por Concentração (A/C - de fato, generalizando, Sinal/Quantidade). Existindo coeficiente linear diferente de zero é mais conveniente

aplicar o teste sobre valores do *coeficiente angular*. Para tal submete-se os pares Área, Concentração a uma regressão linear para obter uma “equação tentativa”, com a qual interpolam-se os coeficientes angulares a serem inspecionados para rejeição – **como este é um método geral, o mais conveniente seria também aplicá-lo para os casos de coeficiente linear igual ou muito próximo de zero**. A inspeção final da qualidade e confiabilidade da curva analítica obtida envolve o cálculo dos resíduos, avaliando-se seus valores e sinais (pois, por exemplo, excesso de resíduos negativos – ou positivos – sugere algum erro experimental e, conseqüentemente, repetição do experimento); é claro que o total de dados rejeitados também é um fator importante. Uma faixa de resíduos compatível com os recursos químico analíticos disponíveis e um coeficiente de correlação próximo da unidade sugerem que o procedimento para obtenção da curva analítica foi adequado.

No processo acima descrito o teste de rejeição de anômalos é fundamental. Propomos o uso do teste de Huber, porque ele é baseado na rejeição em relação a medianas – um método robusto, pois é independente dos anômalos. O teste de Huber implica na definição do valor do fator **k** pelo analista, o que não deixa de ser subjetivo. Contudo, a subjetividade é baseada em conhecimentos da metodologia analítica e pode ser avaliada para vários valores de **k**, buscando-se coerência entre incertezas conseguidas com a curva analítica e as esperadas para metodologia analítica. Além deste procedimento eliminar uma subjetividade absoluta, ele tem como grande vantagem a interação do analista com seus dados, o que certamente aumenta a sua visão da metodologia analítica que tem em mãos. Finalmente, curvas analíticas tem de ser obtidas com muitos dados, o que torna impraticável rejeições por “inspeções visuais”, assim como torna muito tedioso aplicar o teste de Huber com “cálculos manuais”, o que sugere o uso de recursos como uma planilha eletrônica que, quando adequadamente estruturada, recalcula todos os dados quando se altera o valor de **k**.