

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA E VALIDAÇÃO DE
MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE BORO, ENXOFRE,
FÓSFORO E MOLIBDÊNIO EM FERTILIZANTE MINERAL
POR ICP OES**

TIAGO CHARÃO DE OLIVEIRA

TESE DE DOUTORADO

Porto Alegre, janeiro de 2016.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TIAGO CHARÃO DE OLIVEIRA

OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA E VALIDAÇÃO DE
MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE BORO, ENXOFRE,
FÓSFORO E MOLIBDÊNIO EM FERTILIZANTE MINERAL
POR ICP OES

Tese apresentada como requisito
parcial para a obtenção do grau
de Doutor em Química

Prof^a. Dr^a. Dirce Pozebon
Orientadora

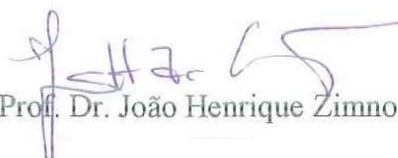
Porto Alegre, janeiro de 2016.

A presente tese foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre setembro de 2011 e janeiro de 2016, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação da Professora Doutora Dirce Pozebon. A tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:


Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler


Dr. Rodrigo Barcellos Hoff


Prof. Dr. João Henrique Zimnoch dos Santos


Prof. Dr. Marco Flôres Ferrão


Profa. Dra. Dirce Pozebon


Tiago Charão de Oliveira

“When your character started, you had no Experience Points. But in your first adventure, you killed a giant snake and a goblin, and found some treasure. You get Experience Points for each of these things. (...)

You will probably work your way up to Level 3, 4, 5 and so forth, becoming more powerful each time.”

Gary Gygax and Dave Arneson and Frank Mentzer.
Dungeons & Dragons Set 1: Basic Rules, 1983.

When a character reaches character level 20, your “normal” progression ends. However, this is by no means the end of the character’s career.

Andy Collins and Bruce R. Cordell.
Epic Level Handbook, 2001.

Dedico esta tese a minha família. Toda ela.

Aos que não estão mais aqui.

Aos que estão.

Aos que estarão.

AGRADECIMENTOS

À minha família...

Aos meus pais, João e Marislei, e ao meu irmão Túlio, pelo carinho incondicional, pela atenção, pelo apoio e pelos ensinamentos primordiais;

A minha esposa Lavínia, e aos meus filhos Tomás e Larissa, pelo afago, pelas provocações, pelos desafios. São os catalizadores que me fazem sempre querer ir além;

Aos meus avôs, tios, primos, sogros, cunhados e outros familiares mais e menos distantes, pelo acolhimento, pelo acalento e pelo constante incentivo.

Aos Professores...

Dirce Pozebon, que mais do que uma orientadora, foi uma mentora em toda a minha trajetória acadêmica, desde a minha primeira bolsa de iniciação científica (em meados do milênio passado) até a conclusão deste trabalho. Sei que, não fosse sua contínua insistência, não teria nem iniciado este trabalho;

Marcos Flôres Ferrão, pela inestimável contribuição aos experimentos multivariados executados neste trabalho;

José Vicente Lima Robaína, Paulo Cesar Pereira das Neves, Luiz Antonio Mazzini Fontoura, Hermes Luís Neubauer de Amorim e Paulo Augusto Netz, modelos essenciais ao meu desenvolvimento profissional. Faróis de qualidade, dedicação e profissionalismo que conheci durante minhas graduações;

Jorge Almeida Guimarães, pela fundamental contribuição para minha formação;

... do Instituto de Química da UFRGS pelos valiosos ensinamentos e pela compreensão da condição diferenciada do aluno, que trabalha, que viaja a trabalho no período letivo e que tem filhos;

... membros da banca, pelo aceite para participar da avaliação desta tese e pelas preciosas contribuições, que muitas vezes deram sentido a frases e a ideias truncadas ou incompletas.

Aos colegas de trabalho...

João Mathias Becker, Aguinaldo Parussolo e Priscila Rech Pinto Moser pelo constante apoio e pela compreensão que a qualidade do serviço público se faz pela capacitação de seus servidores;

Fabício Pedrotti e Jéferson Segalin pelas gentis sugestões no desenvolvimento e no texto final desta tese;

Marcelo Caetano Alexandre Marcelo, Roger Teixeira Rampazzo, Lucas Suchecki Barnet, Graciane Fabiela da Silva e Tielle Moraes de Almeida pela saudável troca de ideias e pelo apoio experimental;

... do Lanagro/RS, que apesar de não estarem diretamente envolvidos na elaboração deste trabalho, muitas vezes tiveram que trabalhar dobrado, cobrindo minha ausência, enquanto estava cursando as atividades acadêmicas ou desenvolvendo os experimentos que geraram esta tese.

Aos demais amigos, pelo companheirismo e pelo constante “rolar de dados”.

Aos Criadores Larry Page e Sergey Brin, pois dizem que é de bom tom encerrar com um agradecimento ecumênico.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	x
Lista de Tabelas.....	xii
Lista de Abreviaturas.....	xiv
Resumo.....	xv
Abstract.....	xvi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 FERTILIZANTES MINERAIS.....	3
2.2 MÉTODOS PARA ANÁLISE DE BORO, ENXOFRE, FÓSFORO E MOLIBDÊNIO EM FERTILIZANTES MINERAIS.....	3
2.3 PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS.....	4
2.3.1 Planejamentos fatoriais 2^k	5
2.3.2 Planejamentos fatoriais 2^k racionários.....	6
2.3.3 Planejamentos fatoriais 2^k saturados.....	7
2.3.4 Planejamentos Plackett e Burman.....	7
2.3.5 Planejamentos Doehlert.....	8
2.4 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS.....	9
2.4.1 Seletividade, efeito de matriz e robustez.....	10
2.4.2 Linearidade.....	10
2.4.3 Exatidão e precisão.....	11
2.4.4 Limites de detecção e quantificação.....	11
2.5 ESTIMATIVA DA INCERTEZA DA MEDIÇÃO.....	12
2.5.1 Expressão do modelo matemático.....	13
2.5.2 Determinação das fontes de incerteza.....	13
2.5.3 Cálculo das contribuições individuais.....	14
2.5.4 Cálculo da incerteza combinada.....	14
2.5.5 Cálculo da incerteza expandida.....	15
3 OBJETIVOS.....	16
4 PARTE EXPERIMENTAL.....	17

4.1 EQUIPAMENTOS.....	17
4.2 REAGENTES E SOLUÇÕES.....	20
4.3 FERRAMENTAS COMPUTACIONAIS.....	21
4.4 AMOSTRAS.....	21
4.5 MATERIAIS DE REFERÊNCIA E AMOSTRAS INTERLABORATORIAIS..	21
4.6 PROCEDIMENTO.....	22
4.6.1 Extração assistida por micro-ondas.....	22
4.6.2 Outras extrações.....	23
4.6.3 Determinação dos analitos por ICP OES.....	23
4.6.4 Expressão dos resultados.....	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	25
5.1 OTIMIZAÇÃO DAS EXTRAÇÕES DOS ANALITOS.....	25
5.2 OTIMIZAÇÕES DE PARÂMETROS DE OPERAÇÃO DO ICP OES.....	32
5.3 SELETIVIDADE E EFEITO DE MATRIZ.....	38
5.4 LINEARIDADE.....	46
5.5 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO.....	47
5.6 PRECISÃO.....	49
5.7 ESTIMATIVA DA INCERTEZA.....	52
5.7.1 Determinação das contribuições individuais.....	54
5.7.1.1 Curva analítica.....	54
5.7.1.2 Fator de diluição.....	56
5.7.1.3 Pesagem.....	56
5.7.1.4 Precisão estimada como precisão intermediária.....	57
5.7.1.5 Exatidão estimada pela recuperação.....	57
5.7.1.6 Resumo das contribuições individuais.....	59
5.7.2 Determinação das incertezas combinada e expandida.....	61
5.7.3 Contribuições relativas para a incerteza.....	61
5.8 EXPERIMENTOS ADICIONAIS PARA AVALIAR A EXATIDÃO.....	63
6 CONCLUSÕES.....	67
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
ANEXO 1.....	74
ANEXO 2.....	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Planejamento Experimental Doehlert. A figura superior ilustra a visualização do esquema do modelo perpendicular ao eixo X_3 . Na figura inferior tem-se uma vista tridimensional do esquema. Cada número do ensaio na Tabela I corresponde à representação geométrica. C_1 a C_n são às repetições do ponto central. Adaptada de Cataldi e colaboradores.....9

Figura 2: Influências do HNO_3 e do tempo na extração do enxofre elementar assistida por radiação micro-ondas. No eixo x da figura à direita é informado o volume de HNO_3 adicionado (em níveis), no y o tempo de extração (em níveis) e em z é a recuperação do enxofre em % (m/m)..... 28

Figura 3: Gráfico de probabilidade normal para o enxofre e razão $Mg(II)/Mg(I)$. O fator 1 é a potência do plasma, o 2 a velocidade da bomba peristáltica e o 3 é a pressão do gás de nebulização. Os outros efeitos são contribuições de segunda ordem..... 35

Figura 4: Superfícies de resposta para a otimização das condições instrumentais. Em todos os gráficos, x corresponde à velocidade da bomba peristáltica, y a pressão do gás de nebulização, e z a intensidade do sinal analítico, com exceção para a razão $Mg(II)/Mg(I)$ onde z corresponde aos valores da razão determinados..... 36

Figura 5: Superfícies de resposta para o coeficiente de variação (CV); x representa a velocidade da bomba peristáltica, y a pressão do gás de nebulização - ambos em níveis algébricos - e z a intensidade do sinal analítico.....38

Figura 6: Sinais de emissão do cobre e do fósforo P(I) 213,618 nm. Na correção desta interferência, pode haver supercompensação, o que acarreta na supressão da intensidade do sinal do fósforo em cerca de 70%.....42

Figura 7: Diagrama de causas e efeitos (a) e modelo matemático (b) sugerido para a determinação dos efeitos aleatórios para os métodos de determinação de fósforo, boro, molibdênio e enxofre em fertilizante mineral. Neste diagrama, R&R é a precisão

intermediária acrescida da repetitividade, m é a massa da amostra, FD é o fator de diluição da solução analítica e L é a concentração do analito..... 53

Figura 8: Principais componentes da incerteza nas determinações de boro, enxofre, fósforo e molibdênio. Os percentuais das incertezas cujas contribuições são menores que 1% não são apresentados..... 63

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Matriz de planejamento Doehlert para três variáveis.....	9
Tabela II: Parâmetros instrumentais estabelecidos e condições utilizadas nas determinações por ICP OES.....	17
Tabela III: Comprimentos de onda monitorados para cada elemento.....	18
Tabela IV: Erros máximos tolerados para balões volumétricos, pipetas volumétricas e micropipetas.....	19
Tabela V: Níveis e fatores avaliados na otimização das condições de extração dos analitos em forno micro-ondas e resultados obtidos.....	27
Tabela VI: Níveis e fatores avaliados na otimização das condições de extração dos analitos em sistema aberto e resultados obtidos.....	30
Tabela VII: Fatores e níveis avaliados na otimização das condições instrumentais e resultados obtidos.....	34
Tabela VIII: Planejamento Plackett-Burman para avaliar o efeito de interferentes. As letras maiúsculas correspondem à ausência do interferente e as minúsculas à presença do mesmo; K ₂ O: 120 mg L ⁻¹ ; Ca: 30 mg L ⁻¹ ; Mg: 30 mg L ⁻¹ ; Cu: 30 mg L ⁻¹ ; Zn: 30 mg L ⁻¹ ; Mn: 30 mg L ⁻¹ e solução de CNA 10% (v/v).....	39
Tabela IX: Resultados obtidos na avaliação dos interferentes, cujas combinações equivalem às concentrações apresentadas na Tabela VIII.....	40
Tabela X: Valores médios das concentrações dos analitos na ausência (letras maiúsculas) e presença (letras minúsculas) dos interferentes. O desvio padrão para cada elemento foi calculado a partir dos 8 valores da mediana, informados na Tabela IX.....	41
Tabela XI: Resultados obtidos na avaliação dos interferentes, cujas combinações referem-se a K ₂ O: 120 mg L ⁻¹ ; Ca, Mg, Cu, Zn e Mn: 30 mg L ⁻¹ e solução de CNA: 10% (m/v)	43
Tabela XII: Valores médios das concentrações dos analitos na ausência (letras maiúsculas) e presença (letras minúsculas) dos interferentes. O desvio padrão para cada elemento foi calculado a partir dos 8 valores da mediana informados na Tabela XI. Quando não há adição de CNA, G = g e quando não há adição de Cu, D = d (ver Tabela VIII).....	44
Tabela XIII: Concentração de B, S, P e Mo nas soluções de calibração, na determinação desses elementos em fertilizantes e respectivas matérias-primas.....	46
Tabela XIV: Número de <i>outliers</i> e parâmetros das curvas de calibração após a retirada dos <i>outliers</i>	47

Tabela XV: Média e desvio padrão de 21 medições do branco analítico, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) estimados para cada analito em fertilizante e garantias mínimas informadas pelos fabricantes.....	49
Tabela XVI: Precisão intermediária para os nutrientes investigados. Resultados individuais, médias e desvios padrão (em % m/m) para cada analito	50
Tabela XVII: Significância da recuperação do analito; n = 30 para B, S e P e 18 para Mo....	58
Tabela XVIII: Fatores de contribuição da incerteza e coeficientes de sensibilidade. L é a concentração do analito na solução diluída da amostra; FD é o fator de diluição da solução da amostra; m é a massa de amostra; PC é a diluição da solução de maior concentração na curva analítica; CP é a concentração do analito nesta solução de calibração.....	59
Tabela XIX: Contribuições de cada componente na determinação de boro, enxofre, fósforo e molibdênio em fertilizante e enxofre elementar em matéria-prima, por ICP OES.....	60
Tabela XX: Incertezas combinada e expandida na determinação de boro, enxofre (expresso como sulfato), fósforo e molibdênio em fertilizante e enxofre elementar em matéria-prima, por ICP OES.....	61
Tabela XXI: Resultados da análise dos materiais de referência.....	65
Tabela XXII: Resultado da análise das amostras de estudos interlaboratoriais.....	65
Tabela XXIII: Concentração de enxofre encontrada nas amostras analisadas.....	66
Tabela XXIV: Recuperação do enxofre elementar adicionado a uma amostra comercial (identificada como 162/F) antes da extração assistida por radiação micro-ondas em frasco fechado.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

% m/m - percentual massa/massa

% v/v - percentual volume/volume

AAS - espectrometria de absorção atômica

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BPL - Boas Práticas Laboratoriais

CNA - citrato neutro de amônio

CV - coeficiente de variação

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

FD - fator de diluição

GUM - Guia para a Expressão da Incerteza das Medições

ICP OES - espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

ISO - Organização Internacional para a Padronização

LANAGRO – Laboratório Nacional Agropecuário

LD - limite de detecção

LQ - limite de quantificação

LQs - limites de quantificação

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MDIC - Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior

NIST - *National Institute of Standards and Technology*

OMA - *Official Methods of Analysis* publicado pela *AOAC International*

PIB - Produto Interno Bruto

RBC - Rede Brasileira de Calibrações

Veff - número efetivo de graus de liberdade

VIM - Vocabulário Internacional de Metrologia

RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidos e validados métodos de determinação de boro, enxofre, fósforo e molibdênio em fertilizante mineral e enxofre elementar em formulação comercial, por ICP OES.

As condições de preparação das amostras foram otimizadas mediante metodologia multivariada, utilizando-se matriz Doehlert. A decomposição da amostra em sistema fechado, com o auxílio de radiação micro-ondas, mostrou-se necessária somente para a determinação de enxofre na formulação comercial.

As condições consideradas ótimas, pela mesma abordagem multivariada, para a potência do plasma, pressão do gás de nebulização e vazão da solução da amostra nas determinações por ICP OES foram 1,50 kW, 180 kPa e 2,4 mL min⁻¹, respectivamente.

O método mostrou-se seletivo, exceto para a interferência do cobre no sinal do fósforo (213,618 nm) e do citrato neutro de amônio (CNA) para todos os elementos. Foram obtidas curvas analíticas com boa linearidade, normalidade, homocedasticidade dos resíduos e inexistência de auto correlação. Os limites de quantificação teóricos, segundo os métodos propostos são: 0,042% (m/m) de enxofre (extraído mediante aquecimento por radiação micro-ondas em frasco fechado); 0,030% (m/m) de boro (extração em frasco aberto e aquecimento sob ebulição em chapa metálica); 0,010 % (m/m) de fósforo (extração com CNA + H₂O), medido em 213,618 nm; 0,118 % (m/m) de fósforo (extração com CNA + H₂O), medido em 213,547 nm; 0,0050% (m/m) de molibdênio (extração em frasco aberto e aquecimento sob ebulição em chapa metálica).

As incertezas relativas estimadas segundo a metodologia *Bottom-Up* foram: 7,1% para o boro; 4,3% para o enxofre; 7,6% para o molibdênio; 7,4% para o fósforo medido em 213,618 nm e 7,8% quando medido em 213,547 nm. Os principais fatores de incerteza identificados foram: precisão intermediária, recuperação do analito, regressão linear da curva analítica e a incerteza herdada do volume medido/liberado pelos aparelhos volumétricos utilizados (vidrarias e micropipetas).

Foram obtidos resultados satisfatórios nas análises de materiais de referência, amostras analisadas em programas interlaboratoriais e nos testes de recuperação do enxofre, demonstrando a adequação dos métodos propostos para o uso em rotina.

ABSTRACT

This study deals with the development and validation of methods for boron, sulfur, phosphorus and molybdenum determination in mineral fertilizer and elemental sulfur in commercial formulation by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES).

The sample preparation conditions/procedures were optimized by a multivariate approach, using a Doehlert matrix. The plasma power, nebulizer gas pressure and peristaltic pump speed used in ICP OES determinations were 1.50 kW, 180 kPa and 24 rpm (2.4 mL min⁻¹) respectively, which were optimized following the same multivariate approach (using a Doehlert matrix). For sulfur determination in commercial formulation of sulfur, the sample decomposition needed to be carried out in closed flask and assisted by microwave radiation.

The methods proved to be interference-free, excepting spectral interference of copper on phosphorus 213.618 nm and non-spectral interference by neutral ammonium citrate (NAC) on all investigated elements. Calibration curves with good linearity, normality, homoscedasticity of residues and without autocorrelation were obtained. The theoretical limits of quantification of the developed and validated methods are: 0.042% (m/m) of sulfur (extracted in closed flask in microwave oven); 0.030% (m/m) of boron (extraction in open flask and heating on hot plate); 0.010% (m/m) of phosphorus (extraction by NAC + H₂O), measured in 213.618 nm; 0.118% (m/m) of phosphorus (extraction by NAC + H₂O), measured in 213.547 nm and 0.0050% (m/m) of molybdenum (extraction in open flask and heating on hot plate).

The uncertainties of the methods estimated by the Bottom-Up approach were: 7.1% for boron; 4.3% for sulfur; 7.6% for molybdenum; 7.4% for phosphorus 213.618 nm and 7.8% for phosphorus 213.547 nm. The main factors of uncertainty identified were: intermediate precision, analyte recovery, linear regression for calibration curve and the inherited uncertainty of the measured/released volume by volumetric devices used (laboratory glassware and micropipettes).

Satisfactory results were found in the analysis of certified reference materials, samples analyzed in inter-laboratory comparison programs and sulfur recovery in spiked sample of commercial formulation of sulfur. These results obtained demonstrated that the proposed methods are suitable for routine analysis of mineral fertilizer and commercial sulfur formulation.

1 INTRODUÇÃO

Correspondendo a cerca de 23% do PIB brasileiro¹, o agronegócio é um dos principais componentes da economia e da balança comercial do país. Segundo dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC), em 2014, o “complexo soja” foi o principal produto de exportação, sendo responsável por 14% do total das exportações. Este percentual, somado a 7,5% de carnes, 4,6% de açúcar e etanol, 3,2% de papel e celulose e 2,9% de café, resulta em aproximadamente um terço das vendas brasileiras para o exterior².

Dentro deste contexto econômico, a categoria comercial “fertilizantes” é a sétima maior entre os produtos importados pelo Brasil, correspondendo a 3,7% do mercado em 2014, ou a cerca de 8 bilhões e meio de dólares². Esta quantidade equivale a aproximadamente 32 bilhões de quilogramas de fertilizantes, quase o dobro do produzido internamente no mesmo período³. Ou seja, ao mesmo tempo em que o produto do agronegócio corresponde a um elevado percentual das vendas nacionais para o exterior, uma parcela significativa de um dos principais insumos é importada.

A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) estimou que o consumo mundial de fertilizante em 2014 foi em torno de 187 bilhões de quilogramas, prevendo a utilização de 197 bilhões de quilogramas para 2016⁴. Para 2018, a previsão da FAO converge com a da *International Fertilizer Industry Association*, estimando uma necessidade de aproximadamente 200 bilhões de quilogramas de fertilizante^{4,5}.

A grande quantidade de fertilizante envolvida dá margem à fraude, à adulteração ou à falsificação, onde ocorre o fornecimento de fertilizante com um conteúdo de nutrientes inferior ao declarado na embalagem. A legislação vigente no Brasil prevê estas possibilidades de infração e as classificam em leve, grave ou gravíssima, conforme a diferença entre o valor declarado e o fornecido⁶. No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é o órgão regulador e fiscalizador da produção e do comércio de fertilizantes destinados à agricultura⁷.

Publicada no final de 2014, a versão mais atual do Manual de Métodos Analíticos Oficiais para Fertilizante e Corretivos⁸, apesar de já recomendar o uso da espectrometria atômica para a determinação de diversos elementos, contempla apenas a utilização de métodos gravimétricos (para enxofre e fósforo) e da espectrometria de absorção molecular na região do visível (para boro, fósforo e molibdênio). De acordo com o manual atualizado, são

empregadas técnicas mundialmente recomendadas pela FAO⁹, pela Comunidade Econômica Europeia¹⁰ e pelo Japão¹¹.

Por sua vez, a *AOAC International* disponibiliza um método para a determinação de metais nutrientes por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), o qual não contempla a determinação de não metais e metalóides^{12,13}. Uma dificuldade adicional é a necessidade de se determinar o enxofre na sua forma elementar, o qual está presente em várias fórmulas comerciais. Porém, o enxofre elementar não é quantificado diretamente pelos métodos tradicionais, necessitando-se de uma etapa adicional, e eventualmente lenta, para a sua determinação. Esta dificuldade adicional também existe para as plantas, pois, para que o enxofre elementar presente no fertilizante se transforme numa forma absorvível, deve ocorrer sua biotransformação por bactérias existentes no solo, em condições específicas de umidade, temperatura e aeração, criando um mecanismo de contínua reação do elemento para sua biodisponibilidade^{14,15}.

Assim, a importância do fertilizante para o país, somada com a possibilidade de fraudes e carência de procedimentos oficiais que utilizem técnicas mais atuais, demanda o desenvolvimento de métodos mais rápidos e confiáveis, que possam ser utilizados na fiscalização. Neste contexto, no presente trabalho busca-se o desenvolvimento e a validação de métodos para a determinação simultânea de boro, enxofre, fósforo e molibdênio em fertilizantes minerais por ICP OES.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FERTILIZANTES MINERAIS

A legislação brasileira⁷ considera fertilizante como “*a substância mineral ou orgânica, natural ou sintética, fornecedora de um ou mais nutrientes vegetais*”. Ela classifica como fertilizante mineral o “*produto de natureza fundamentalmente mineral, natural ou sintético, obtido por processo físico, químico ou físico-químico, fornecedor de um ou mais nutrientes de plantas*”.

Esses nutrientes, de acordo com a legislação⁶, são classificados em macro ou micronutrientes, sendo que os primeiros podem ser primários ou secundários. O nitrogênio, o fósforo e o potássio são considerados macronutrientes primários. Por sua vez, o cálcio, o magnésio e o enxofre são classificados como secundários. São considerados micronutrientes o boro, cloro, cobre, ferro, manganês, molibdênio, zinco, cobalto, silício e “*outros elementos que a pesquisa científica vier a definir, expressos nas suas formas elementares*”. Esta classificação está relacionada à escala de concentração e não à importância para o crescimento vegetal. Em geral, os macronutrientes estão presentes nos tecidos vegetais em concentrações maiores que 0,1%, em base seca. Por outro lado, os micronutrientes aparecem em concentrações inferiores a 100 µg g⁻¹, em base seca¹⁶.

2.2 MÉTODOS PARA ANÁLISE DE BORO, ENXOFRE, FÓSFORO E MOLIBDÊNIO EM FERTILIZANTES MINERAIS

O Manual de Métodos Analíticos Oficiais para Fertilizante e Corretivos⁸ vigente na Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários, a qual inclui a rede de Laboratórios Nacionais Agropecuários - LANAGROs, descreve procedimentos para a determinação de nutrientes baseados em publicações da *AOAC International*¹⁷⁻¹⁹, Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT)²⁰, entre outras fontes. Neste manual, não estão incluídos métodos envolvendo o uso de ICP OES. Porém, sugere a técnica como alternativa à espectrometria de absorção atômica (AAS).

Esta carência de métodos instrumentais soma-se à ausência de propostas normativas para a análise de fertilizantes por ICP OES. No Brasil, a ABNT não possui normas publicadas com esta abordagem²¹. No entanto, a *AOAC International*, em 2006, passou a sugerir um método oficial de análise (OMA) para a determinação de arsênio, cádmio, cobalto, cromo, chumbo,

molibdênio, níquel e selênio por ICP OES¹². Até a presente data, trata-se do único método oficializado para a análise de fertilizantes por ICP OES¹³. Além disso, publicações da AOAC International incluem ainda propostas para a determinação de boro²², fósforo²³ e enxofre²⁴. Apesar de, até a presente data, estas publicações não serem ainda métodos oficiais, o uso de ICP OES, ao menos para a determinação de fósforo, continua sendo discutido dentro desta associação²⁵.

O uso de ICP OES para a determinação de boro, fósforo e enxofre em diversas outras matrizes vem sendo proposto²⁶⁻²⁹. Uma recente proposta, que vem ao encontro deste trabalho, foi apresentada por Souza e Colaboradores²⁹. Este grupo descreveu um método para a determinação simultânea de nutrientes em fertilizantes por ICP OES, incluindo o fósforo. Os autores consideraram os resultados obtidos como promissores e adequados às necessidades da fiscalização brasileira.

Comparando-se aos métodos clássicos, as principais vantagens da técnica de ICP OES são a maior velocidade de análise, simplicidade, melhor sensibilidade e exatidão para macro e micronutrientes no fertilizante. Embora, exista possibilidade de haver interferências causadas pela matriz do fertilizante mineral, estas podem ser contornadas mediante diluição adequada da solução da amostra, calibração com ajuste de matriz, além do ajuste dos parâmetros instrumentais. Para desenvolver e validar os métodos de análise de fertilizantes por ICP OES, tanto os efeitos de matriz quanto dos parâmetros instrumentais podem ser dimensionados, principalmente mediante abordagem multivariada.

2.3 PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS

A Química Analítica pode ser definida como a ciência que busca determinar as condições de maior qualidade possível na quantificação de um analito ou propriedade de interesse. Para atingir tal fim, é necessária a realização de experimentos que contemplem as variações experimentais existentes, da forma mais abrangente possível.

Para tal finalidade, é comum a realização de experimentos univariados, cada um visando avaliar uma determinada condição. Porém, esta abordagem é problemática sob dois principais aspectos. O primeiro deles é a criação de possíveis pontos de máximo local, onde uma condição considerada ótima pode não ser real quando consideradas as sinergias existentes no sistema (interações de maior ordem). A segunda dificuldade é o custo envolvido na realização de todos os estudos independentes³⁰.

Desta forma, os planejamentos multivariados surgem como uma ferramenta que pode auxiliar tanto na determinação das interações de ordem maiores quanto no ganho de tempo e custo. A princípio, estas duas vantagens parecem excludentes, já que, como discutido adiante, a redução do número de experimentos pode levar à perda de dados. Porém, um experimento de triagem inicial pode não só reduzir significativamente o número de variáveis aparentemente relevantes, como direcionar a experimentos complementares³¹.

Para o planejamento multivariado são utilizadas matrizes pré-definidas para condições de análise e realização dos experimentos. Em geral, atribuem-se às colunas os diferentes fatores estudados e às linhas os experimentos realizados. Nesta abordagem, os fatores são as variáveis controláveis do experimento³².

Para um planejamento completo é necessário um número de experimentos igual ao produto do número de variáveis de cada fator utilizado. Por exemplo, para um experimento onde o primeiro fator envolva 3 condições, o segundo 4 e o terceiro 2, são necessários 24 experimentos. A notação utilizada para este tipo de planejamento representa a multiplicação do número de condições para cada fator estudado. O exemplo anterior é designado como um planejamento fatorial $3 \times 4 \times 2$ ³³.

2.3.1 Planejamentos fatoriais 2^k

Algumas vezes, não se sabe se os fatores escolhidos possuem um efeito significativo na propriedade estudada. Nestes casos, um planejamento multivariado pode indicar apenas o efeito da presença ou ausência de um fator, caso este seja qualitativo, ou níveis extremos deste, se quantitativo. Outra possibilidade de se verificar o efeito qualitativo é o estudo de níveis discretos, como ocorre com equipamentos que possuem um número limitado de condições de configuração. Assim, utiliza-se um planejamento onde cada fator possui apenas duas condições (ou níveis) e o número de experimentos será igual a uma potência de dois, tendo como expoente o número de variáveis estudadas³². A este planejamento dá-se o nome 2^k .

Nesses planejamentos, constrói-se a matriz experimental atribuindo-se o sinal negativo (-) para um dos níveis ou condições, geralmente o menor ou basal, e o sinal positivo (+) para outro^{32,34,35}. Letras maiúsculas e minúsculas são convenções utilizadas para designar os diferentes níveis, como alternativa aos sinais positivo e negativo³⁶.

Em planejamentos 2^k , a notação usada para os efeitos de maior ordem é o produto da multiplicação dos fatores primários, sem o uso de qualquer sinal aritmético. Assim, assume-se

a notação 12 para a interação entre os fatores 1 e 2; 124 para a interação entre os fatores 1, 2 e 4 e assim sucessivamente. Como se trata de um experimento em uma matriz experimental onde a propriedade associativa é válida, a interação 12, por exemplo, é equivalente à interação 21³³.

O efeito das variações na grandeza observada, para cada fator, é determinado pela média de todos os experimentos envolvidos no nível alternativo considerado, diminuída da média daqueles que apresentam o nível basal. A relevância da variação é definida em função do nível de significância estatística desejado³³.

2.3.2 Planejamentos fatoriais 2^k fracionários

Devido à própria função matemática, com o aumento do número de variáveis testadas, o número de experimentos em um planejamento 2^k aumenta exponencialmente. Eventualmente, o número de experimentos torna-se impraticável, ou antieconômico, nas condições de experimentação. Nestes casos, pode-se reduzir o número de experimentos através de um planejamento fracionário^{34,37}.

Utiliza-se a notação 2^{k-n} , sendo k o número de variáveis e n o número de divisões por dois que a matriz de planejamento receberá. Por exemplo, um planejamento 2^{7-1} designa a metade do número de experimentos de um planejamento 2^7 , enquanto que a notação 2^{7-2} designa uma matriz correspondente a 1/4 dos experimentos originais³⁴.

Na montagem deste tipo de planejamento parte-se de um fatorial 2^k completo, com um número de variáveis inferior ao desejado e atribui-se às colunas de maior ordem às variáveis adicionais. Porém, ao reduzir-se o número de experimentos, perdem-se graus de liberdade e, conseqüentemente, passa-se a confundir efeitos de diferentes ordens. Desta forma, se um planejamento 2^4 permite calcular até quinze efeitos independentes (4 primários, 6 secundários, 4 terciários e 1 quaternário), um planejamento 2^{4-1} possibilita o cálculo de apenas sete efeitos. Neste exemplo, o valor experimental obtido para o fator 4 será uma soma deste fator primário com a interação 123³⁵.

Denomina-se “resolução do planejamento” a propriedade que designa o número de variáveis independentes que podem ser estimadas em um dado planejamento. Um experimento fornecerá um número de dados independentes, proporcional a esta propriedade. A notação empregada para demonstrar a resolução de um experimento é um algarismo romano³³. Por exemplo, para um fatorial fracionário de resolução quatro, denota-se 2_{IV}^{k-n} .

Devido ao fato da diminuição da resolução de um experimento levar à sobreposição dos efeitos de maior ordem, havendo dúvida quanto a real importância de um fator, podem-se realizar experimentos adicionais. Este artifício é necessário quando um fator aparenta relevância, mas é calculado juntamente com efeitos de ordem maior de outros fatores também significativos.

2.3.3 Planejamentos fatoriais 2^k saturados

Quando o fracionamento de um planejamento fracionário atinge o número máximo de fatores que podem ser estudados com um número fixo de experimentos, diz-se que ele se tornou saturado. Para um planejamento 2^k é possível, no ponto de saturação, estimar $k-1$ variáveis (um grau de liberdade é gasto para o cálculo da média)³³.

Em um planejamento saturado perde-se a independência de todas as interações de ordem dois ou superior. Porém, este tipo de ferramenta não perde sua utilidade, pois ela direciona experimentos adicionais, quando for considerado fundamental resolver tais interações.

2.3.4 Planejamentos Plackett e Burman

Os planejamentos do tipo Plackett e Burman são uma condição especial de planejamento fracionário saturado, onde todas as colunas são ortogonais. Ou seja, sendo n o número de ensaios, os sinais positivos de qualquer coluna correspondem a $n/4$ testes positivos e $n/4$ testes negativos nas demais colunas³³.

Uma vantagem deste tipo de planejamento é a possibilidade da determinação do efeito de cada variação, utilizando-se sempre as médias dos fatores, mantendo-se fixo o número de graus de liberdade do experimento. Assim, se pode determinar, pela equação 1, a significância de cada variação do experimento³⁰.

$$\Delta_{\text{crit}} > \frac{ts}{\sqrt{2}} \quad (\text{eq. 1})$$

Onde,

Δ_{crit} é o valor máximo que uma variação pode apresentar sem ser crítica;

t é o valor crítico no teste de t de *student* bicaudal, dentro do nível de confiança requerido;

s é o desvio padrão da resposta.

Este tipo de planejamento foi utilizado por Youden³⁸ para determinar a robustez de um método, sendo atualmente recomendado pelo INMETRO³⁹.

2.3.5 Planejamentos Doehlert

Quando não basta apenas determinar se os fatores envolvidos são significativos, mas também é indispensável quantificar as influências e interações destes dentro do sistema, ferramentas multivariadas mais complexas do que os fatoriais 2^k tornam-se necessárias. Desta forma, para aperfeiçoar ou obter uma resposta mais acurada da variação de um processo, métodos de planejamento experimental de segunda ordem fazem-se imprescindíveis.

Entre as ferramentas recomendadas, matrizes experimentais Doehlert são consideradas como as mais eficientes, para qualquer número de fatores estudados, tanto para a obtenção do máximo de informações com o mínimo de experimentos, quanto para mapear espaços estatísticos⁴⁰.

Um planejamento Doehlert necessitará da condução de k^2+k+c experimentos⁴⁰, sendo k o número de variáveis estudadas e c o número de repetições do ponto central. Um maior valor de c acarreta em maior rigor estatístico no experimento, pois permite que se conheçam as flutuações de natureza puramente aleatórias, as quais não são relacionadas com variáveis em estudo.

Um sistema Doehlert com duas variáveis pode ser representado na forma de um hexágono. Ao acrescentar-se uma terceira variável, a representação gráfica da matriz experimental assume a forma de um cubo-octaedro. A inclusão de variáveis adicionais é permitida, gerando hiper-cubo-octaedros de k dimensões. A partir de três variáveis, independentemente de quantas forem, a primeira sempre terá cinco níveis de variação, a última três e todas as intermediárias possuirão sete níveis³⁵.

Uma vantagem do número variado de níveis para as múltiplas variáveis estudadas é a possibilidade de incluir parâmetros discretos que possuam pouca flexibilidade de valores. Esta necessidade pode surgir devido à imprecisão metrológica ou a limitações do instrumento utilizado. Nestes casos, alocam-se estes fatores às variáveis com três ou cinco níveis.

A composição exata da matriz experimental, com a definição dos valores utilizados para cada experimento, pode variar conforme são efetuados giros no cubo-octaedro^{35,41}. Uma possibilidade de visualização é apresentada na Figura 1, com as coordenadas exemplificadas na Tabela I. Salienta-se que esta composição foi utilizada em todos os planejamentos do presente trabalho.

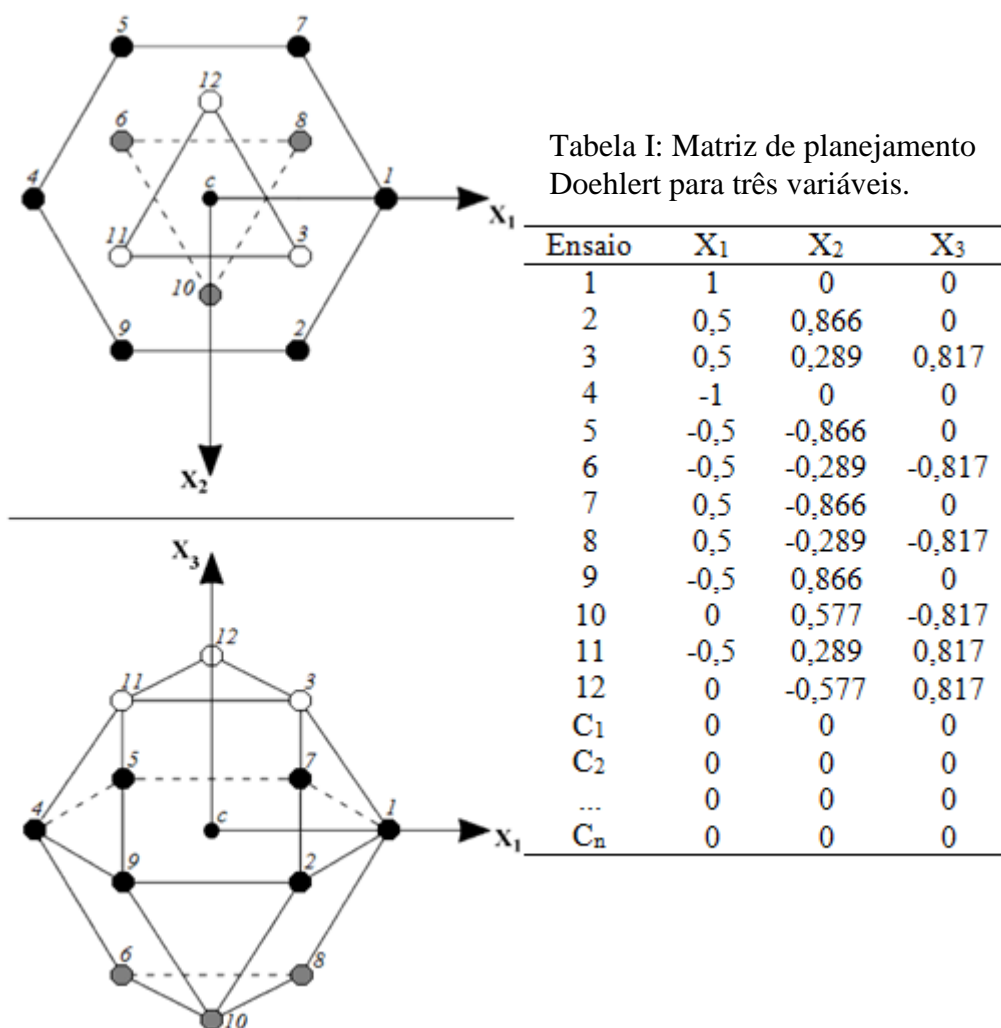


Figura 1: Planejamento Experimental Doehlert. A figura superior ilustra a visualização do esquema do modelo perpendicular ao eixo X₃. Na figura inferior tem-se uma vista tridimensional do esquema. Cada número do ensaio na Tabela I corresponde à representação geométrica dos pontos numerados nos esquemas. C₁ a C_n são às repetições do ponto central. Adaptada de Cataldi e colaboradores⁴¹.

Métodos de planejamento experimental mediante matrizes Doehlert tem sido utilizados em aplicações analíticas⁴², por exemplo, na otimização de métodos de preparo de amostras para posterior determinação de elementos por ICP OES⁴³⁻⁴⁵ e condições instrumentais^{29, 46}.

2.4 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS

A busca pela qualidade e pela confiabilidade metrológica, somada às exigências de organismos fiscalizadores^{47,48}, tem pressionado os laboratórios de análises químicas ao atendimento de normativas tais como a ABNT NBR ISO/IEC 17.025⁴⁹ e Boas Práticas de

Laboratório - BPL⁵⁰. Tais normas utilizam-se da validação metodológica como forma de comprovar a competência de um laboratório em suas rotinas analíticas. A validação envolve o estudo de uma série de fatores que variam conforme o propósito analítico. Para métodos quantitativos instrumentais empregados na determinação de componentes majoritários recomenda-se o estudo da seletividade, robustez, linearidade, exatidão e precisão⁵¹.

2.4.1 Seletividade, efeito de matriz e robustez

O Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM)⁵² relaciona a seletividade com a independência da medição de um mensurando em relação a outras substâncias presentes na amostra. Em Química, este conceito normalmente é relacionado a interferências. Nestes casos, a magnitude do efeito pode ser proporcional à concentração do interferente⁵¹.

Especificamente no campo da espectrometria de emissão atômica, a seletividade diz respeito às interferências espectrais (causadas pela coincidência ou proximidade entre a linha do analito e do interferente) e às não espectrais - estas também denominadas de efeitos de matriz e ocasionadas por alterações no sistema de introdução da amostra no plasma e no plasma propriamente dito, devido a propriedades físicas das amostras e constituintes das mesmas^{53,54}.

A robustez é definida⁵¹ como a sensibilidade a pequenas variações do método, as quais geralmente incluem as condições particulares de cada laboratório. Neste trabalho, o estudo da robustez está diretamente relacionado com as otimizações multivariadas conduzidas e, desta forma, será tratado conjuntamente com elas.

2.4.2 Linearidade

De um modo geral, métodos espectrométricos quantitativos são baseados em covariações entre uma propriedade instrumentalmente medida e a concentração do analito. O modelo de covariação mais simples e utilizado é o linear, que ocorre em intervalos nos quais os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito, seguindo o modelo matemático de regressão $y = ax + b$, determinado pelo método dos mínimos quadrados. Nesta equação, x é a concentração, y é a resposta instrumental, a é o coeficiente angular da reta e b é o coeficiente linear⁵⁵.

O estudo da linearidade é importante para a determinação da relação entre a resposta instrumental e a concentração do analito. A sensibilidade do método é diretamente

proporcional ao módulo do coeficiente angular. Ou seja, um maior coeficiente angular significa que uma menor variação da concentração é necessária para gerar uma variação no sinal analítico⁵¹.

2.4.3 Exatidão e precisão

A exatidão está associada à concordância entre o resultado de uma medição e o valor “verdadeiro” ou de referência (a exatidão é inversa ao erro). Por sua vez, a precisão relaciona-se à concordância entre múltiplas medições repetidas do analito⁵².

A precisão pode ser mensurada em três diferentes abrangências. A primeira delas é a repetitividade, que inclui o mínimo de variações possíveis para um mesmo processo (mesmo analista e equipamento e outros fatores controláveis). A segunda é a precisão intermediária, ou reprodutibilidade intralaboratorial, na qual se procura variar o máximo de fatores existentes na rotina de um único laboratório. Por fim, a quantificação mais abrangente é a reprodutibilidade, esta obtida através de estudos colaborativos⁵¹.

Os valores destes parâmetros devem ser concordantes com os recomendados em normativas gerais, estabelecidos por organismos metrológicos ou fixados em normativas específicas de organismos fiscalizadores como, por exemplo, o MAPA³⁹ e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)⁵⁶.

2.4.4 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) é definido como “concentração em que a probabilidade de obtenção de falsos positivos e negativos seja a menor aceitável” (em geral, 5%)⁵². Já o limite de quantificação (LQ) é definido como “menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão”⁵¹.

A determinação do LD e LQ não é considerada imperativa para analitos presentes em concentrações superiores a 1%⁵¹. Porém, o conhecimento destas figuras de mérito pode ser útil em análises por espectrometria atômica, pois indica o quanto a amostra pode ser diluída e ainda ser analisada com segurança.

Existem diversas técnicas que podem ser empregadas para a determinação do LD e do LQ. Uma técnica comum utiliza n soluções com ajuste de matriz, preparadas independentemente e sem a adição do analito. Para estimar o valor do LD, convencionase usar a média de 10 medições consecutivas do branco analítico (o Manual de Garantia da

Qualidade Analítica⁵⁷ recomenda no mínimo 20), acrescida de 3,3 vezes o desvio padrão das medidas; para o LQ deve ser acrescido 10 vezes o desvio padrão. Formas mais rebuscadas de cálculo acrescentam outros fatores, geralmente derivados dos coeficientes da curva analítica⁵⁸.

Porém, é comum que os limites estimados pelo uso destas ferramentas estatísticas tragam resultados distantes da real capacidade de quantificação do método. Como abordagem mais realista, o INMETRO recomenda a adoção da solução de calibração de menor concentração utilizada para a construção da curva analítica, como o verdadeiro limite de quantificação do método⁵¹.

2.5 ESTIMATIVA DA INCERTEZA DA MEDIÇÃO

Segundo o VIM⁵² “a incerteza consiste no reconhecimento de que, devido à quantidade intrinsecamente incompleta de detalhes na definição duma grandeza, não existe um valor verdadeiro único, mas sim um conjunto de valores verdadeiros consistentes com a definição. Entretanto, este conjunto de valores é, em princípio e na prática, impossível de ser conhecido”.

A norma ABNT NBR ISO/IEC 17.025:2005⁴⁹, no seu item 5.2, estabelece que “a extensão na qual os fatores contribuem para a incerteza total da medição difere consideravelmente entre (tipos de) ensaios e entre (tipos de) calibrações. O laboratório deve levar em conta esses fatores no desenvolvimento dos métodos, procedimentos de ensaios, na calibração, no treinamento e qualificação do pessoal e na seleção e calibração do equipamento que utiliza”. Desta forma, eleva a estimativa da incerteza da medição à base do sistema de qualidade dos laboratórios, de onde parte a avaliação do nível de controle analítico necessário. Apesar disso, a incerteza tem sido erroneamente expressa pelos laboratórios químicos⁵⁹.

Existem vários conceitos para incerteza da medição⁶⁰. Alguns deles, como o apresentado pelo VIM⁵², pela própria generalidade, são excessivamente matemáticos e distantes da realidade das medições químicas.

Um conceito mais específico no âmbito da Química Analítica é proposto por Thompson⁶¹, que define incerteza como “o intervalo ao redor de uma medição que contém o valor verdadeiro com uma alta probabilidade”. O autor chega ainda a atribuir a dificuldade de compreensão do conceito a um problema semântico, pois o uso do termo “intervalo de confiança” seria mais adequado do que “incerteza da medição”, pois é mais próximo do

cotidiano químico. Esta alta probabilidade referenciada por Thompson é, em geral, 95,45%, o equivalente à dispersão bicaudal de dois desvios padrão em uma distribuição normal⁵².

Existem várias formas de estimar e utilizar a incerteza de uma medição e diversos guias foram elaborados para este propósito^{62,63}. O MAPA recomenda a abordagem *Bottom-Up* (passo-a-passo ou componente por componente) para seus laboratórios³⁹. Esta abordagem parte do princípio de que a incerteza final de uma medição equivale à raiz quadrada positiva das variâncias combinadas dos componentes que trazem contribuições individuais significativas. Ela baseia-se na lei da propagação das incertezas, apresentada na equação 2. Esta equação é baseada em uma aproximação de primeira ordem de uma série de Taylor e é válida sempre que a função $f(x_1, x_2, \dots, x_N)$ tiver alta linearidade⁵².

$$u_c^2(y) = \sum_{i=1}^N \frac{\partial f^2}{\partial x_i} u^2 x_i \quad (\text{eq. 2})$$

Onde,

u_c^2 é a incerteza combinada da medição y ;

f é a função que calcula a medição y , onde $y = f(x_1, x_2, \dots, x_N)$;

Cada $u(x_i)$ é uma incerteza padrão equivalente à contribuição individual de x_i .

2.5.1 Expressão do modelo matemático

Ao utilizar o enfoque *Bottom-Up*, a primeira etapa para a estimativa da incerteza é a obtenção do modelo matemático. Em linhas gerais, ele é a função que calcula o resultado final de uma análise, a partir das medições individuais, acrescido de um componente de dispersão, fruto da reprodutibilidade⁶⁴.

2.5.2 Determinação das fontes de incerteza

De posse do modelo matemático, deve-se realizar uma análise crítica para estimar todos os fatores que podem contribuir significativamente para a incerteza da medição em questão. Nesta etapa, a consulta de bibliografia especializada é recomendada⁶⁵. A construção de um diagrama de causas e efeitos⁶⁶ é outra ferramenta útil. Ao final, caso o modelo matemático mostre-se incompleto, ele deve ser complementado com fatores não previstos.

2.5.3 Cálculo das contribuições individuais

Nesta etapa, cada fonte de incerteza, herdada ou estimada no próprio laboratório, é convertida para a forma de um único desvio padrão. Após, deve-se calcular a contribuição de cada fonte em função de seus coeficientes de sensibilidade (derivada parcial do resultado analítico em relação a cada fator individual), conforme a equação 3⁵².

$$u(y, x_i) = \left[\frac{\partial f}{\partial x_i} \right] u(x_i) \quad (\text{eq. 3})$$

Onde,

$u(y, x_i)$ é a contribuição individual de x_i para a incerteza de y ;

f é a função que calcula a medição y , onde $y = f(x_1, x_2, \dots, x_N)$;

$u(x_i)$ é uma incerteza padrão equivalente à contribuição individual de x_i .

2.5.4 Cálculo da incerteza combinada

Após o cálculo das contribuições individuais, é necessário que estas sejam combinadas a fim de gerar um valor único, que seja estimado para o método como um todo. Desta forma, a incerteza combinada é calculada mediante a equação 4 e expressa na forma de um desvio padrão, considerando-se a inexistência ou irrelevância de efeitos correlacionados⁶⁷.

$$u_c(y(x_i)) = \sqrt{\sum_{i=1}^N \left[\frac{\partial f}{\partial x_i} \right]^2 u^2(x_i)} = \sqrt{\sum_{i=1}^N u(y, x_i)^2} \quad (\text{eq. 4})$$

Onde,

$u_c(y(x_i))$ é a incerteza combinada para a medição y , em função de x_i ;

$u(y, x_i)$ é a contribuição individual de x_i para a incerteza de y ;

f é a função que calcula a medição y , onde $y = f(x_1, x_2, \dots, x_N)$;

$u(x_i)$ é uma incerteza padrão equivalente à contribuição individual de x_i .

Um gráfico do tipo “pizza” pode ser utilizado para a visualização das contribuições individuais para a incerteza combinada. Neste caso, deve-se utilizar a equação 5 para a geração dos percentuais individuais.

$$\text{Contribuição de } i = \frac{u(y, x_i)^2}{\sum_{i=1}^N u(y, x_i)^2} \times 100 \quad (\text{eq. 5})$$

Onde,

$u(y, x_i)$ é a contribuição individual de x_i para a incerteza de y .

2.5.5 Cálculo da incerteza expandida

A incerteza expandida tem a função de expressar o valor de incerteza estimado dentro do intervalo de confiança requerido para a medição. Na prática, multiplica-se a incerteza combinada por um número de desvios padrão determinado por um fator de abrangência k . Este fator é igual ao valor crítico de t no teste t de *Student*, bicaudal, com o grau de confiança desejado e o número efetivo de graus de liberdade (V_{eff}) associado à contribuição. No presente trabalho é utilizado o grau de confiança de 95,45%. Para o cálculo do número de graus de liberdade utiliza-se a função de Welch-Satterwaite⁶⁵, conforme a equação 6.

$$V_{eff} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^N \frac{u_i^4(y)}{v_i}} \quad (\text{eq. 6})$$

Onde,

V_{eff} é o número efetivo de graus de liberdade;

$u_c(y)$ é a incerteza combinada para a medição y ;

u_i é a contribuição individual de i para a incerteza de y ;

v_i é o número de graus de liberdade da variável i .

O valor calculado para a incerteza expandida é uma estimativa para o método completo. Normalmente, ele é expresso como “estimativa da incerteza da medição”, na forma de uma dispersão dos resultados analíticos^{67,68}. Porém, alguns autores optam por computar e expressar esta grandeza como um percentual do valor medido, chamado incerteza padrão relativa^{69,70}.

3 OBJETIVOS

O objetivo principal da presente tese é desenvolver e validar métodos de determinação de boro, enxofre, fósforo e molibdênio por ICP OES, utilizando-se a nebulização pneumática convencional para introduzir a amostra no plasma. Tais métodos serão utilizados pelo LANAGRO na fiscalização de fertilizantes minerais. Pretende-se que estes métodos possam ser executados rapidamente e rotineiramente, dentro de um turno de trabalho de 8 horas. Esta perspectiva prevê a realização de análises periciais com acompanhamento de perito representando a empresa fiscalizada interessada.

Além da otimização das condições de extração e medição dos analitos, será estimada a incerteza dos métodos, conduzindo-os a uma futura acreditação junto ao INMETRO, segundo a norma ABNT NBR ISO/IEC 17.025:2005.

São objetivos secundários:

1. Determinar as condições ótimas para a extração de boro, enxofre, fósforo e molibdênio em amostras de fertilizantes minerais, utilizando planejamento experimental e análise multivariada;
2. Selecionar condições instrumentais ótimas, buscando-se a maior precisão e exatidão possíveis, utilizando-se abordagem multivariada para a otimização;
3. Determinar a linearidade e os limites de quantificação para cada analito, conforme estipulado pela legislação brasileira;
4. Verificar a existência de efeito de matriz (naturais da amostra ou gerados pelos solventes extratores), utilizando-se métodos multivariados, corrigindo-se os efeitos, se necessário, mediante ajuste de matriz;
5. Estimar as incertezas dos métodos em todas as suas fases (preparo de amostra e soluções, parâmetros instrumentais, calibração e medição do sinal do analito);
6. Avaliar a exatidão dos métodos desenvolvidos através de comparação com resultados obtidos mediante métodos clássicos de análise, análise de materiais de referência certificados e amostras com valores já informados, segundo programas interlaboratoriais.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 EQUIPAMENTOS

Para a determinação dos elementos investigados foi utilizado um espectrômetro simultâneo de ICP OES, modelo Vista-MPX, marca Varian/Agilent Technologies, configurado com tocha em orientação radial ao detector. Para leituras inferiores a 190 nm, o espectrômetro dispõe de um bocal (*Snout*, no original) entre o plasma e a região pré-óptica, a qual pode ser purgada com gás inerte. As amostras foram introduzidas no plasma com o auxílio de uma nebulizador do tipo V-groove acoplado a uma câmara de nebulização modelo Sturman-Masters, ambos fornecidos como padrão pelo fabricante do espectrômetro de ICP OES. Foi utilizado um modelo padrão de tocha, com tubo injetor (1,4 mm de diâmetro interno) feito de quartzo. Argônio grau analítico (pureza mínima de 99,999%) fornecido pela White Martins/Praxair INC foi utilizado como gás do plasma, carregador/nebulizador, auxiliar e para purga da óptica.

Para evitar interferências espectrais, foram monitorados comprimentos de onda mais livres de interferências causadas por elementos majoritários presentes nas principais matérias-primas utilizadas na fabricação de fertilizantes minerais⁷¹. A Tabela II resume os parâmetros instrumentais estabelecidos (após otimização ou recomendados pelo fabricante) e as condições utilizadas nas determinações por ICP OES.

Tabela II: Parâmetros instrumentais estabelecidos e condições utilizadas nas determinações por ICP OES.

Parâmetro	Valor Estabelecido
Potência de radiofrequência, W	1500, 1200*
Vazão do gás principal, L min ⁻¹	15
Vazão do gás auxiliar, L min ⁻¹	2,25
Vazão do gás de purga, L min ⁻¹	3
Pressão do gás de nebulização, kPa	180, 200*
Velocidade da bomba peristáltica, rpm	24 (aproximadamente 2,4 mLmin ⁻¹), 15*
Altura de observação, mm	10
Número de replicatas por leitura	3
Linhas de emissão monitoradas, nm	B(I) - 249,772; Mg(I) - 285,213; Mg(II) - 280,270; Mo(II) - 281,615; P(I) - 213,618; P(I) 213,547; S(I) - 181,972

*Utilizados no estudo relacionado com as extrações dos analitos.

Na escolha dos comprimentos de onda foram considerados a sensibilidade e os possíveis interferentes. O *software* fornecido pelo fabricante do equipamento auxilia nesta etapa, sugerindo mais de um comprimento de onda por elemento e os principais interferentes. Com base nestas informações, foram monitoradas as intensidades dos sinais nos comprimentos de onda apresentados na Tabela III. A seleção do comprimento de onda de trabalho foi realizada simultaneamente com a otimização das condições de extração dos analitos das amostras de fertilizantes. Foram selecionadas as linhas espectrais citadas na Tabela II.

Tabela III: Comprimentos de onda monitorados para cada elemento.

Elemento	Comprimento de Onda (nm)	Intensidade Relativa	Potenciais Interferentes
Enxofre	S(I) 181,972	323,6	Ni, Nb, As
	S(I) 180,669	304,0	Ca, Si
	S(I) 182,562	77,7	B, Cu
Fósforo	P(I) 213,618	1.550,90	Mo, Cu, Fe, Co
	P(I) 214,914	504,1	Cu, Nb
Boro	P(I) 213,547	127,5	Cr, Ni, Ti
	B (I) 249,772	9.117,9	Tl, Ni, Fe, V
	B(I) 249,678	4.500,0	Cu, Re, W
Molibdênio	Mo(II) 202,032	9.730,6	Os, Hf, Fe
	Mo(II) 281,615	10.294,4	Au, Al, Th, Hf
	Mo(II) 284,824	13.520,8	Zr, Os, Nb
	Mo(I) 379,825	16.150,8	Ga, Th, Nb

A extração dos analitos nas amostras assistida por radiação micro-ondas foi realizado em um forno Multiwave 3000 (Anton Paar), equipado com rotor para oito frascos de quartzo, com volume interno de 80 mL. Para a extração das amostras foi utilizada potência variando de 1000 a 1400 W e tempo de extração de 20 a 60 minutos, com rampa de aquecimento de 10 minutos. Uma pré-extração, com potência a 600 W, rampa e platô de aquecimento de 5 minutos foi previamente utilizada.

Para a extração das amostras em sistema aberto foi utilizada uma chapa aquecedora, com plataforma de ferro, modelo Q-313-F21, fabricada pela Quimis (potência máxima de 2000 W e temperatura máxima de aquecimento de 300 °C).

Após a extração dos analitos, em ambos os sistemas, as soluções foram manualmente filtradas através de papel filtro (quantitativo), marca Quanty, com porosidade de 25 μm .

A massa das amostras foi pesada em balança analítica modelo XS204, com precisão de 0,1 mg, fabricada pela Mettler Toledo. A balança possui calibração RBC (Rede Brasileira de Calibração), atendendo aos critérios de calibração, com erro máximo total de 0,3 mg, considerando-se a raiz quadrada da soma quadrática da tendência e da incerteza de medição.

Todos os utensílios volumétricos utilizados nos experimentos possuem calibração RBC e atendem aos critérios apresentados na Tabela IV.

Tabela IV: Erros máximos tolerados para balões volumétricos, pipetas volumétricas e micropipetas

Item Calibrado	Erro máximo tolerado (soma quadrática dos módulos da incerteza de medição com o erro instrumental)
Balão volumétrico de 50 mL	0,12 mL
Balão volumétrico de 100 mL	0,20 mL
Balão volumétrico de 200 e 250 mL	0,30 mL
Balão volumétrico de 500 mL	0,50 mL
Pipetas volumétricas de 1 mL	0,014 mL
Pipetas volumétricas de 2 e 3 mL	0,02 mL
Pipetas volumétricas de 4 a 7 mL	0,03 mL
Pipetas volumétricas de 8 a 10 mL	0,04 mL
Pipetas volumétricas de 15 a 25 mL	0,06 mL
Pipetas volumétricas de 50 mL	0,10 mL
Micropipeta a 50 μL	0,50 μL
Micropipeta a 100 μL	0,80 μL
Micropipeta a 200 μL	1,6 μL
Micropipeta a 500 μL	4,0 μL
Micropipeta a 1000 μL	8,0 μL

A extração de fósforo com citrato neutro de amônio (CNA) foi realizada em estufa de marca Marconi, modelo MA 022, com agitação mecânica, que foi mantida durante o período de extração à temperatura entre 65 e 75 $^{\circ}\text{C}$, a qual foi monitorada com o uso de termômetro calibrado RBC.

Todas as medições volumétricas foram realizadas em ambiente com temperatura controlada na faixa de 15 a 25°C, monitorada com termômetros, com calibração RBC e erro máximo tolerado de 2 °C (soma dos módulos da tendência com a incerteza).

Os frascos utilizados para o armazenamento das amostras foram previamente descontaminados com solução de HNO₃ 10% (v/v) e enxaguados com água ultrapura (resistividade de 18,18 MΩ cm).

4.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

As soluções de calibração foram preparadas a partir de diluições adequadas das seguintes soluções de referência monoelementares, todas rastreáveis ao *National Institute of Standards and Technology* - NIST: a) boro - solução de ácido bórico em água, com $1000 \pm 4 \mu\text{g mL}^{-1}$ de boro, fornecida pela Fluka Analytical; b) enxofre - solução de sulfato de amônio em água, contendo $1004 \pm 5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de enxofre, fornecida pela PlasmaCAL; c) fósforo - solução de dihidrogenofosfato de amônio em água, contendo $1001 \pm 4 \mu\text{g mL}^{-1}$ de fósforo, fornecida pela PlasmaCAL e d) molibdênio - solução de molibdênio metálico em HCl 10% (v/v), contendo $1000 \pm 4 \mu\text{g mL}^{-1}$ de molibdênio, fornecida pela Fluka Analytical.

O efeito de matriz foi avaliado através de soluções teste que foram preparadas em HNO₃ 2% (v/v), a partir de sais ou soluções estoque, conforme segue: a) K₂O $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ - a partir de KCl (sólido) com pureza de 99,0 a 100,5%, fornecido pela Spectrum Química e Diagnóstica; b) Ca $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ - a partir de solução de CaCO₃ com $1000 \pm 4 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Ca, fornecida pela Fluka; c) Mg $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ - a partir de solução de magnésio com $1001 \pm 6 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Mg, fornecida pela Fluka; d) Cu $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ - a partir de solução de cobre com $1001 \pm 4 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Cu, fornecida pela Fluka; e) Zn $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ - a partir de solução de zinco com $1001 \pm 4 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Zn, fornecida pela Fluka; f) Mn $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ - a partir de solução de manganês contendo $998 \pm 4 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Mn, fornecida pela Fluka. A solução de citrato neutro de amônio (CNA) foi preparada conforme as instruções que constam na metodologia oficial⁸ (ver ANEXO I), a partir de ácido cítrico (sólido cristalino) com pureza mínima de 99,5%, fornecido pela Vetec e NH₄OH, 28% (m/m), fornecido pela Cromato Produtos Químicos.

O HNO₃ utilizado, com pureza entre 67-69% (m/m) de HNO₃, para a digestão das amostras e acidificação das soluções foi fabricado pela Carlo Erba. Este ácido era de qualidade superpuroTM, contendo no máximo $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de boro; $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ de molibdênio; $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ de enxofre e $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$ de fósforo. O HCl utilizado foi o de grau P.A., fabricado pela Vetec Química Fina, com limite máximo de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de sulfato. Antes do uso, o HCl foi

purificado no laboratório, mediante destilação abaixo do ponto de ebulição em destilador de ácido, modelo Subpur, fabricado pela Milestone.

A água ultrapura foi obtida com a utilização de um sistema de ultrapurificação Master All, fabricado pela Gehaka. Após a purificação a resistividade máxima da água foi 18,18 MΩcm. Esta água foi utilizada no preparo de todas as amostras e soluções.

4.3 FERRAMENTAS COMPUTACIONAIS

As extrações dos analitos e os parâmetros instrumentais foram avaliados de modo multivariado, através de matrizes experimentais Doehlert. Para tal avaliação, foi utilizado o programa Doehlert 1.0, desenvolvido por Teófilo e Ferreira³⁵ no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas e gentilmente disponibilizado *online*⁷². A planilha “PDQ3var – Planejamento Doehlert Modelo Quadrático com 3 variáveis” foi empregada para a obtenção de todas as equações e superfícies de resposta.

Os testes de linearidade foram realizados com o auxílio da planilha “FOR UGQ 085 Rev01 – Planilha para verificação da linearidade” desenvolvida pelo LANAGRO-GO e gentilmente disponibilizada para este estudo. Esta ferramenta foi formulada, validada e disponibilizada para uso interno na rede LANAGRO a partir da publicação de Souza e Junqueira⁷³.

4.4 AMOSTRAS

Uma parcela das amostras analisadas era procedente do Programa de Ensaio de Proficiência em Análises de Fertilizantes e Corretivos, do MAPA. Elas foram preparadas através de mistura de matérias-primas normalmente utilizadas na fabricação de fertilizantes, tendo como objetivo confirmar a proficiência dos laboratórios da rede oficial LANAGRO. O restante das amostras foi coletado pelo MAPA em ações de fiscalização, as quais foram utilizadas neste estudo somente após o final das análises de controle oficial.

4.5 MATERIAIS DE REFERÊNCIA E AMOSTRAS INTERLABORATORIAIS

A amostra de enxofre elementar, utilizada nos ensaios de recuperação do analito, foi fornecida pela Delaware, cuja pureza era 99,5% a 100,5% de enxofre.

Além dessa amostra, para avaliar a exatidão dos métodos foram analisadas amostras dos materiais de referência NIST 694 - *Western Phosphate Rock* e NIST 695 - Trace Elements in Multi-Nutrient Fertilizer.

As amostras interlaboratoriais utilizadas no desenvolvimento das metodologias eram procedentes do Programa de Ensaio de Proficiência em Análise de Fertilizantes e Corretivos do MAPA, primeira rodada de 2015 ⁷⁴. Boro, enxofre e fósforo foram determinados na amostra 001/2015 - fertilizante mineral para aplicação em solo. O molibdênio foi determinado na amostra 004/2015 - fertilizante mineral para aplicação foliar.

4.6 PROCEDIMENTO

Após otimização dos parâmetros instrumentais, seguiu-se com a extração do analito (em forno micro-ondas ou em sistema aberto e aquecimento em chapa elétrica) e sua subsequente determinação por ICP OES. Na extração de fósforo mediante CNA + H₂O seguiu-se a metodologia oficial⁸, sendo a extração por CNA conduzida em estufa rotatória. Os procedimentos de preparo da solução extratora e a extração do fósforo são descritos no ANEXO 1.

4.6.1 Extração assistida por radiação micro-ondas

A extração em forno de micro-ondas foi conduzida conforme segue:

- a. Pesar exatamente cerca de 250 mg de amostra e transferir quantitativamente para tubo de quartzo com capacidade para 80 mL;
- b. Adicionar aproximadamente 5 mL de água e 3 mL de HNO₃ (o volume mínimo de líquido no frasco deve ser 8 mL, conforme recomendação do fabricante).
- c. Aquecer em forno de micro-ondas, com rampa de 5 minutos e permanência por 5 minutos a 600 W, seguido por rampa de 5 minutos e permanência por 20 minutos a 1200 W.
- d. Deixar esfriar até temperatura ambiente e transferir quantitativamente o extrato obtido da amostra para balão volumétrico de 200 mL, filtrando através de papel quantitativo e lavando com água. Completar o volume do balão com água.

4.6.2 Outras extrações

Outros procedimentos de extração empírica descritos na última versão do manual de métodos analíticos oficiais foram realizados⁸. Estes procedimentos constam no ANEXO 1.

4.6.3 Determinação dos analitos por ICP OES

Foram preparadas curvas analíticas com seis pontos distribuídos uniformemente, considerando-se as concentrações dos elementos (declaradas) nas amostras. Para cada analito, diluíram-se as soluções de modo que a concentração do mesmo na solução final fosse o mais próximo possível do ponto central da curva analítica e, ao menos, igual ao dobro da concentração correspondente ao menor ponto. As faixas de concentração das soluções de calibração foram: a) P, de 3 a 48 mg L⁻¹; b) S, de 3 a 48 mg L⁻¹; c) B, de 0,03 a 0,48 mg L⁻¹ e d) Mo, de 0,3 a 4,8 mg L⁻¹. As soluções de calibração foram preparadas em HNO₃ 1% (v/v).

A linearidade foi determinada conforme a abordagem de Souza e Junqueira⁷³, quanto à presença de *outliers*, normalidade, independência, cedasticidade e aos desvios de linearidade.

Os analitos foram determinados nas condições citadas na Tabela II, exceto nos estudos de otimização. A concentração do analito na solução diluída da amostra foi calculada mediante a equação de regressão linear da curva analítica.

4.6.4 Expressão dos resultados

Os resultados das medições e a incerteza foram calculados mediante a equação 7, cuja dedução será discutida adiante nos itens 5.4 e 5.5

$$\text{Analito \% (m/m)} = \quad \text{(eq. 7)}$$

$$\frac{L \times FD}{10.000 \times m} \pm k(V_{eff}) \times \sqrt{\frac{\left(\frac{u_{COV} \times FD}{10.000 \times m}\right)^2 + \left(u_{CP} \times \frac{FD}{10.000 \times m}\right)^2 + \left(u_{PC} \times \frac{CP}{10.000 \times m}\right)^2 + \sum \left(\frac{u_{Di} \times L}{10.000 \times m}\right)^2 + \sum \left(\frac{u_{ETi} \times L}{10.000 \times m}\right)^2 + \left(u_{ETB} \times -\frac{L \times FD}{10.000 m^2}\right)^2 + \left(-\frac{u_{XB} \times L \times FD}{m^2}\right)^2 + \left(-\frac{u_{RB} \times L \times FD}{m^2}\right)^2 + (u_{R\&R})^2}$$

Onde:

L é a concentração do analito na solução diluída da amostra;

FD é o fator de diluição da solução da amostra;

m é a massa de amostra;

k(V_{eff}) é o fator de abrangência;

u_{COV} é a contribuição da incerteza devida à covariação da curva analítica;

u_{CP} é a contribuição da incerteza devida ao erro total da concentração do padrão de referência utilizado na preparação da curva analítica;

PC é a diluição da solução de maior concentração da curva analítica;

u_{PC} é a contribuição da incerteza devida à diluição da solução de maior concentração da curva analítica;

CP é a concentração do analito no padrão utilizado na preparação da curva analítica;

u_{Di} é a contribuição da incerteza devida ao erro total de volume de cada vidraria utilizada na diluição da amostra.

u_{ETi} é a contribuição da incerteza devida à dilatação térmica da água dentro de cada vidraria utilizada na diluição da amostra;

u_{ETB} é a contribuição da incerteza devida ao erro total da balança;

u_{XB} é a contribuição da incerteza devida à excentricidade da balança;

u_{RB} é a contribuição da incerteza devida a resolução da balança;

u_{R&R} é a contribuição da incerteza devida à reprodutibilidade metodológica.

A incerteza calculada mediante a equação 7 foi expressa com dois algarismos significativos. O resultado analítico foi expresso conforme a precisão da incerteza calculada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na primeira etapa do trabalho foram avaliadas as condições experimentais, segundo os principais fatores envolvidos na quantificação dos analitos quanto ao preparo das amostras e parâmetros instrumentais aplicáveis. Os experimentos correspondentes foram realizados pela aplicação de matrizes experimentais, os quais são discutidos nos itens 5.1 e 5.2 a seguir. Nos itens seguintes é descrita a validação do método, incluindo o efeito de matriz, a linearidade, o LD, o LQ e a estimativa da incerteza do método segundo a abordagem *Bottom-Up*.

5.1 OTIMIZAÇÃO DAS EXTRAÇÕES DOS ANALITOS

Na otimização da extração dos analitos nas amostras foi utilizado um planejamento experimental do tipo Doehlert. Nesta etapa utilizou-se uma amostra real (de código 01/2011) proveniente do Programa de Ensaio de Proficiência em Análises de Fertilizantes e Corretivos do MAPA. As concentrações de consenso (média dos laboratórios participantes) nesta amostra são: 0,248% (m/m) em boro; 9,98% (m/m) em enxofre; 16,44% em fósforo expresso na forma de pentóxido de fósforo, extraído empiricamente por água e citrato neutro de amônio (CNA + H₂O); 0,74% (m/m) em magnésio e 0,015% (m/m) em molibdênio⁷⁵.

Na realização dos experimentos convertem-se as coordenadas apresentadas na Tabela I em valores reais. Neste procedimento, atribui-se uma dimensão do modelo espacial a um dos fatores estudados; a coordenada zero no espaço corresponderá ao valor médio da faixa experimental para este fator. Após, determina-se qual a distância entre o valor médio da faixa e o seu máximo. Esta distância será equivalente ao raio da esfera contendo o cubo-octaedro. Desta forma, a média acrescida do valor do raio será o valor mais alto da faixa e a este será atribuída à coordenada +1. De forma semelhante, ao valor mínimo da faixa será atribuída à coordenada -1. Por exemplo, para uma faixa de potência estudada que vai de 750 W até 1450 W, o nível zero do planejamento será igual a 1100 W, o nível +1 será 1450 W e o nível -1 será 750 W. O procedimento é semelhante para outras dimensões, tendo-se o cuidado que estas podem assumir valores fracionários que, na prática, não podem ser testados experimentalmente. A escolha de qual fator corresponderá a qual dimensão, e quantos valores serão testados, dependerá das características de cada experimento.

No primeiro experimento buscou-se otimizar as condições de extração do analito em forno micro-ondas. Neste caso, foi considerado que, apesar do tempo total de análise ter

importância econômica (número de amostras que poderão ser analisadas por batelada), quando a extração é feita em forno micro-ondas deve-se somar o tempo de extração com os necessários para ambientação do sistema e para resfriamento da solução no frasco. Assim, o tempo máximo de extração foi fixado em 60 minutos, optando-se por otimizar outros três fatores considerados mais relevantes.

A potência utilizada no forno de micro-ondas e as quantidades de HCl e HNO₃ foram, então, os fatores estudados. Em todos os experimentos, o volume da mistura extratora foi elevado a 8 mL mediante adição de água ultrapura, tendo-se em vista a recomendação do fabricante (copo de quartzo) utilizado. Atribui-se 3 níveis (1000, 1200 e 1400 W) à potência, pois foi considerado que somente variações extremas teriam influência. Às concentrações de HNO₃ e HCl foram arbitrariamente atribuídos 5 e 7 níveis de valores (1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mL de HNO₃ e 1,1; 1,4; 1,7; 2,0; 2,3; 2,6 e 2,9 mL de HCl), com 6 repetições do ponto central. Os experimentos foram realizados de forma aleatória. O critério de avaliação dos resultados foi a concentração do analito encontrada, em % (m/m), na forma elementar.

Para todos os elementos estudados, nenhum fator foi considerado significativo. Porém, a potência no interior dos frascos no forno de micro-ondas não se manteve constante durante todo o período de extração. Após cinco a dez minutos do início do platô, ocorria queda de potência, para manter a pressão em 80 bar. Desse modo, a potência variava dinamicamente para manter a pressão no frasco dentro desta margem de segurança. Assim, a potência pode não ser um fator significativo e a mesma foi fixada em 1200 W. Salienta-se que, enquanto uma potência mais baixa não irá influenciar significativamente no tempo ou no custo de realização da análise, uma potência mais alta pode vir a acelerar a depreciação da instrumentação, por operar próximo das condições máximas recomendadas pelo fabricante.

As quantidades de HNO₃ e HCl utilizadas no primeiro experimento foram superestimadas, não sendo evidenciada a influência das mesmas dentro da faixa testada. Desse modo, uma faixa maior de concentração foi atribuída à matriz experimental. Neste experimento, ao invés da potência, o tempo foi o terceiro fator, sendo estudado em três níveis (20, 40 e 60 minutos), estimando-se o tempo mínimo e máximo necessários para a extração. Neste segundo experimento, além da amostra de código 10/2010, identificada no item anterior, utilizou-se ainda uma amostra de enxofre elementar com aproximadamente 100% de pureza, visando-se simular a extração do enxofre na matriz de uma matéria-prima do fertilizante. Os resultados para as concentrações de sulfato, enxofre, fósforo, boro e molibdênio, deste segundo experimento, são apresentados na Tabela V.

Tabela V: Níveis e fatores avaliados na otimização das condições de extração dos analitos em forno micro-ondas e resultados obtidos.

Ensaio	Níveis e Fatores Avaliados			Concentrações Encontradas, % (m/m)				
	HNO ₃ (mL)	HCl (mL)	Tempo (min.)	SO ₄ ²⁻	S	P	B	Mo
1	4,00	2,00	40	9,44	99,35	7,17	0,2537	0,01664
2	3,00	3,73	40	9,92	100,47	7,38	0,2573	0,04274
3	3,00	2,58	60	10,35	99,31	7,33	0,2556	0,01614
4	0,00	2,00	40	9,98	3,35	7,98	0,2570	0,01514
5	1,00	0,27	40	10,78	94,46	7,06	0,2487	0,01494
6	1,00	1,42	20	10,45	63,26	7,59	0,2552	0,02260
7	3,00	0,27	40	10,11	99,42	7,20	0,2526	0,01603
8	3,00	1,42	20	10,88	102,08	7,04	0,2474	0,01762
9	1,00	3,73	40	10,99	70,92	7,23	0,2483	0,01488
10	2,00	3,15	20	10,46	101,99	7,58	0,2602	0,04355
11	1,00	2,58	60	10,70	76,54	7,08	0,2452	0,01478
12	2,00	0,85	60	10,59	101,71	7,68	0,2614	0,02045
13	2,00	2,00	40	10,31	99,01	7,30	0,2575	0,01786
14	2,00	2,00	40	10,03	99,81	7,30	0,2559	0,01988
15	2,00	2,00	40	10,06	99,11	7,35	0,2520	0,01875
16	2,00	2,00	40	10,46	98,81	8,07	0,2573	0,01681
17	2,00	2,00	40	10,47	99,94	7,89	0,2578	0,01744
18	2,00	2,00	40	10,01	100,26	7,44	0,2630	0,01720
Coefficiente de Determinação (R ²)	-	-	-	0,7357	0,9271	0,5164	0,7339	0,8595

Neste segundo experimento, alguns resultados foram significativos:

- i) Para o enxofre na forma de sulfato, na amostra 01/2011, a concentração de HNO₃ foi considerada significativa e inversamente proporcional (o efeito padronizado negativo foi 3,15). Porém, um valor de máximo foi encontrado para o tempo mínimo (20 minutos), 3 mL de HNO₃ e ausência de HCl;
- ii) Para o enxofre elementar na matéria-prima todos os fatores foram considerados significativos, sendo a concentração de HNO₃ proporcional (efeito padronizado de 122,23), a de HCl inversamente proporcional (efeito padronizado de -13,81) e o tempo de extração proporcional (efeito padronizado de 7,08);
- iii) Na extração do molibdênio, de forma similar ao enxofre elementar, todos os fatores foram considerados significativos, sendo a concentração de HNO₃ proporcional (efeito padronizado

de 6,21), a de HCl também proporcional (efeito padronizado de 14,81) e o tempo de extração inversamente proporcional (efeito padronizado de -11,61);

Quanto à extração de boro e fósforo, nenhum efeito foi considerado significativo. A Figura 2 mostra o gráfico de probabilidade normal e a superfície de resposta para a extração do enxofre elementar. Considerando-se o efeito inversamente proporcional, o volume de 0,27 mL de HCl foi fixado (o menor efetivamente avaliado, conforme a Tabela V).

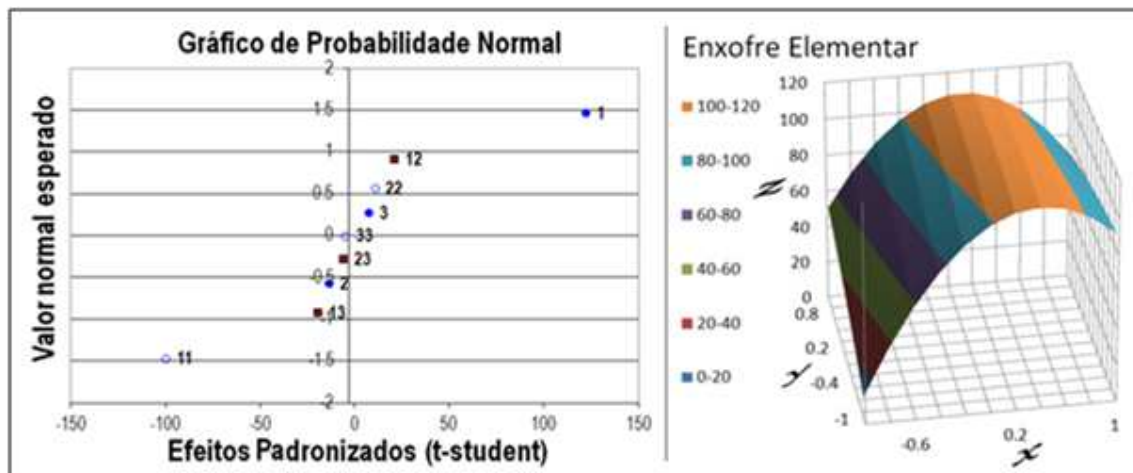


Figura 2: Influências do HNO₃ e do tempo na extração do enxofre elementar assistida por radiação micro-ondas. No eixo x da figura à direita é informado o volume de HNO₃ adicionado (em níveis), no y o tempo de extração (em níveis) e em z é a recuperação do enxofre em % (m/m).

Apesar da importância do tempo de extração na recuperação do enxofre, o gráfico de probabilidade normal e a superfície de resposta podem levar a conclusões diferentes quando analisados independentemente, demonstrando a grande vantagem do estudo multivariado. O gráfico mostra que o tempo é significativo quando menores volumes de HNO₃ são utilizados. Porém, quando este volume é fixado em 3 mL (a um raio aproximado de 0,5), a variação deste fator torna-se irrisória. Assim, tanto o tempo quanto a concentração de HCl podem ser reduzidos ao mínimo das faixas estudadas. Desta forma, para a extração do enxofre elementar pode-se fixar as condições para 3 mL de HNO₃, ausência de HCl e tempo de extração de 20 minutos. Estas condições podem ser consideradas ótimas também para a extração do boro, enxofre na forma de sulfato e fósforo no fertilizante, em função da significância dos efeitos anteriormente descritos.

Em relação ao molibdênio, apesar da aparente significância de todos os fatores, acima relatada, uma avaliação mais atenta coloca esta conclusão em dúvida. Observa-se que para os

experimentos 2 e 10 as concentrações encontradas estão muito acima das demais (cerca de 0,043 % m/m, quando comparadas com a média de 0,020 % m/m), estão também mais de 50% acima do esperado (a concentração de consenso para esta amostra é 0,028 % m/m). Além disso, não há uma forte relação entre estes dois pontos, pois os pontos 6, 8 e 9, os mais próximos conforme o modelo apresentado na Figura 1, não compreendem valores intermediários entre a média e estes extremos.

Sugerem-se aqui duas hipóteses para o fato observado:

- i. Há um valor real de máximo localizado na região espacial entre os pontos 2 e 10 do cubo-octaedro, que ocorre agudamente, pois não se reflete nos pontos próximos;
- ii. Estes dois pontos estão associados a erro experimental, ocasionado pela utilização de baixa quantidade de amostra na análise (250 mg) de uma matriz heterogênea, para um elemento presente em baixa concentração.

Desse modo, deve ser realizado um estudo especificamente para o molibdênio, uma vez que as condições adequadas de extração dos demais elementos podem não se aplicar a este elemento, ou uma massa maior de amostra deve ser usada quando da determinação do molibdênio. Este estudo não foi conduzido, devido à extração deste elemento por radiação micro-ondas ter sido preterida perante a extração em sistema aberto.

Considerando-se que a extração dos elementos investigados em fertilizante pode ser mais rápida, simples e barata quando conduzida em frasco aberto e aquecimento em chapa do que em frasco fechado e em forno de micro-ondas, a primeira foi investigada.

Neste experimento foi empregada a mesma matriz experimental Doehlert que nos experimentos anteriores, sendo também avaliados 3 fatores; o tempo em três níveis, a concentração de HNO_3 em 5 níveis e a de HCl em 7 níveis, conforme citado na Tabela VI. O volume da solução extratora foi elevado a 8 mL mediante adição com água. O tempo de extração foi contado após o início da fervura da mistura no copo béquer.

Neste terceiro experimento, ou seja, extração em copo aberto, nenhum dos fatores estudados teve influência significativa sobre enxofre e boro. No entanto, o fósforo sofreu influência do HNO_3 (efeito padronizado de -3,94). O experimento revelou que a concentração de fósforo encontrada era menor quando se adicionou mais de 1 mL de HNO_3 .

Tabela VI: Níveis e fatores avaliados na otimização das condições de extração dos analitos em sistema aberto e resultados obtidos.

Ensaio	Níveis e Fatores Avaliados			Concentrações Encontradas, % (m/m)			
	HNO ₃ (mL)	HCl (mL)	Tempo (min.)	S	P	B	Mo
1	2,00	1,00	2	10,55	7,11	0,2472	0,01608
2	1,50	2,00	2	10,676	7,20	0,2429	0,01643
3	1,50	1,33	3	10,71	7,27	0,2451	0,12020
4	0,00	1,00	2	10,41	7,42	0,2487	0,01125
5	0,50	0,00	2	11,28	7,41	0,2443	0,01053
6	0,50	0,67	1	10,69	7,23	0,2407	0,01198
7	1,50	0,00	2	10,36	7,50	0,2486	0,01285
8	1,50	0,67	1	10,48	7,27	0,2480	0,01218
9	0,50	2,00	2	11,17	7,44	0,2482	0,01546
10	1,00	1,66	1	10,83	7,32	0,2462	0,01416
11	0,50	1,33	3	10,42	7,24	0,2402	0,01363
12	1,00	0,34	3	10,63	7,13	0,2382	0,01276
13	1,00	1,00	2	10,96	7,34	0,2482	0,02472
14	1,00	1,00	2	10,74	7,30	0,2498	0,01455
15	1,00	1,00	2	10,98	7,28	0,2435	0,01295
16	1,00	1,00	2	10,35	7,37	0,2463	0,01150
17	1,00	1,00	2	11,00	7,30	0,2436	0,01208
18	1,00	1,00	2	10,94	7,24	0,2505	0,01855
Coefficiente de Determinação (R ²)	-	-	-	0,4281	0,6577	0,5535	0,7432

Os resultados obtidos para molibdênio foram similares aos encontrados nos experimentos, realizados em forno de micro-ondas. Em um primeiro momento, todos os fatores pareceram significativos, mas no ensaio 3, a concentração encontrada foi cerca de 10 vezes maior do que a média. Novamente, isto pode estar relacionado com a heterogeneidade da amostra.

Assim, considerou-se que a extração de enxofre, boro e fósforo em copo aberto é robusta segundo as condições experimentais testadas. Sendo assim, escolheu-se a metodologia de extração em copo aberto e com aquecimento em chapa elétrica, adicionando-se cerca de 1 mL de HCl, 1 mL de HNO₃ e 6 mL de água a 0,25 g de amostra, mantendo a mistura sob ebulição por 2 minutos.

Paralelamente, foram realizados testes de solubilização do enxofre elementar, em copo aberto e com aquecimento em chapa metálica, sem o uso do KOH, cuja utilização é prevista pelo método oficial⁸. Os seguintes testes foram realizados:

- i. Adição de 3 mL de HNO₃ + 3 mL de HCl a 0,25 g de amostra, cuja mistura foi mantida sob ebulição por 30 minutos.
- ii. Adição de 3 mL de HNO₃ + 3 mL de HCl a 0,25 g de amostra; após o início da ebulição foram adicionados 10 mL de H₂O₂ e o aquecimento continuado até que o tempo total de extração fosse 30 minutos;
- iii. Adição de 10 mL de NH₄OH + 10 mL de C₂H₅OH (etanol) a 0,25 g de amostra; após o início da ebulição foram adicionados 10 mL de H₂O₂ e o aquecimento continuado até que o tempo total de extração fosse 30 minutos;

Para os três testes, após a realização dos procedimentos descritos, era visível a presença de enxofre elementar insolúvel. Desta forma, os experimentos para a extração do enxofre elementar em copo aberto e aquecimento em chapa metálica foram descontinuados.

Os vários métodos oficiais empíricos de extração de nutrientes em fertilizantes não podem ser desconsiderados⁸. Segundo a legislação, considera-se que os fabricantes irão garantir a concentração de boro, fósforo e molibdênio em função dos métodos de extração oficiais⁶. Entretanto, para o enxofre é necessária a extração completa do elemento da amostra, de modo a garantir a determinação do conteúdo total do elemento, podendo-se, inclusive, utilizar método alternativo, dependendo da forma em que o nutriente está presente na formulação⁸. Quanto ao boro, fósforo e molibdênio, segundo os métodos do presente estudo, o tempo envolvido na extração assistida por micro-ondas, ou por aquecimento em chapa metálica, de um modo geral, é similar ou superior ao envolvido nos métodos oficiais. Por isto, os métodos oficiais de extração (descritos no ANEXO 1) foram utilizados para os três elementos no restante deste trabalho, excetuando-se os casos em que a determinação de boro, fósforo e molibdênio foi feita na mesma alíquota da amostra onde foi determinado também o enxofre. Nestes casos, a alíquota da amostra foi extraída em forno micro-ondas e os quatro elementos determinados na solução obtida. Para o enxofre, com utilização da radiação micro-ondas, é necessário apenas 1 h de aquecimento, um avanço significativo quando comparado com o tempo longo (4 a 6 h) envolvido na extração em sistema aberto e aquecimento convencional. Assim, o método baseado no aquecimento por micro-ondas, que foi otimizado para enxofre, foi utilizado no restante deste trabalho, sempre que aplicável para o elemento.

5.2 OTIMIZAÇÕES DE PARÂMETROS DE OPERAÇÃO DO ICP OES

A mesma configuração de matriz experimental Doehlert, apresentada na Tabela I e ilustrada na Figura 1, foi utilizada para a otimização de parâmetros de operação do ICP OES. Os ensaios foram realizados de modo aleatório e o critério de avaliação foi a maior intensidade do sinal de emissão para cada elemento nos comprimentos de onda selecionados. Utilizou-se a mesma amostra do experimento anterior, sendo a extração dos analitos realizada em forno de micro-ondas nas condições consideradas ótimas.

Em um experimento preliminar, buscou-se a otimização das vazões dos gases principal e auxiliar e da velocidade da bomba peristáltica. Neste experimento utilizaram-se condições extremas de operação que, infelizmente, ocasionaram a fusão de uma tocha e a quebra de um *bonet*, ambos de quartzo. Assim sendo, as vazões dos gases principal e auxiliar não foram mais avaliadas, sendo mantidas aquelas recomendadas pelo fabricante do instrumento de ICP OES. Foram, então, otimizadas a pressão de gás de nebulização (a pressão influencia na vazão deste gás), a potência do plasma e a velocidade da bomba peristáltica, esta influencia na quantidade de amostra introduzida no ICP. Os dois primeiros fatores, conforme a literatura⁵⁴, são os que mais influenciam na robustez do plasma. A velocidade da bomba peristáltica está relacionada com a formação e transporte do aerossol na câmara de nebulização⁷⁶ e por isto também pode ser um fator significativo.

A potência do plasma foi automaticamente selecionada através do *software* do instrumento, que permite a variação de 0,70 kW até 1,70 kW, com alteração mínima de 0,05 kW. A velocidade da bomba peristáltica também foi selecionada mediante o *software*, podendo-se variar de 5 a 50 rpm, com alteração mínima de 1 rpm (cerca de 0,1 mL min⁻¹). Já a pressão do gás de nebulização foi selecionada manualmente, através de uma válvula manual analógica com escala de 20 kPa e marcação de 0 kPa até 400 kPa.

Como a velocidade da bomba peristáltica é o fator que permite maior variação (46 possibilidades), foram atribuídos 7 níveis a esta variável. Considerando-se que uma velocidade mais alta da bomba peristáltica eleva o consumo de amostras e padrões, podendo desestabilizar o plasma e piorar a precisão, avaliou-se uma faixa intermediária (6 a 24 rpm) daquela permitida (5 a 50 rpm).

A potência do plasma é a segunda variável de maior controle (21 possibilidades) e a ela foi atribuído o termo com 5 posições (níveis) na matriz experimental. Optou-se por não aplicar ao plasma potência muito próxima do limite máximo recomendado, e assim avaliou-se a influência da potência entre 0,75 e 1,45 kW.

Por fim, devido à configuração manual, atribuiu-se à pressão do gás de nebulização 3 posições (níveis) na matriz experimental, entre 180 kPa e 220 kPa.

Além da magnitude de emissão do sinal analítico, foi avaliada ainda a razão entre as intensidades das linhas iônica Mg(II) 280,270 nm e atômica Mg(I) 285,213 nm, comumente citada como Mg(II)/Mg(I). Esta razão é sugerida para avaliar a robustez do plasma^{53,77,78}. Este conceito de robustez difere do empregado na validação metodológica, por estar relacionado exclusivamente à eficiência das condições de atomização, excitação e ionização no plasma. A razão proposta para avaliar a robustez baseia-se no princípio de que os estados iônicos são mais sensíveis às mudanças que ocorrem no plasma do que os estados atômicos. Desta forma, um maior valor da razão Mg(II)/Mg(I) corresponde a uma menor variação nas condições do plasma com a introdução de matrizes complexas.

Para a matriz fertilizante, o estudo de condições robustas é especialmente importante, devido à grande quantidade e variedade de sais presentes na sua composição⁷¹. Desta forma, um plasma mais robusto tenderá a mitigar os riscos de interferência pelos diversos componentes existentes nesta matriz.

Na Tabela VII são apresentados os níveis avaliados e os resultados obtidos. Todos os fatores estudados foram considerados significativos, a um nível de significância de 0,05. A influência relativa dos fatores foi muito semelhante para todos os elementos. Conforme esperado, a razão Mg(II)/Mg(I) e a velocidade da bomba peristáltica são inversamente proporcionais, isto é, quanto maior a velocidade da bomba peristáltica, menor é a robustez do plasma, haja vista o maior carregamento deste. O plasma é considerado robusto se a razão Mg(II)/Mg(I) ≥ 8 . Desse modo, para qualquer condição investigada o plasma não é considerado robusto. No entanto, o valor desta razão pode variar de um instrumento para outro, dependendo do tipo de nebulizador e câmara de nebulização empregados.

Tabela VII: Fatores e níveis avaliados na otimização das condições instrumentais e resultados obtidos.

Ensaio	Níveis e Fatores Avaliados			Intensidade dos Sinais				Robustez
	Potência (kW)	Velocidade da Bomba Peristáltica (rpm)	Pressão do Gás de Nebulização (kPa)	S	P	B	Mo	MgII/MgI
1	1,45	15,00	200,00	804,72	2123,78	5191,6	63,313	5,88
2	1,30	24,00	200,00	743,73	1805,67	4878,7	65,027	5,17
3	1,30	18,00	220,00	692,43	1610,33	4787,9	58,046	4,81
4	0,75	15,00	200,00	207,51	357,92	1378,8	17,292	2,34
5	0,90	6,00	200,00	312,36	535,92	1839,0	24,480	3,22
6	0,90	12,00	180,00	401,53	741,71	2393,8	33,934	3,41
7	1,30	6,00	200,00	565,85	1452,95	3762,8	48,668	5,27
8	1,30	12,00	180,00	735,17	1907,43	4575,1	63,457	5,49
9	0,90	24,00	200,00	374,45	668,91	2401,7	31,289	3,09
10	1,10	21,00	180,00	638,24	1354,54	3788,5	51,535	4,42
11	0,90	18,00	220,00	324,74	577,36	2216,7	25,322	2,73
12	1,10	9,00	220,00	447,48	909,30	3022,3	37,998	3,86
13	1,10	15,00	200,00	569,69	1144,21	3527,3	46,462	4,15
14	1,10	15,00	200,00	582,91	1156,49	3526,3	44,122	4,16
15	1,10	15,00	200,00	577,50	1148,90	3518,2	45,865	4,16
16	1,10	15,00	200,00	567,34	1153,80	3560,8	47,025	4,14
17	1,10	15,00	200,00	571,51	1144,94	3516,2	44,760	4,17
18	1,10	15,00	200,00	576,30	1144,20	3523,9	43,832	4,16
R ²	-	-	-	0,9956	0,9913	0,9915	0,9794	0,9939

Os gráficos de probabilidade normal para o enxofre (considerado representativo dos quatro elementos estudados) e para a razão Mg (II)/Mg (I) são mostrados na Figura 3.

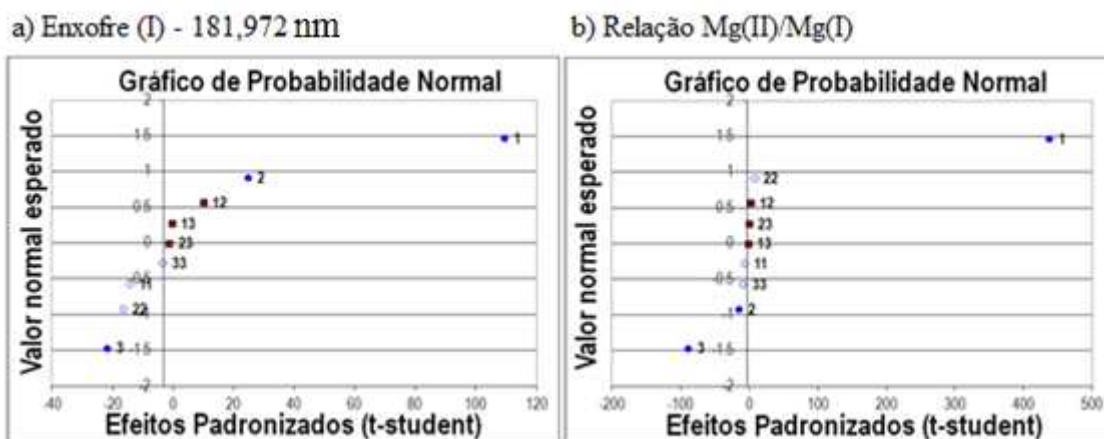


Figura 3: Gráfico de probabilidade normal para o enxofre e razão Mg(II)/Mg(I). O fator 1 é a potência do plasma, o 2 é a velocidade da bomba peristáltica e o 3 é a pressão do gás de nebulização. Os outros efeitos são contribuições de segunda ordem.

Como pode ser observada na Figura 3, a potência do plasma é o fator que mais influência, tanto na intensidade do sinal analítico quanto na robustez do plasma, sendo diretamente proporcional a estes. A pressão do gás de nebulização é inversamente proporcional à intensidade do sinal analítico e à razão Mg(II)/Mg (I), o que está de acordo com a literatura^{53, 54, 78, 79}. Por outro lado, a velocidade da bomba peristáltica aparece na Figura 3(a) como proporcional ao sinal analítico, enquanto que na Figura 3(b) o seu efeito é inversamente proporcional. A Figura 4 permite uma melhor visualização destes efeitos. O valor mais alto para potência do plasma utilizado dentro da matriz experimental (1,45 kW) foi fixado para a geração dos gráficos apresentados na Figura 4.

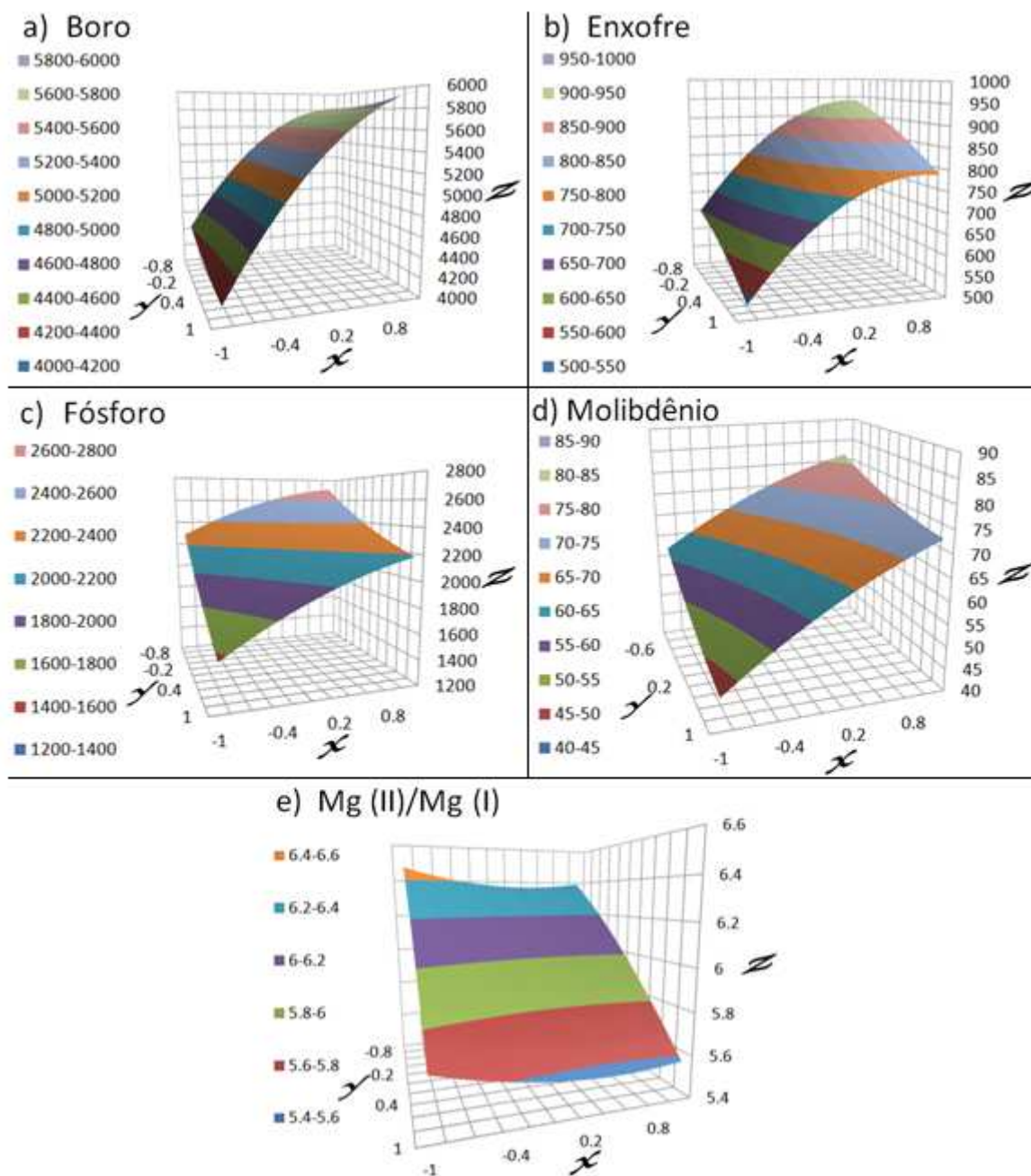


Figura 4: Superfícies de resposta para a otimização das condições instrumentais. Em todos os gráficos, x corresponde à velocidade da bomba peristáltica, y à pressão do gás de nebulização, e z à intensidade do sinal analítico, com exceção para a razão Mg(II)/Mg (I) onde z corresponde aos valores da razão determinados.

Conforme os resultados obtidos nos experimentos e as superfícies de resposta apresentadas na Figura 4, conclui-se que as melhores condições instrumentais, dentro das faixas estudadas, envolvem a maior potência de plasma e a menor pressão de gás de nebulização possíveis. Desta forma, a potência de 1,50 kW e a pressão de 180 kPa foram escolhidas.

Esta potência, acima da faixa estudada, não constitui um problema. Idealmente, este valor seria o nível mais alto no planejamento multivariado. Porém, devido às limitações de adequação das frações matemáticas do planejamento Doehlert aos níveis configuráveis no ICP OES, o valor de 1,45 kW foi utilizado como extremo da faixa. O resultado experimental que demonstra que a potência do plasma interfere proporcionalmente na intensidade do sinal analítico (Figura 4) e a posterior validação metodológica permitem a extrapolação para 1500 W.

Quanto à velocidade da bomba peristáltica, ao analisar as funções espaciais apresentadas na Figura 4 observa-se que tal velocidade afeta pouco a robustez do plasma, quando se compara seu efeito na sensibilidade. Além disso, conforme esperado, o aumento da velocidade da bomba peristáltica melhora a sensibilidade e a precisão para todos os analitos; o coeficiente de variação (CV) diminui com o aumento da velocidade da bomba peristáltica, como mostrado na Figura 5. Assim, tendo-se em vista a melhor precisão e o pequeno efeito na robustez do plasma, para os experimentos subsequentes a velocidade da bomba peristáltica foi fixada em 24 rpm, velocidade máxima avaliada no planejamento dos experimentos.

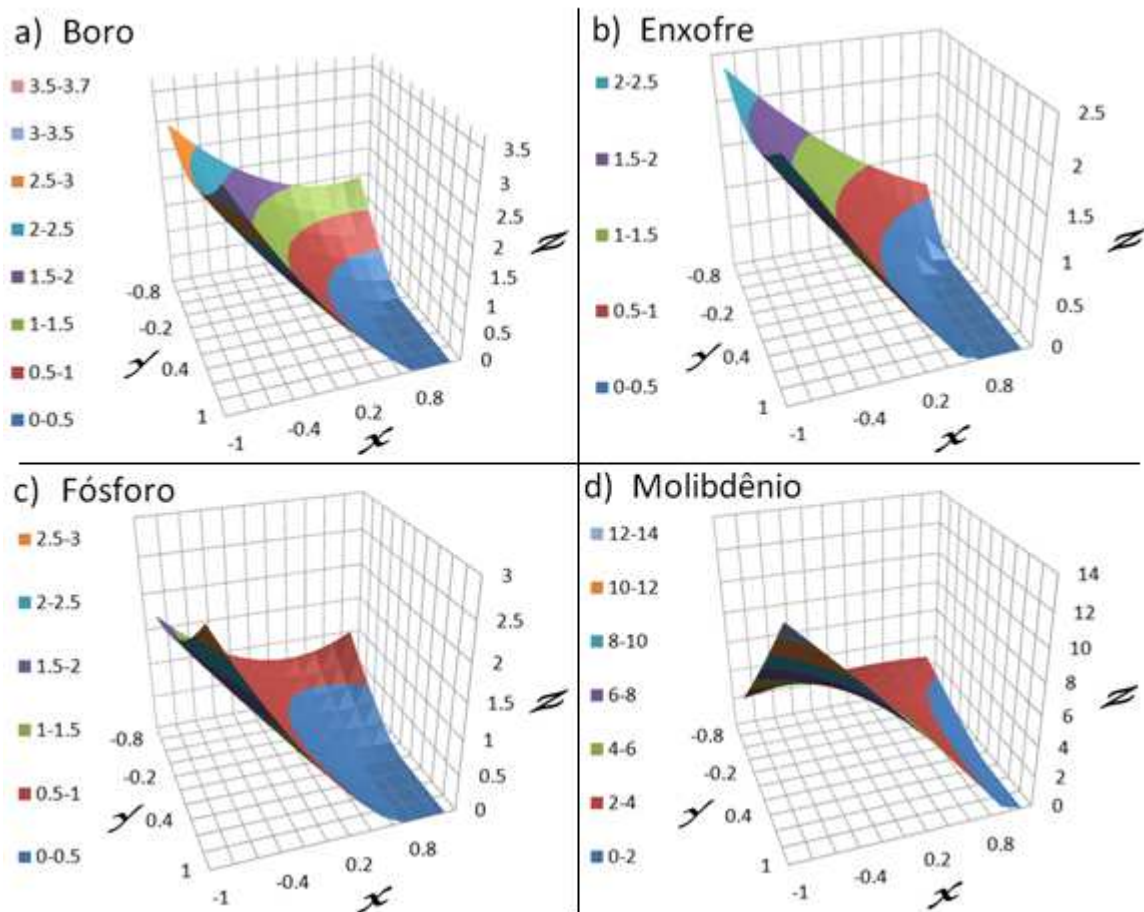


Figura 5: Superfícies de resposta para o coeficiente de variação (CV); x representa a velocidade da bomba peristáltica, y a pressão do gás de nebulização - ambos em níveis algébricos - e z a intensidade do sinal analítico.

5.3 SELETIVIDADE E EFEITO DE MATRIZ

Foram adotados dois critérios para a seleção dos comprimentos de onda monitorados: a) a maior intensidade relativa do sinal e b) ausência de interferência por elementos que normalmente estão presentes em concentrações significativas em fertilizantes (capazes de causar interferência espectral significativa, isto é, estatisticamente observável). Os potenciais elementos interferentes são listados na Tabela III.

A interferência pelo ar (absorção/emissão da radiação eletromagnética) também deve ser considerada na região do ultravioleta (abaixo de 200 nm), que aumenta o ruído e a imprecisão e diminui a sensibilidade²⁸. Para reduzir esta interferência, as regiões da pré-óptica e óptica do espectrômetro de ICP OES foram mantidas sob purga constante durante as medições. Desse modo, os sinais das linhas de emissão com comprimento de onda menor de 200 nm

aumentaram cerca de 10 vezes. Na determinação do efeito de matriz considerou-se que não há uma matriz única que represente todos os fertilizantes comerciais, mas sim diferentes formulações que variam conforme a composição desejada⁷¹. Desse modo, para avaliar o efeito de matriz, realizou-se uma análise multivariada mediante um planejamento Plackett-Burman³³, em que os principais interferentes presentes no fertilizante foram testados.

Para avaliar o efeito de matriz, foram preparadas oito soluções contendo 30 mg L⁻¹ de fósforo e enxofre, 3 mg L⁻¹ de molibdênio e 0,3 mg L⁻¹ de boro. Estas concentrações foram escolhidas por representar o centro das respectivas faixas lineares das curvas de calibração. A estas soluções foram adicionados os possíveis interferentes, obtendo-se as combinações mostradas na Tabela VIII.

Na Tabela VIII as letras maiúsculas correspondem a soluções que não contêm o potencial interferente enquanto que as minúsculas representam soluções que contém o mesmo. Assim, foram feitas adições dos analitos visando-se obter soluções com as concentrações desejadas. Estes valores de concentração foram escolhidos por serem considerados representativos dos fertilizantes comerciais, cujas soluções obtidas após extração são analisadas⁷¹. Foram consideradas as concentrações dos elementos, com exceção do potássio, para o qual se considerou sua concentração na forma de óxido, seguindo-se o que é informado no rótulo dos fertilizantes comerciais. A concentração de fósforo extraído com CNA+H₂O foi extrapolada, considerando-se uma diluição adicional de duas vezes para medição do sinal de emissão do fósforo por ICP-OES⁸.

Tabela VIII: Planejamento Plackett-Burman para avaliar o efeito de interferentes. As letras maiúsculas correspondem à ausência do interferente e as minúsculas à presença do mesmo; K₂O: 120 mg L⁻¹; Ca, Mg, Cu, Zn e Mn: 30 mg L⁻¹ e solução de CNA: 10% (m/v).

Possível Interferente	Combinações							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A ou a K ₂ O	A	A	A	A	a	a	a	A
B ou b Ca	B	B	b	b	B	B	b	b
C ou c Mg	C	c	C	c	C	c	C	c
D ou d Cu	D	D	d	d	d	d	D	D
E ou e Zn	E	e	E	e	e	E	e	E
F ou f Mn	F	f	f	F	F	f	f	F
G ou g CNA	G	g	g	G	g	G	G	g

Foram realizadas três medições independentes para cada combinação, em sequência aleatória. Para o cálculo dos fatores foi utilizada a mediana dos três resultados (por ser estatisticamente mais rigorosa para poucas medições³⁰). Os valores da mediana são apresentados na Tabela IX, os quais foram arredondados para conter o mesmo número de casas decimais dos desvios padrão calculados. Estes, por sua vez, são expressos com dois algarismos significativos.

Tabela IX: Resultados obtidos na avaliação dos interferentes, cujas combinações equivalem às concentrações apresentadas na Tabela VIII.

Elemento e Linha Espectral	Mediana das Combinações das Concentrações, mg L ⁻¹							
	1	2	3	4	5	6	7	8
B (249,772 nm)	0,3201	0,3015	0,3035	0,3567	0,3018	0,3407	0,3611	0,3005
S (181,972 nm)	32,53	29,45	29,41	32,10	29,77	32,05	32,22	29,36
P (213,618 nm)	32,4	31,0	10,5	10,9	11,4	11,2	32,4	30,0
P (214,914 nm)	32,5	31,0	14,8	17,2	15,5	17,1	32,6	30,2
P (213,547 nm)	32,49	30,87	30,16	32,27	30,53	32,14	31,97	30,18
Mo (281,615 nm)	2,863	2,996	3,090	2,893	3,104	2,810	2,834	3,066

A partir dos resultados apresentados na Tabela IX foram calculados os valores médios das quatro combinações para cada condição, ou seja, ausência e presença do interferente. A equação 8 exemplifica o cálculo para a ausência de K₂O (A).

$$A = \frac{C1 + C2 + C3 + C4}{4} \quad (\text{eq. 8})$$

Onde,

A = Resultado médio da condição A;

C1 = Combinação 1; C2 = Combinação 2; C3 = Combinação 3; C4 = Combinação 4.

Os valores médios das combinações, que foram calculados a partir dos dados constantes na Tabela IX, conforme exemplificado na equação 8, são mostrados na Tabela X. A significância dos efeitos calculados é estimada pela Equação 1. Como *n* é 8, *t* assume o valor de 2,36. Na Tabela X, a magnitude do efeito é representada pelo valor absoluto da diferença. O sinal positivo indica que há supressão do sinal do analito, enquanto que o valor negativo indica que o interferente causa aumento da intensidade do sinal do analito.

Os dados obtidos demonstram que há interferência do cobre nas medições de fósforo em 213,618 nm. Esta interferência é espectral, como pode ser visualizado na Figura 6. Por causa

disso, o fósforo foi também medido em 214,914 nm e 213,547 nm. Em 214,914 nm também foi observada interferência do cobre, mas em 213,547 nm esta interferência não foi observada. Para os demais elementos não foi observada interferência, com exceção do efeito do CNA, o que não é um problema para as determinações de boro, enxofre e molibdênio, já que o CNA é um extrator exclusivo do fósforo. Porém, o CNA pode mascarar outros interferentes.

Tabela X: Valores médios das concentrações dos analitos na ausência (letras maiúsculas) e presença (letras minúsculas) dos interferentes. O desvio padrão para cada elemento foi calculado a partir dos 8 valores da mediana, informados na Tabela IX

Parâmetro Calculado	Concentração dos Analitos, mg L ⁻¹					
	B (249,772 nm)	S (181,972 nm)	P (213,618 nm)	P (214,914 nm)	P (213,547 nm)	Mo (281,615 nm)
A	0,3204	30,87	21,2	23,9	31,45	2,961
a	0,3260	30,85	21,3	23,8	31,21	2,953
B	0,3160	30,95	21,5	24,0	31,51	2,943
b	0,3305	30,77	21,0	23,7	31,14	2,971
C	0,3216	30,99	21,7	23,8	31,29	2,973
c	0,3248	30,74	20,8	23,9	31,37	2,941
D	0,3208	30,89	31,5	31,5	31,38	2,940
d	0,3257	30,83	11,0	16,2	31,27	2,974
E	0,3162	30,84	21,0	23,6	31,24	2,957
e	0,3303	30,89	21,4	24,1	31,41	2,957
F	0,3198	30,94	21,2	23,9	31,37	2,981
f	0,3267	30,78	21,3	23,8	31,28	2,933
G	0,3446	32,23	21,7	24,8	32,22	2,850
g	0,3018	29,50	20,7	22,9	30,43	3,064
Desvio Padrão	0,0095	0,54	4,0	3,0	0,36	0,044
A – a	-0,0056	0,02	-0,1	0,0	0,24	0,007
B – b	-0,0145	0,18	0,5	0,3	0,36	-0,028
C – c	-0,0032	0,25	0,9	0,0	-0,08	0,032
D – d	-0,0049	0,06	20,4	15,4	0,10	-0,035
E – e	-0,0141	-0,05	-0,4	-0,4	-0,17	0,000
F – f	-0,0070	0,16	-0,1	0,0	0,08	0,049
G – g	0,0428	2,73	1,0	2,0	1,78	-0,214
Δcrit	0,0159	0,90	6,7	5,1	0,61	0,074

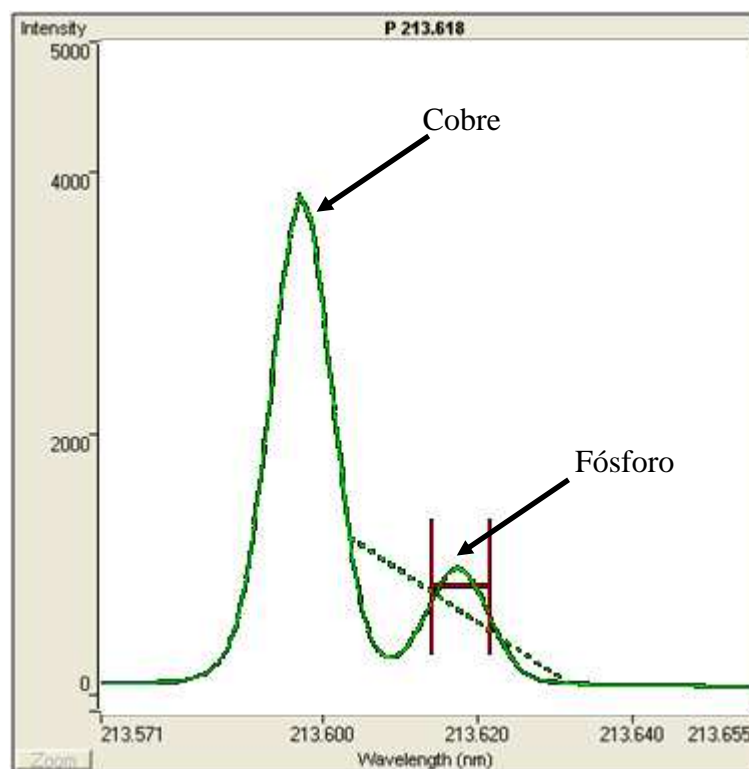


Figura 6: Sinais de emissão do cobre e do fósforo P(I) 213,618 nm. Na correção desta interferência, pode haver supercompensação, o que acarreta na supressão da intensidade do sinal do fósforo em cerca de 70%.

Assim sendo, o experimento foi repetido, nas condições originais, sem adição de CNA ($g = G$ na matriz Plackett-Burman). Verificou-se também se a interferência do cobre sobre o fósforo medido em 213,618 mascarava outros efeitos. Os resultados obtidos neste experimento são apresentados nas Tabelas XI e XII, sendo os valores arredondados para conter o mesmo número de casas decimais dos respectivos desvios padrão.

Tabela XI: Resultados obtidos na avaliação dos interferentes, cujas combinações referem-se a K_2O : 120 mg L⁻¹; Ca, Mg, Cu, Zn e Mn: 30 mg L⁻¹ e solução de CNA: 10% (m/v).

Analito	Mediana das Combinações, mg L ⁻¹							
	1	2	3	4	5	6	7	8
B (249,772 nm), sem adição de CNA (g = G)	0,320	0,289	0,283	0,357	0,283	0,341	0,361	0,297
S (181,972 nm), sem adição de CNA (g = G)	32,53	31,57	31,44	32,10	31,75	32,05	32,22	31,30
P (213,618 nm), sem adição de Cu (d = D)	32,36	30,98	30,35	32,51	30,56	32,52	32,45	30,03
P (213,618 nm), sem adição de Cu (d = D) e CNA (g = G)	32,355	32,491	32,536	32,510	32,346	32,524	32,448	32,209
P (213,547 nm), sem adição de CNA (g = G)	32,487	32,224	31,624	32,270	31,914	32,143	31,968	31,860
Mo (281,615 nm), sem adição de CNA (g = G)	2,863	2,694	2,689	2,893	2,723	2,810	2,834	2,741

Tabela XII: Valores médios das concentrações dos analitos na ausência (letras maiúsculas) e presença (letras minúsculas) dos interferentes. O desvio padrão para cada elemento foi calculado a partir dos 8 valores da mediana informados na Tabela XI. Quando não há adição de CNA, G = g e quando não há adição de Cu, D = d (ver Tabela VIII).

Parâmetro Calculado	Concentração do Analito, mg L ⁻¹					
	B (249,772 nm) sem CNA	S (181,972 nm) sem CNA	P (213,618 nm) sem Cu	P (213,618 nm) sem Cu e CNA	P (213,547 nm) sem CNA	Mo (281,615 nm) sem CNA
A	0,312	31,91	31,55	32,473	32,151	2,785
a	0,320	31,83	31,39	32,382	31,971	2,777
B	0,308	31,97	31,60	32,429	32,192	2,772
b	0,324	31,77	31,33	32,426	31,931	2,789
C	0,312	31,99	31,43	32,421	31,998	2,777
c	0,321	31,75	31,51	32,434	32,124	2,784
D	0,317	31,91	31,45	32,376	32,135	2,783
d	0,316	31,83	31,49	32,479	31,988	2,779
E	0,310	31,83	31,31	32,406	32,028	2,776
e	0,323	31,91	31,62	32,449	32,094	2,786
F	0,314	31,92	31,36	32,355	32,132	2,805
f	0,318	31,82	31,58	32,500	31,990	2,757
G	0,345	32,23	32,46	32,459	32,217	2,850
g	0,288	31,51	30,48	32,396	31,905	2,712
Desvio Padrão	0,012	0,16	0,40	0,042	0,100	0,029
A – a	-0,008	0,08	0,16	0,091	0,180	0,008
B – b	-0,016	0,21	0,27	0,003	0,261	-0,017
C – c	-0,009	0,23	-0,08	-0,012	-0,126	-0,007
D – d	0,001	0,07	-0,03	-0,103	0,147	0,004
E – e	-0,013	-0,08	-0,31	-0,042	-0,065	-0,010
F – f	-0,004	0,10	-0,21	-0,145	0,143	0,048
G – g	0,057	0,71	1,98	0,064	0,311	0,138
Δcrit.	0,020	0,26	0,67	0,070	0,167	0,049

Ao analisar os dados mostrados na Tabela XII pode-se observar que:

1) Para o boro, a diferença G-g continua sendo o único efeito significativo, sendo todos os outros efeitos cerca de três vezes menores. Isto pode ter ocorrido porque as soluções foram preparadas em datas diferentes; as soluções que não continham CNA (combinações 1, 4, 6 e 7) foram preparadas em 10/07/2015, enquanto que as demais foram preparadas na data de repetição do experimento (16/07/2015). Isto indica uma baixa estabilidade da solução analítica por um período de cerca de uma semana, ou um efeito de reprodutibilidade no preparo das soluções. Recomenda-se, assim, que a extração do analito e a respectiva determinação sejam feitas no mesmo dia.

2) Para o enxofre foi observado efeito semelhante ao boro quanto às diferentes datas de preparo das soluções. Porém, ao contrário do boro, para o qual praticamente não houve variação do delta crítico ($\Delta_{crit.}$), para o enxofre ele diminuiu de 0,90 para 0,26 mg L⁻¹. Isto corresponde a 0,8% da concentração estimada (média de 31,87 mg L⁻¹). Contudo, um fator estatisticamente significativo para soluções teste, preparadas a partir de reagentes de alta pureza, não necessariamente tem contribuição relevante para a incerteza calculada para amostras reais, conforme apresentado no item 5.7.

3) Para o fósforo ($\lambda = 213,618$ nm), quando não houve adição de cobre o $\Delta_{crit.}$ diminuiu cerca de dez vezes, mas o efeito do CNA foi significativo.

4) Quando não houve adição de cobre e CNA, três efeitos foram estatisticamente significativos para o fósforo ($\lambda = 213,618$ nm), inclusive a presença de cobre (D-d), que não teria significado real. Neste caso, o $\Delta_{crit.}$ foi muito baixo (cerca de cem vezes menor que no primeiro experimento), passando a ter uma contribuição irrisória perante os outros fatores de incerteza. A maior variação calculada, -0,145 mg L⁻¹, é desprezível frente à concentração média de fósforo, 32,427 mg L⁻¹ (-0,145 mg L⁻¹ corresponde a uma variação de 0,45%), conforme já discutido para o enxofre).

5) Para o P 213,547 nm, quando não houve adição de CNA, o $\Delta_{crit.}$ diminuiu cerca de 3,5 vezes. Neste comprimento de onda todos os interferentes influenciaram na intensidade do sinal. Porém, isto já era esperado devido a menor intensidade do sinal quando comparado com o obtido em 213,618 nm. Salienta-se novamente que isto pode não ter real importância, pois um $\Delta_{crit.}$ com valor 0,167 mg L⁻¹ representa 0,52% da concentração média de fósforo (32,061 mg L⁻¹) e é desprezível frente as outras fontes de incerteza. Desta forma, mesmo uma suposta variação de reprodutibilidade, já relatada para os outros elementos, poderia ser considerada como mero efeito da reprodutibilidade do preparo da amostra.

6) Para o molibdênio observou-se efeito similar ao observado para boro, em que somente as diferentes datas de preparo das soluções teste foram significativas.

5.4 LINEARIDADE

Para avaliar a linearidade, prepararam-se curvas analíticas para cada elemento, abrangendo seis diferentes concentrações não escalonadas, conforme apresentado na Tabela XIII.

Tabela XIII: Concentração de B, S, P e Mo nas soluções de calibração, na determinação desses elementos em fertilizantes e respectivas matérias-primas.

Elemento	Comprimento de Onda, nm	Concentração das Soluções, mgL ⁻¹
B	B(I) 249,772	0,03; 0,12; 0,21; 0,30; 0,39 e 0,48
S e P	S(I)181,972 P(I)213,618 e P(I) 213.547	3; 12; 21; 30; 39 e 48
Mo	Mo(II) 281,615	0,3; 1,2; 2,1; 3,0; 3,9 e 4,8

Foram preparadas três soluções para cada concentração citada na Tabela XIII, perfazendo um total de dezoito soluções independentes para cada elemento, que foram medidas em triplicata. Ou seja, ao total, foram efetuadas cinquenta e quatro medições para cada curva analítica. As médias calculadas para cada solução independente foram utilizadas como dados de entrada na planilha de cálculos.

Conforme proposta de Souza e Junqueira⁷³, mediante o tratamento matemático das medidas, foram obtidas curvas analíticas cujo coeficiente de determinação e equação de regressão linear são apresentados na Tabela XIV. Para todas as curvas analíticas foram obtidos resultados satisfatórios em relação à normalidade, homocedasticidade e inexistência de auto correlação dos resíduos. Além disso, após a exclusão dos *outliers* não foram observados desvios de linearidade.

Um modelo da planilha “FOR UGQ 085 Rev01” (planilha para verificação da linearidade) preenchida com os dados obtidos para o enxofre encontra-se no ANEXO 2.

Tabela XIV: Número de *outliers* e parâmetros das curvas de calibração após a retirada dos *outliers*

Analito	Número de <i>Outliers</i>	Coefficiente de Determinação (R^2)	Equação de Regressão Linear
Boro (249,772 nm)	1	0,9985	$y = 1309x + 76,468$
Enxofre (181,972 nm)	4	0,9994	$y = 5,2635x + 0,7746$
Fósforo (213,618 nm)	4	1,0000	$y = 22,309x + 5,9988$
Fósforo (213,547 nm)	1	0,9994	$y = 1,7621x + 1,5009$
Molibdênio (281,615 nm)	0	0,9997	$y = 368.51x + 22,098$

É importante observar que o número de *outliers* excluídos antes da elaboração da curva analítica final tem uma relação direta com a qualidade da regressão linear. Ou seja, um número maior de pontos considerados *outliers* implica num coeficiente de determinação mais próximo de 1, pois são eliminados justamente os pontos de pior atendimento ao modelo linear. No intuito de eliminar esta subjetividade, uma solução foi considerada *outlier* somente quando não atendia aos critérios do teste de Jackknife⁷³.

Sendo assim, não se deve fazer um julgamento subjetivo ao se comparar os parâmetros das diferentes curvas na Tabela XIV. Por exemplo, na comparação das curvas analíticas de enxofre e fósforo (213,618 nm), que diferem quanto ao número de *outliers* e coeficiente de determinação (R^2). O importante é que para a faixa linear estudada, para todos os elementos, foi eliminado um número de *outliers* dentro do máximo permitido pelo modelo, que é 4. Além disso, o R^2 foi sempre superior a 0,99, após a exclusão dos *outliers*.

5.5 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Os limites de detecção (LDs) e quantificação (LQs) teóricos foram estimados seguindo-se a abordagem clássica⁴⁴, ou seja, a partir de n leituras de brancos analíticos nas condições do método. As concentrações correspondentes foram determinadas mediante curvas de calibração com seis pontos equidistantes, conforme citado no capítulo 4. Foram considerados como brancos analíticos as soluções extratoras puras, submetidas ao mesmo tratamento dado à amostra (radiação micro-ondas em frasco fechado para o enxofre elementar, extração com CNA + H₂O para o fósforo⁸ e aquecimento em frasco aberto e em chapa metálica para boro, fósforo e molibdênio). Ao todo foram realizadas 21 determinações independentes para o branco de cada extração.

Para o cálculo dos LDs e LQs considerou-se a média das 21 determinações, quando positiva (quando foi obtido valor negativo a média não foi considerada no cálculo, somente o desvio padrão) acrescida de 3,3 e 10 vezes o desvio padrão das medidas, para os LDs e LQs, respectivamente. Os *outliers* foram eliminados de acordo com a equação de Grubbs ($\alpha = 0,05$)⁵⁵. Para estimar os LDs e LQs do método considerou-se 250 mg de massa de amostra em um volume final de 200 mL, tanto para extrações em copo aberto e aquecimento em chapa metálica, quanto para aquecimento por radiação micro-ondas em frasco fechado. Para as extrações por CNA+H₂O, foi considerado o procedimento do método oficial (1 g de amostra em 500 mL de solução). Os resultados obtidos para o LD e LQ são apresentados na Tabela XV, juntamente com as quantidades mínimas de cada nutriente que podem ser garantidas pelos fabricantes⁷¹. O desvio padrão, que avalia a precisão, é expresso com dois algarismos significativos. Todos os demais valores, para cada analito, foram ajustados para conter o mesmo número de casas decimais dos valores do desvio padrão.

Como pode ser observado na Tabela XV, para todos os analitos, o LQ teórico é menor ou igual à garantia mínima declarável. Porém, reforça-se que o valor do LQ calculado é um indicativo matemático, pois é possível a obtenção de curvas analíticas lineares em que a concentração do menor ponto é inferior ao LQ teórico⁵¹. Além disso, no caso do boro e molibdênio, a diluição pode ser inferior a 200 vezes, mantendo-se a precisão analítica em situações extremas (valores muito próximos ao mínimo garantido), ou mesmo quando a concentração real é a metade da garantia declarada (limite de fraude⁶). Assim, pode-se afirmar que todos os LQs atendem às necessidades da fiscalização.

Tabela XV: Média e desvio padrão de 21 medições do branco analítico, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) estimados para cada analito em fertilizante e garantias mínimas informadas pelos fabricantes.

Parâmetro	Analito e Meio de Extração			
	B (249,772 nm) Chapa de Aquecimento	S (181,972 nm) Radiação Micro-Ondas	P (213,618 nm) Chapa de Aquecimento	P (213,547 nm) Chapa de Aquecimento
Média	-0,096	0,144	0,024	0,35
Desvio Padrão	0,038	0,038	0,028	0,27
Solução, mg L ⁻¹	LD	0,124	0,270	1,24
	LQ	0,378	0,525	3,03
Na amostra sólida, em % (m/m)	LD	0,010	0,022	0,10
	LQ	0,030	0,042	0,24
Garantia Mínima, em % (m/m)*	0,030	0,500	**	**

Parâmetro	Analito e Meio de Extração		
	P (213,618 nm) CNA + H ₂ O	P (213,547 nm) CNA + H ₂ O	Mo (281,615 nm) Chapa de Aquecimento
Média	-0,025	0,25	0,0051
Desvio Padrão	0,019	0,21	0,0058
Solução, mg L ⁻¹	LD	0,063	0,0241
	LQ	0,190	0,0629
Na amostra sólida, em % (m/m)	LD	0,003	0,0019
	LQ	0,010	0,0050
Garantia Mínima, em % (m/m)*	**	**	0,0050

* Os valores de garantia mínima foram expressos com igual número de casas decimais que os valores dos limites calculados, para facilitar a visualização.

**Segundo a legislação brasileira não há uma garantia mínima.

Salienta-se que não há uma garantia mínima para fósforo; há apenas uma determinação para “soma NPK” (termo para designar a soma das concentrações de nitrogênio, fósforo e potássio) que deve ser, no mínimo, 15% (m/m) para qualquer fertilizante que contenha estes macronutrientes.

5.6 PRECISÃO

A precisão intermediária foi avaliada para o boro, enxofre e fósforo, através da análise de cinco amostras diferentes, em três replicatas independentes, variando-se o dia de análise,

como condição de reprodutibilidade. As soluções das amostras foram diluídas de forma que as concentrações dos nutrientes contemplassem de forma mais ampla possível a faixa de garantia considerada pelo serviço de fiscalização federal do MAPA. O mesmo procedimento foi seguido para o molibdênio, mas somente com três amostras, devido à indisponibilidade de amostras com uma faixa de concentração de molibdênio mais ampla.

Foi seguida a metodologia de extração proposta para o uso em rotina, conforme discutido no item 5.1 deste trabalho (boro e molibdênio em frasco aberto e aquecimento em chapa metálica, enxofre por aquecimento com radiação micro-ondas em frasco fechado e fósforo por extração com CNA + H₂O).

Foram calculados, a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação para cada amostra. Novamente, utilizou-se como critério de precisão o desvio padrão expresso com dois algarismos significativos. Como critério de aceitação foi utilizado o valor recomendado por Horwitz³⁹. Na Tabela XVI são apresentados os dados obtidos neste experimento.

Tabela XVI: Precisão intermediária para os nutrientes investigados. Resultados individuais, médias e desvios padrão, em % m/m, para cada analito.

Analito	Amostra	Repetição	Reprodução		Média	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação	Valor de Horwitz
			1	2				
Boro (249,772 nm)	1542F/14	A	0,0724	0,0703	0,0709	0,0019	2,6629	5,9575
		B	0,0736	0,0690				
		C	0,0711	0,0689				
	1606F/14	A	10,77	10,64	10,64	0,10	0,97	2,80
		B	10,51	10,72				
		C	10,64	10,53				
	1731F/14	A	0,0415	0,0424	0,0418	0,0011	2,7304	6,4514
		B	0,0418	0,0406				
		C	0,0407	0,0436				
	F118/13	A	1,027	1,131	1,049	0,042	3,957	3,971
		B	1,030	1,051				
		C	1,019	1,038				
	1364F/14	A	0,2319	0,2445	0,2393	0,0054	2,2596	4,9607
		B	0,2357	0,2448				
		C	0,2427	0,2361				

(Continua)

Molibdênio (281,615 nm)	F0178/13	A	2,226	2,314				
		B	2,292	2,317	2,294	0,034	1,502	3,530
		C	2,303	2,312				
	0137F/15	A	10,131	9,996				
		B	10,198	10,179	10,121	0,076	0,753	2,823
		C	10,066	10,155				
	0102F/15	A	3,080	3,049				
		B	3,055	3,098	3,073	0,023	0,748	3,378
		C	3,102	3,057				
Enxofre (181,972 nm)	162	A	13,70	13,31				
		B	13,66	13,26	13,59	0,32	2,34	2,70
		C	14,13	13,48				
	1605F/14	A	10,86	11,08				
		B	10,84	11,05	10,97	0,10	0,89	2,79
		C	10,99	10,98				
	0205F/15	A	2,057	2,127				
		B	2,128	2,165	2,114	0,038	1,800	3,574
		C	2,083	2,125				
	F0289/13	A	6,85	7,02				
		B	7,08	6,94	7,01	0,10	1,44	2,98
		C	7,13	7,06				
	1722F/14	A	5,747	5,872				
		B	5,925	5,891	5,889	0,083	1,417	3,063
		C	5,894	6,003				
Fósforo (213,618 nm)	0162F/15	A	10,76	11,20				
		B	10,88	11,28	11,05	0,25	2,25	2,79
		C	10,85	11,34				
	0172F/15	A	13,23	13,64				
		B	13,37	13,70	13,55	0,22	1,59	2,70
		C	13,55	13,80				
	1197F/14	A	5,572	5,633				
		B	5,514	5,690	5,593	0,080	1,425	3,087
		C	5,492	5,655				
	0186F/15	A	7,13	7,42				
		B	7,22	7,55	7,34	0,19	2,60	2,96
		C	7,16	7,54				
	0213F/15	A	6,43	6,87				
		B	6,57	6,64	6,65	0,15	2,26	3,01
		C	6,67	6,74				

(Continua)

Fósforo (213,547 nm)	0162F/15	A	10,69	11,02	11,05	0,22	2,03	2,79
		B	11,03	11,31				
		C	10,96	11,26				
	0172F/15	A	13,40	13,58	13,61	0,16	1,15	2,70
		B	13,70	13,71				
		C	13,45	13,79				
	1197F/14	A	5,63	5,56	5,54	0,10	1,84	3,09
		B	5,53	5,60				
		C	5,35	5,59				
	0186F/15	A	7,11	7,28	7,35	0,17	2,26	2,96
		B	7,26	7,52				
		C	7,37	7,54				
	0213F/15	A	6,49	6,68	6,60	0,09	1,36	3,01
		B	6,61	6,52				
		C	6,72	6,57				

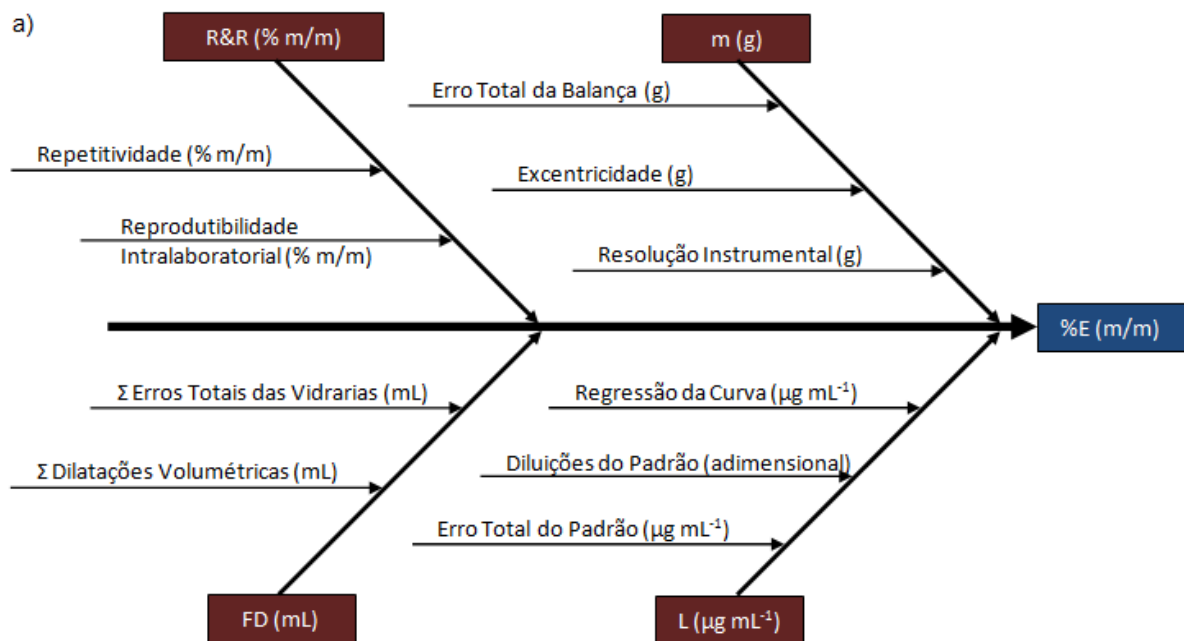
Como se pode observar na Tabela XVI, a reprodutibilidade é aceitável, pois o coeficiente de variação foi inferior ao valor de Horwitz para todas as amostras.

5.7 ESTIMATIVA DA INCERTEZA

No âmbito do presente trabalho, para uma medição instrumental qualquer, pode-se dizer que um modelo matemático genérico é o valor do sinal medido, multiplicado pelo fator de diluição e dividido pela massa de amostra. Este resultado pode ser corrigido por uma constante que converte as unidades envolvidas. Acrescenta-se ainda a contribuição da incerteza oriunda da reprodutibilidade (precisão) e a oriunda da recuperação (exatidão). Com o auxílio de um diagrama de causas e efeitos, pode-se mostrar que essas contribuições principais são ainda divididas em secundárias.

A Figura 7 ilustra o diagrama de causas e efeitos para a incerteza das medições realizadas neste trabalho, acompanhado do modelo matemático sugerido. Neste diagrama, o resultado analítico aparece no eixo central. Os vetores diretamente ligados a este são os fatores principais, que aparecem como variável no modelo matemático, ou tem uma contribuição não distinta (caso típico da precisão intermediária, por exemplo). Subfatores são apresentados em novos vetores secundários. O modelo pode apresentar uma aparência fractal, conforme novos subfatores forem descritos⁶⁶.

Na análise instrumental, tal como a realizada por técnicas espectrométricas, os principais componentes da incerteza são a repetitividade e as incertezas da curva analítica, do volume ou massa de amostra, da diluição, recuperação do analito e concentração dos padrões⁶⁵.



b) Modelo Matemático:

$$\% E = \frac{L * FD}{m * 10.000} + R\&R$$

(eq. 9)

$$L = \text{Regressão da Curva} + \frac{\text{Erro Total do Padrão}}{\text{Diluições do Padrão}}$$

$$FD = \text{Erros Totais das Vidrarias} + \text{Dilatações Volumétricas}$$

$$m = \text{Erro Total da Balança} + \text{Excentricidade} + \text{Resolução Instrumental}$$

$$R\&R = \text{Repetitividade} + \text{Reprodutibilidade Intralaboratorial}$$

Figura 7: Diagrama de causas e efeitos (a) e modelo matemático (b) sugerido para a determinação dos efeitos aleatórios para os métodos de determinação de fósforo, boro, molibdênio e enxofre em fertilizante mineral. Neste diagrama, R&R é a precisão intermediária (reprodutibilidade intralaboratorial acrescida da repetitividade), m é a massa da amostra, FD é o fator de diluição da solução analítica e L é a concentração do analito na solução medida.

Segundo o modelo matemático sugerido, a intensidade do sinal medido (L) contribui com três fontes de incerteza: a) desvios gerados por uma correlação imperfeita, existentes conforme o coeficiente de determinação R^2 se distancia do valor unitário; b) erro e incerteza herdados na preparação do padrão utilizado para obter as soluções de calibração e c) diluições realizadas para a obtenção das soluções de calibração. Este último fator é calculado de forma similar à diluição da solução da amostra.

O fator de diluição (FD) engloba as contribuições das incertezas provenientes do erro total máximo aceitável para a vidraria (que por sua vez é uma combinação do erro absoluto e da incerteza herdada) e da dilatação volumétrica do líquido dentro dos balões volumétricos ou pipetas, na faixa de temperatura controlada pelo laboratório.

Três fatores contribuem para o erro total da balança: erro de medição e incerteza de calibração, excentricidade (desvio de posição no prato da balança) e resolução (considerada como a metade do último dígito de precisão).

A precisão intermediária (incluindo as contribuições da repetitividade e da reprodutibilidade interna do laboratório) é estimada pela medição do analito na amostra em um número significativo de replicatas, variando-se determinadas condições o máximo praticável. Neste trabalho foram variados o dia da análise e a composição da amostra, considerando-se um único analista e a existência de um único instrumento de ICP OES.

5.7.1 Determinação das contribuições individuais

5.7.1.1 Curva analítica

A contribuição da curva analítica (L_1) para a incerteza foi estimada segundo a equação 10, conforme recomendado pelo Guia para a Expressão da Incerteza das Medições - GUM⁸⁰.

$$u(x_{prev}) = \sqrt{c_a^2 u^2(a) + c_b^2 u^2(b) + 2c_a c_b u(a)u(b)r(a,b)} \quad (\text{eq. 10})$$

Onde:

$u(x_{prev})$ é a incerteza prevista para a regressão;

c_a é o coeficiente angular da curva analítica;

$u(a)$ é a incerteza padrão do coeficiente angular;

c_b é o coeficiente linear da curva analítica;

$u(b)$ é a incerteza padrão do coeficiente linear;

$r(a,b)$ é o coeficiente de correlação entre a e b.

Os termos utilizados na equação 10 foram calculados mediante as equações 11 (cálculo do coeficiente de correlação linear da curva analítica), 12 (cálculo da incerteza padrão do coeficiente angular da curva analítica), 13 (cálculo da incerteza padrão do coeficiente linear da curva analítica) e 14 (cálculo do desvio padrão dos resíduos).

$$r(a,b) = -\frac{\sum x_i}{\sqrt{n \sum x_i^2}} \quad (\text{eq. 11})$$

$$u(a) = \sqrt{\frac{s^2 \sum x_i^2}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}} \quad (\text{eq. 12})$$

$$u(b) = \sqrt{n \frac{s^2}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}} \quad (\text{eq. 13})$$

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_{\text{calci}} - y_{\text{real}_i})^2}{n - 2} \quad (\text{eq. 14})$$

Nas equações 11 a 14, x_i representa as concentrações das soluções de calibração, n é o número de pontos da curva analítica, s o desvio padrão dos resíduos, y_{calci} são as intensidades esperadas para as concentrações nominais conforme a equação da regressão linear da curva analítica e y_{real} são os valores de intensidade encontrados.

Os valores utilizados para estimar a incerteza foram obtidos durante a determinação da primeira condição de reprodutibilidade para cada elemento. Com a aplicação do método na rotina, pode-se trabalhar com uma carta-controle e utilizar estes valores como um indicativo mais completo, pois contempla a deriva da calibração⁶⁴.

A contribuição da incerteza oriunda do erro da concentração do padrão (L_2) foi calculada a partir dos valores fornecidos nos certificados dos fabricantes. Neste caso, a incerteza total foi obtida somando-se a diferença entre o valor certificado e o nominal (1000 mg L^{-1}) com a incerteza informada. Para simplificar, este valor foi considerado como sendo o máximo aceito pelo laboratório, apresentando uma distribuição quadrática. Desta forma, a contribuição da incerteza para este fator foi obtida dividindo-se o erro máximo total pela raiz quadrada de 3. Na prática, o laboratório pode definir qual é o erro máximo admitido para cada padrão e fixar este valor como o erro total máximo.

A contribuição da incerteza devida ao fator de diluição dos padrões (L_3) foi obtida pelo somatório dos erros totais aceitáveis (erro expresso somado com a incerteza, ambos informados no certificado de calibração das pipetas e balões volumétricos) e da dilatação volumétrica dos líquidos medidos nos balões e pipetas utilizadas na diluição dos padrões. Esta contribuição foi propositalmente superestimada como sendo o erro máximo permitido para o ponto de maior concentração da curva analítica (este compreende o recipiente e a pipeta de maior volume e, geralmente, com tolerância maior de incerteza).

5.7.1.2 Fator de diluição

A contribuição da incerteza devida à diluição da amostra (FD) foi determinada pela soma do erro máximo total tolerado e o da dilatação volumétrica. A contribuição para o erro total tolerado é o constante na Tabela IV dividido pela raiz quadrada de 3.

Para estimar o erro devido à dilatação volumétrica (FD₂), utilizou-se a equação 15.

$$u(EV) = \frac{Vk\Delta t}{\sqrt{3}} \quad (\text{eq. 15})$$

Onde:

$u(EV)$ é a estimativa do erro da dilatação volumétrica;

V é o volume do balão volumétrico;

k é o coeficiente de dilatação volumétrica da água (foi utilizado o valor de $2,1 \times 10^{-4} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$, conforme recomendação da Rede Metrológica RS⁶⁵);

Δt é a faixa de temperatura monitorada pelo laboratório (10 °C no caso, já que o laboratório admite uma variação de 15°C a 25°C).

Nesta fórmula, utiliza-se raiz quadrada de três devido à distribuição retangular da variação admissível.

5.7.1.3 Pesagem

Na incerteza devida à pesagem da amostra foi considerado o erro total admissível para a balança utilizada, a excentricidade e a resolução da balança. O erro total admissível para a balança (m_1) é 0,3 mg, considerando-se a raiz quadrada da soma quadrática da tendência e da incerteza de medição. A resolução da balança (m_2) é 0,1 mg e metade deste valor foi considerado no cálculo, porque o erro é ocasionado por um arredondamento automático instrumental de no máximo metade da resolução. Assumiu-se que estas duas fontes (m_1 e m_2) apresentam distribuição retangular e por isto a incerteza é estimada dividindo-se os erros pela raiz quadrada de 3.

A excentricidade (m_3) foi determinada empiricamente no laboratório e considerada como a amplitude entre os valores de massa medidos em 5 pontos diferentes no prato da balança (no meio e em quatro regiões aproximadamente equidistantes). Desse modo, a excentricidade foi estimada como 0,0002 g. A distribuição estatística para estas medições é triangular e por isto o valor estimado foi dividido pela raiz quadrada de 6.

5.7.1.4 Precisão intermediária e repetitividade

A precisão intermediária acrescida da repetitividade foi estimada através da equação 16, recomendada pelo INMETRO⁵¹.

$$s_{R\&R} = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2} \quad (\text{eq. 16})$$

Onde:

$s_{R\&R}$ é o desvio padrão;

t é o número de amostras analisadas;

n o número de medidas por amostra;

j o número da amostra;

k o número da análise da amostra j ;

y_{jk} o valor do resultado k para a amostra j ;

\bar{y}_j representa a média aritmética dos resultados da análise da amostra j .

Para o cálculo desta contribuição foram utilizados os mesmos dados obtidos para a avaliação da precisão, apresentados no item 5.6. Os valores de concentração encontrados no estudo da precisão intermediária foram normalizados pelas concentrações esperadas para cada elemento e amostra (mediana de três resultados obtidos pelos métodos de referência oficiais) e analisados quanto à presença de *outliers* pelo teste de Grubbs. Para calcular a contribuição mediante a equação 16, o valor normalizado foi multiplicado pela concentração do elemento calculada (para cada determinação).

5.7.1.5 Exatidão estimada pela recuperação

A contribuição da exatidão para a incerteza do método foi estimada a partir da recuperação do analito nas condições do método desenvolvido.

Os resultados médios normalizados obtidos durante análise da precisão foram comparados com o valor absoluto da média mediante teste *t-Student*, para uma amostra, conforme a equação 17⁵⁵.

$$t = \frac{\bar{x} - \mu_0}{\frac{s}{\sqrt{n}}} \quad (\text{eq. 17})$$

Onde:

t é o valor de t calculado;

\bar{x} é a média da amostra;

μ_0 é o valor usado para comparação com a média da amostra;

s é o desvio padrão amostral;

n é o tamanho da amostra.

Os valores de t crítico foram aqueles de uma distribuição bicaudal, com 95% de confiança e $n-1$ graus de liberdade. Caso a hipótese nula seja aceita (módulo de t inferior a t crítico), a média normalizada não destoa significativamente de uma recuperação de 100% do analito. Assim, a contribuição da recuperação do analito para a incerteza é desprezada, pois se considera que é mera variação aleatória já computada na precisão. Se a hipótese nula for rejeitada (módulo de t superior a t crítico), considera-se a recuperação do analito como um fator adicional de incerteza. Ressalta-se que devido à normalização, já discutida no item 5.7.1.4, a dispersão dos valores da recuperação já é considerada no respectivo cálculo. A recuperação do analito contribui para a incerteza somente se os valores do erro absoluto (valor encontrado - valor esperado) são realmente sistemáticos. Os resultados obtidos no estudo da significância da recuperação do analito para a incerteza são mostrados na Tabela XVII.

Conforme verificado na Tabela XVII, a recuperação do analito é um fator que deve ser considerado na estimativa da incerteza na determinação de boro, fósforo e molibdênio. Desse modo, a diferença entre o valor obtido e o esperado é um fator de incerteza, cuja contribuição é acrescida ao cálculo da incerteza padrão relativa dos componentes aleatórios.

Tabela XVII: Significância da Recuperação do analito; $n = 30$ para B, S e P e 18 para Mo.

Elemento	Valor de t calculado	Valor crítico de t , para $n-1$	Hipótese Nula*
B 249,772 nm Aquecimento em Chapa	2,609	2,045	Rejeitada
S 81,972 nm Aquecimento por Micro-Ondas	1,563	2,045	Aceita
P 213,618 nm CNA + H ₂ O	9,701	2,045	Rejeitada
P213,547 nm CNA + H ₂ O	10,434	2,045	Rejeitada
Mo281,615 nm Aquecimento em Chapa	4,062	2,110	Rejeitada

* A recuperação do analito não influencia

5.7.1.6 Resumo das contribuições individuais

Na Tabela XVIII estão apresentados os coeficientes de sensibilidade calculados para cada componente relevante na estimativa da incerteza, conforme o método otimizado no presente trabalho. Na Tabela XIX estão resumidas as contribuições individuais calculadas para cada analito, para um desvio padrão de uma curva normal.

Tabela XVIII: Fatores de contribuição da incerteza e coeficientes de sensibilidade. L é a concentração do analito na solução diluída da amostra; FD é o fator de diluição da solução da amostra; m é a massa de amostra; PC é a diluição da solução de maior concentração na curva analítica; CP é a concentração do analito nesta solução de calibração.

Componente da Incerteza		Coeficiente de Sensibilidade
Leitura Instrumental (L)	L_1 – Regressão da Curva Analítica	$\frac{FD}{10.000 \times m}$
	L_2 – Erro Total do Padrão	$\frac{\frac{FD}{PC}}{10.000 \times m}$
	L_3 – Diluição do Padrão	$\frac{-\frac{CP}{PC^2} \times FD}{10.000 \times m}$
Fator de Diluição (FD)	FD – Erro Máximo Tolerado (Incluindo Dilatação Volumétrica de cada vidraria)	$\frac{L}{10.000 \times m}$
Massa de Amostra (m)	m_1 – Erro Total da Balança	$-\frac{L \times FD}{10.000m^2}$
	m_2 – Resolução da Balança	
	m_3 – Excentricidade	
R&R - Precisão intermediária		1
\overline{REC} – Recuperação Média		O valor da recuperação é adicionado somente no final

Tabela XIX: Contribuições de cada componente na determinação de boro, enxofre, fósforo e molibdênio em fertilizante e enxofre elementar em matéria-prima, por ICP OES.

Componente da Incerteza		B 249,772 nm Chapa de Aquecimento	S 181,972 nm Radiação Micro- ondas	P 213,618nm CNA + H ₂ O	P 213,547 nm CNA + H ₂ O	Mo 281,615 nm Chapa de Aquecimento	Graus de Liberdade
Concentração da amostra,% (m/m)		0,232	5,87	7,13	7,11	3,08	-----
Leitura Instrumental (L), mg L ⁻¹	L ₁ – Regressão Linear da Curva Analítica	0,0061	0,2667	0,3487	0,6077	0,0210	16
	L ₂ - Erro Total do Padrão	0,00111	0,2494	0,1386		0,01109	∞
	L ₃ - Diluição dos Padrões	31,5352	0,2090	0,2014		2,9698	∞
Fator de Diluição (FD), mL	FD- Erro Máximo Tolerado	204,3333	3,1749	17,3181		258,4839	∞
Massa (m), g	m ₁ - Erro Total da Balança	0,0003					∞
	m ₂ - Resolução da Balança	0,00005					∞
	m ₃ - Excentricidade	0,0002					7
R&R - Precisão intermediária, % (m/m)		0,0279	0,017	0,0216	0,0184	0,0313	25 *
REC – Recuperação Média, % de recuperação		102,35	100	103,84	103,58	102,89	29 **

* 15 graus de liberdade para molibdênio.

** 17 graus de liberdade para molibdênio.

5.7.2 Determinação das incertezas combinada e expandida

As incertezas combinada e expandida são apresentadas na Tabela XX, as quais foram obtidas a partir dos dados utilizados para calcular as contribuições de cada componente (apresentados na Tabelas XIX), os coeficientes de sensibilidades (Tabela XVIII) e a equação 4.

Tabela XX: Incertezas combinada e expandida na determinação de boro, enxofre, fósforo e molibdênio em fertilizantes minerais, por ICP OES.

Componentes da Incerteza		B 249,772 nm Chapa de Aquecimento	S 181,972 nm Radiação Micro-ondas	P 213,618 nm CNA + H ₂ O	P 213,547 nm CNA + H ₂ O	Mo 281,615 nm Chapa de Aquecimento
Leitura Instrumental (L)	L ₁ - Regressão Linear da Curva Analítica	0,0030	0,05320	0,08683	0,15132	0,01727
	L ₂ - Erro Total do Padrão	0,0000	0,00239	0,00166	0,00166	0,00000
	L ₃ - Diluição dos Padrões	-0,0018	-0,04802	-0,05777	-0,05777	-0,00028
Fator de Diluição (FD)	FD - Erro Máximo Tolerado	0,0019	0,01864	0,12341	0,12309	0,01910
Massa (m)	m ₁ - Erro Total da Balança	0,0000	-0,00406	-0,00123	-0,00123	-0,00021
	m ₂ - Resolução da Balança	0,0000	-0,00068	-0,00020	-0,00020	-0,00004
	m ₃ - Excentricidade	0,0000	-0,00191	-0,00058	-0,00058	-0,00010
R&R - Precisão intermediária		0,0065	0,09834	0,15363	0,13076	0,09635
Incerteza Combinada		0,00759	0,1232	0,22297	0,24184	0,09974
Graus Efetivos de Liberdade		44	55	95	76	17
Fator k		2,06	2,05	2,03	2,03	2,16
Incerteza Expandida, % (m/m)		0,016	0,25	0,45	0,49	0,22
Concentração da Amostra, % (m/m)		0,232	5,87	7,13	7,11	3,08
Incerteza Padrão Relativa dos Componentes Aleatórios, %		6,7	4,3	6,3	6,9	7,0
Incerteza Padrão Relativa da Recuperação, %		2,4	0	3,8	3,6	2,9
Incerteza Padrão Relativa Total, %		7,1	4,3	7,4	7,8	7,6

5.7.3 Contribuições relativas para a incerteza

Mediante a equação 5 foram calculadas as contribuições relativas para a incerteza, as quais são ilustradas na Figura 8. Foi realizado um primeiro cálculo, para se obter os percentuais relativos da contribuição total dos efeitos aleatórios e dos efeitos sistemáticos.

Após, todos os efeitos aleatórios descritos individualmente na Tabela XX tiveram seus percentuais relativos multiplicados pelo percentual total destes efeitos. Este artifício matemático converge com a soma dos efeitos totais em 100%, relativizando cada contribuição aleatória original dentro do percentual máximo de efeitos randômicos. Como se pode observar nessa figura, os principais fatores de incerteza são a regressão linear da curva analítica, a diluição das soluções padrão, o fator de diluição da solução da amostra, a precisão intermediária (R&R) e a recuperação do analito. Conforme mostrado na Tabela XX, os valores da incerteza padrão relativa total variam de 4,3 a 7,8% do valor da medição, dependendo do analito. Estes valores são mais um ponto de partida para o aprimoramento da qualidade dos métodos do que percentuais rígidos e definitivos⁶¹.

Na Figura 8 é importante observar as contribuições da precisão intermediária e da recuperação do analito para a incerteza. Os valores para estes dois fatores podem estar superestimados e também podem ser diminuídos após a implantação dos métodos na rotina. Recomenda-se que, após a implantação dos métodos propostos, seja utilizada uma carta controle de recuperação do analito em uma amostra controle conhecida. O histórico da carta não somente possibilitará um acompanhamento mais próximo das condições do laboratório, mas permitirá também observar a evolução desses parâmetros ao longo do tempo, o que não é possível com um número limitado de amostras, como é o caso do presente trabalho.

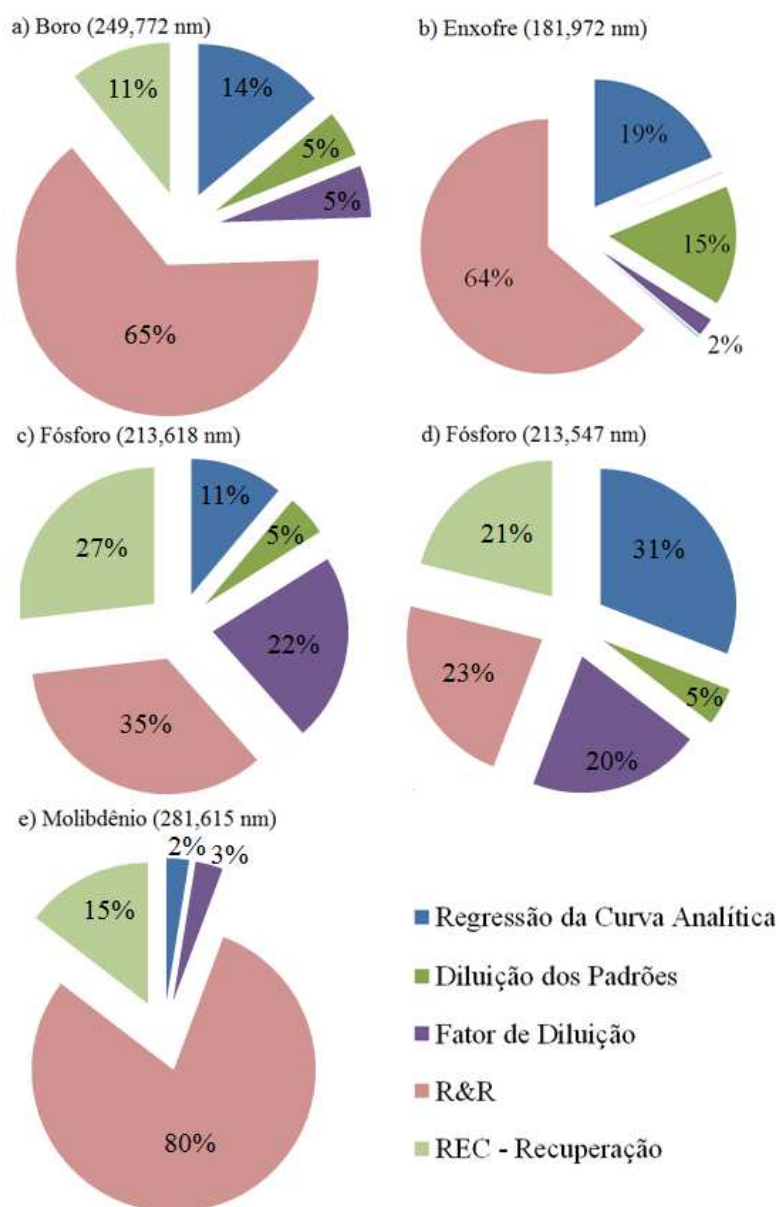


Figura 8: Principais componentes da incerteza nas determinações de boro, enxofre, fósforo e molibdênio. Os percentuais das incertezas cujas contribuições são menores que 1% não são apresentados.

5.8 EXPERIMENTOS ADICIONAIS PARA AVALIAR A EXATIDÃO

Além dos experimentos citados e discutidos no item 5.7.1.5, foram analisados materiais de referência certificados e amostras de programas interlaboratoriais. Os analitos nas amostras dos materiais de referência foram extraídos em forno micro-ondas, pois suas garantias não são para extrações empíricas, como é o caso das amostras de programas interlaboratoriais. Esses

materiais foram analisados em triplicata, sendo utilizado o valor da mediana das concentrações para efeitos de comparação.

Na análise das amostras de programas interlaboratoriais as metodologias de extração recomendadas foram seguidas⁸, com exceção do enxofre que foi extraído com o auxílio de radiação micro-ondas, conforme o método desenvolvido no presente trabalho.

Nos relatórios dos programas interlaboratoriais não são informadas as incertezas e devido ao número relativamente baixo de participantes, utilizou-se o valor do escore Z por variância interquartílica⁷⁴. Estas amostras foram analisadas em duas vias, cujas concentrações encontradas foram computadas no cálculo da soma padronizada das replicatas (sp) (equação 18) e escore Z (equação 19). Um valor de escore Z, em módulo, inferior a 2 significa um desempenho satisfatório, entre 2 e 3 um desempenho “questionável” e acima de 3 um desempenho “insatisfatório”.

$$Sp = \frac{(A + B)}{\sqrt{2}} \quad (\text{eq. 18})$$

Onde:

Sp é a soma padronizada das replicatas;

A é a concentração correspondente à replicata A;

B é a concentração correspondente à replicata B.

$$Z = \frac{Sp - \text{mediana}(Sp)}{IQN} \quad (\text{eq. 19})$$

Onde:

Z é o valor de escore Z;

mediana (Sp) é a mediana dos valores de *Sp* obtidos pelos laboratórios participantes;

IQN é a amplitude interquartílica normalizada.

Conforme o relatório do provedor (responsável pelo programa interlaboratorial): “A amplitude interquartílica normalizada foi utilizada no lugar do desvio padrão, sendo obtida pela subtração entre o valor do 3º quartil do conjunto de dados e o valor do 1º quartil, multiplicada por 0,7413. O fator 0,7413 vem da distribuição normal padrão. Multiplicar a amplitude interquartílica por este fator torna-o comparável ao desvio padrão”⁷⁴.

Os resultados obtidos na análise dos materiais de referência e amostras de programas interlaboratoriais são mostrados nas Tabelas XXI e XXII. Como se pode observar, os resultados obtidos são satisfatórios.

Tabela XXI: Resultados da análise dos materiais de referência.

Amostra	Analito	Encontrado, % (m/m)	Incerteza, %	Certificado	Recuperação, %	Avaliação
NIST 694	P 213,618 nm	13,74	7,5	13,19	104	Satisfatório
	P 213,547 nm	13,49	8,1		102	
NIST 695	P 213,618 nm	7,27	8,1	7,20	100	
	P 213,547 nm	7,37	10,1		102	
	B 249,772 nm	0,11	8,7	0,11	100	

Tabela XXII: Resultado da análise das amostras de estudos interlaboratoriais

Amostra	Analito	Concentração % (m/m)	Sp*	Mediana*	IQN*	Escore Z*	Avaliação
001/2015	B 249,772 nm	0,186	0,266	0,276	0,018	-0,53	Satisfatório
		0,191					
	S 181,972 nm	2,17	2,997	2,857	0,071	1,97	
		2,07					
P213,618 nm	10,20	14,462	14,305	0,254	0,62		
	10,25						
P 213,547 nm	10,35	14,644			1,34		
	10,36						
004/2015	Mo 281,615 nm	3,05	4,318	4,221	0,283	0,34	
		3,06					

* Valores estimados para os participantes do programa interlaboratorial

Para avaliar a exatidão do método desenvolvido para determinação de enxofre, foram adicionados aproximadamente 100 mg de enxofre elementar a 150 mg de uma amostra (em triplicata) de programas interlaboratoriais. Conforme já citado, a extração do enxofre foi assistida por radiação micro-ondas e as amostras analisadas em três vias. Os resultados obtidos para enxofre são mostrados nas Tabelas XXIII e XXIV. Como se pode observar nestas tabelas, a recuperação do enxofre foi satisfatória; a incerteza estimada foi 4,2%.

Tabela XXIII: Concentração de enxofre encontrada nas amostras analisadas.

Amostra	Replicata	S, % (m/m)	Média, % S (m/m)	Valor Esperado
162F/15	A	2,06	2,09	2,09
	B	2,13		
	C	2,08		
Comercial	A	98,29	98,41	99,5% a 100,5%
	B	98,06		
	C	98,88		

Tabela XXIV: Recuperação do enxofre elementar adicionado a uma amostra comercial (identificada como 162/F) antes da sua extração assistida por radiação micro-ondas em frasco fechado.

Replicata	Massa de Enxofre na Amostra, g	Massa de Enxofre Adicionada, g	Massa de Enxofre Esperada, g	Massa de Enxofre Encontrada, g	Recuperação, %
A	0,0031	0,1021	0,1052	0,1065	101,2%
B	0,0032	0,0954	0,0986	0,1011	102,5%
C	0,0032	0,1032	0,1064	0,1088	102,3%

Tendo-se em vista os resultados obtidos na análise dos materiais de referência certificados, amostra de programas interlaboratoriais e teste de recuperação do enxofre, os métodos desenvolvidos atendem à exatidão requerida.

6 CONCLUSÕES

Foram otimizadas condições para extração de boro, fósforo, enxofre e molibdênio em fertilizante em sistema fechado e aquecimento por radiação micro-ondas (250 mg de amostra adicionadas de 3 mL de HNO₃ e 5 mL de H₂O, com aquecimento por 20 minutos sob potência de 1200 W). No entanto, com exceção de amostras que contenham enxofre elementar, recomenda-se a simples extração em frasco aberto e aquecimento em chapa metálica (10 mL de HCl adicionados a 1 g de amostra de fertilizante em copo béquer, com aquecimento sob ebulição até próximo à secura), devido a melhor relação custo-benefício.

Entre as condições estudadas, o enxofre elementar é somente extraído completamente se a extração for conduzida em frasco fechado e em forno micro-ondas. Se a extração for conduzida em copo aberto e com aquecimento em chapa metálica não há completa solubilização do enxofre, comprometendo a exatidão.

De maneira geral, o CNA exerce efeito de matriz significativo para todos os analitos e caso ele esteja presente na solução da amostra, as soluções de calibração devem ser preparadas na presença deste extrator. Poder-se-ia avaliar qual a concentração mínima em que o efeito começa a aparecer. Porém, em condições de rotina, esta informação não seria relevante. Assim, é mais adequado adicionar CNA em todas as soluções de calibração, de acordo com a concentração de CNA na solução da amostra. Obviamente, quando as amostras são extraídas somente com água, sem a utilização do CNA, tal adição não é necessária.

O cobre interfere espectralmente no P 213,618 nm, mas não interfere no P 213,547 nm. Porém, a intensidade do sinal desta linha espectral é menor, aumentando a incerteza. Recomenda-se monitorar mais de uma linha espectral de fósforo na determinação do elemento, verificando-se visualmente os picos de intensidade e comparando-se as intensidades dos sinais. Caso haja o aparecimento de uma banda centralizada em torno de 213,598 nm, deve-se ignorar o valor da medida a 213,618 nm e considerar somente aquela em 213,547 nm. O potássio, cálcio, magnésio, zinco e manganês não exercem efeito de matriz significativo e o cobre não interfere na determinação de boro, enxofre e molibdênio.

Os estudos demonstraram que existe linearidade entre o sinal de emissão e a concentração avaliada, para fósforo e enxofre entre 3 e 48 mg L⁻¹, para boro entre 0,03 e 0,48 mg L⁻¹ e para o molibdênio entre 0,3 e 4,8 mg L⁻¹.

Foram estimados os limites de quantificação teóricos que seguem; enxofre (extraído mediante aquecimento por radiação micro-ondas em frasco fechado): 0,042% (m/m); boro

(extração em copo aberto em chapa de aquecimento): 0,030% (m/m); fósforo (extração em CNA + H₂O): 0,010% (m/m) para P 213,618 nm e 0,118% (m/m) para P 213,547 nm e molibdênio (extração em frasco aberto e em chapa de aquecimento): 0,0050% (m/m). Todos estes fatores satisfazem a necessidade da fiscalização brasileira.

Através da metodologia *Bottom-Up* foram estimados seguintes valores de incerteza relativa: 7,1% para o boro; 4,3% para o enxofre; 7,4% para o fósforo determinado em 213,618 nm; 7,8% para o fósforo determinado em 213,547 nm e 7,6% para o molibdênio. A precisão intermediária, a recuperação do analito, a regressão linear da curva analítica e a incerteza herdada do volume medido/liberado pelos aparelhos volumétricos utilizados (vidraria e micropipetas) foram os fatores com maior contribuição para a incerteza.

Na análise de materiais de referência e amostras interlaboratoriais, segundo as metodologias desenvolvidas, foram obtidos resultados com precisão e exatidão satisfatórias.

Assim, os métodos desenvolvidos podem ser utilizados oficialmente nos ensaios de fiscalização do MAPA, com a vantagem de poderem ser realizados em um período curto de tempo, em comparação aos métodos clássicos atualmente empregados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada – ESALQ/USP. PIB do Agronegócio e PIB Total – Brasil. Disponível em <http://cepea.esalq.usp.br/pib/>. Acesso em 08 de dez. de 2015
2. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC). *Balança Comercial Brasileira: Dados Consolidados 2014*. MDIC: Brasília, 2015.
3. Associação Nacional para Difusão de Adubos – ANDA. *Principais Indicadores do Setor de Fertilizantes*. Disponível em <http://anda.org.br/index.php?mpg=03.00.00&ver=por>. Acesso em 22 de fev. de 2015. Acesso em 22 de fev. de 2015.
4. Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura. *World fertilizer trends and Outlook to 2018*. FAO: Roma, 2015.
5. International Fertilizer Industry Association (IFA). *Fertilizer Outlook 2014-2018*. 82nd IFA Annual Conference Sydney (Australia), 26-28 May 2014.
6. Brasil. DECRETO N° 4.954, DE 14 DE JANEIRO DE 2004. *Aprova o Regulamento da Lei nº 6.894, de 16 de dezembro de 1980, que dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes ou biofertilizantes destinados à agricultura, e dá outras providências*.
7. Brasil. LEI N ° 6.894, DE 16 DE DEZEMBRO DE 1980. *Dispõe sobre a inspeção e a fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes, estimulantes ou biofertilizantes, remineralizadores e substratos para plantas, destinados à agricultura, e dá outras providências*.
8. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Manual de métodos analíticos oficiais para fertilizantes minerais, orgânicos, organominerais e corretivos*. MAPA: Brasília, 2014.
9. Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura. *FAO Fertilizer and Plant Nutrition Bulletin 19: Guide to Laboratory Establishment for Plant Nutrient Analysis*. FAO: Roma, 2008.
10. Comunidade Econômica Europeia. *Regulamento nº 2003/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho de 13 de Outubro de 2003 relativo aos adubos*.
11. Food and Agricultural Materials Inspection Center. *Testing Methods for Fertilizers (2014)*. Disponível em

<<https://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/TestingMethodsForFertilizers2014.pdf>>. Acesso em 08 de dezembro de 2015.

12. AOAC International. Official Method 2006.03 - *Arsenic, Cadmium, Cobalt, Chromium, Lead, Molybdenum, Nickel, and Selenium in Fertilizers*. AOAC, 2009.

13. AOAC International. *Official Methods of Analysis: Method Search*. Pesquisa realizada em base de dados disponível em <<http://www.eoma.aoac.org/methods/>> utilizando a palavra chave “fertilizer”. Acesso em 22 de fev. de 2015.

14. Wen, G.; Schoenau, J. J.; Yamamoto, T.; Inoue, M.; *Soil Sci.*, 2001, 9, 607.

15. Germida, J. J.; Janzen, H. H.; *Fert. Res.*, 1993, 1, 101.

16. Welch, R. M.; Shuman, L.; *Crit. Rev. Plant. Sci.* 1995,14, 49.

17. AOAC International. Official Method 982.01 – *Boron (Acid- and Water-Soluble) in Fertilizers: Spectrophotometric Method*. AOAC, 2006.

18. AOAC International. Official Method 980.02 – *Sulfur in Fertilizers: Gravimetric Method*. AOAC, 1985.

19. AOAC International. Official Method 962.02 – *Phosphorus (Total) in Fertilizers: Gravimetric Quinolinum Molybdophosphate Method*. AOAC, 1965.

20. ABNT NBR 9415:1986, *Fertilizantes – Determinação de molibdênio pelo método colorimétrico do tiocianato de sódio*. ABNT, 1986.

21. ABNT. *ABNT Catálogo*. Pesquisa realizada em 01/03/2015, na base de dados www.abntcatalogo.com.br utilizando a palavra chave “fertilizante”.

22. Matilainen, R.; Tummavuori, J.; *J. AOAC Int.*, 1995, 3, 598.

23. Yang, W.M.; Boles, R.L.; Mawhinney, T.P.; *J. AOAC Int.* 2002, 6, 1241.

24. Matilainen, R.; Tummavuori, J. *J. AOAC Int.*, 1996, 5, 1026.

25. Bartos, J. M.; Boggs, B.L.; Falls, J. H.; Siegel, S.A.; *J. AOAC Int.*, 2014, 3, 687.

26. Santelli, R. E.; Oliveira, E. P.; Carvalho, M. F. B.; Bezerra, M. A.; Freire, A. S.; *Spectrochim. Acta, Part B*, 2008, 63, 800.

27. Pereira, J. S. F.; Mello, P. A.; Moraes, D. P.; Duarte, F. A.; Dressler, V. L. Knapp, G; Flores, E. M. M.; *Spectrochim. Acta, Part B*, 2009, 64, 554.

28. Wu, P.; Wu, X.; Hou, X.; Young, C. G.; Jones, B. T.; *Appl. Spectrosc. Rev.*, 2009, 44, 507.

29. Souza, S. O.; Costa, S. S. L.; Santos, D. M.; Pinto, J. S.; Garcia, C. A. B.; Alves, J. P. H.; Araújo, R. G. O.; *Spectrochim. Acta, Part B*, 2014, 96, 1.

30. Ellison, S. L. R.; Barwick, V. J.; Farrant, T. J. D.; *Practical Statistics for the Analytical Scientist*; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2009.

31. Leardi, R.; *Anal. Chim. Acta*, 2009, 652, 161.
32. Morgan, E.; Burton, K. W.; Church, P. A.; *Chemometr. Intell. Lab.*, 1989, 5, 283.
33. Neto, B. B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E.; *Como Fazer Experimentos*, Bookman: Porto Alegre, 2010.
34. Lundstedt, T.; Seifert, E.; Abramo, L.; Thelin, B.; Nyström, Å.; Pettersen, J.; Bergman, R.; *Chemometr. Intell. Lab.*, 1998, 42, 3.
35. Teófilo, R. F.; Ferreira, M. M.; *Quim. Nova*, 2006, 2, 338.
36. Youden, W.J.; *Mater. Res. Stand*, 1961, 159.
37. Araujo, P. W.; Brereton, R. G.; *Trends Anal. Chem.*, 1996, 15, 26.
38. Youden, W. J.; *Ind. Eng. Chem.*, 1959, 10, 79A.
39. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Coordenação-Geral de Apoio Laboratorial: Divisão de Ensaio Químicos – DEQ/CGAL. *Manual de validação, verificação/confirmação de desempenho, estimativa da incerteza de medição e controle de qualidade intralaboratorial*. Brasília, 2014.
40. Ferreira, S. L.C.; Santos, W. N. L.; Quintella, C. M.; Neto, B. B.; Bosque-Sendra, J. M.; *Talanta*, 2004, 63, 1061.
41. Cataldi, T. R. I.; Orlando, D.; Nardiello, D. Rubino, A.; Bianco, G.; Abate, S.; Ciriello, R.; Guerrieri, A. *Anal. Chim. Acta*, 2007, 597, 129.
42. Ebrahimi-Najafabadi, H.; Leardi, R.; Jalali-Heravi, M.; *J. AOAC Int.*, 2014, 1, 12.
43. Santos, D. C. M. B.; Carvalho, L. S. B.; Lima, D. C.; Leão, D. J.; Teixeira, L. S. G.; Korn, M. G. A.; *J. Food Comp. Anal.*, 2014, 34, 75.
44. Ferreira, S. L. C.; Korn, M. G. A.; Ferreira, H. S.; Silva, E. G. P.; Araújo, R. G. O.; Souza, A. S.; Macedo, S. M.; Lima, D. C.; Jesus, R. M.; Amorim, F. A. C.; Bosque-Sendra, J. M. B.; *Appl. Spectrosc. Rev.*, 2007, 5, 471.
45. Depoi, F. S.; Bentlin, F. R. S.; Ferrão, M. F.; Pozebon, D.; *Anal. Methods*, 2012, 4, 2809.
46. Costa, S. S. L.; Pereira, A. C. L.; Passos, E. A.; Alves, J. P. H.; Garcia, C. A. B.; Araujo, R. G. O. *Talanta*, 2013, 108, 157.
47. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; *Instrução Normativa nº 57*, de 11 de dezembro de 2013.
48. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução-RE nº 899*, de 29 de maio de 2003.
49. ABNT NBR ISSO/IEC 17025:2005, *Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração*.
50. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia; Versão brasileira da publicação number 1 – *OECD Principles on Good Laboratory Practice* (revised in 1997). Paris, 1998.

51. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia; *DOQ-CGCRE-008: Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos*. Brasil, 2010.
52. *Vocabulário Internacional de Metrologia: Conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM 2012)*; INMETRO: Duque de Caxias, 2012.
53. Grotti, M.; Magi, E.; Frache, R.; *J. Anal. At. Spectrom*; 2000, 15, 89.
54. Guimarães-Silva, A. K.; De Lena, J. C.; Fores, R. E. S.; Costa, L. M.; Nascentes, C. C. J. *Braz. Chem. Soc*; 2012, 4, 753.
55. Miller, J. N. Miller, J. C. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Dorset Press: Dorchester, 2000.
56. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 27*, de 17 de maio de 2012.
57. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Coordenação-Geral de Apoio Laboratorial. *Manual de garantia da qualidade analítica*. MAPA/ACS: Brasília, 2011.
58. Uhrovčík, J. *Talanta*, 2014, 119, 178.
59. Thompson, M. *Anal. Methods*. 2012, 4, 1598.
60. Leite, F. *Validação em Análise Química*; Átomo: Campinas, 2008.
61. Thompson, M. *Analyst*. 1995, 120, 117N.
62. *Bureau International des Poids Et Mesures: Guides in Metrology*. Disponível em <<http://www.bipm.org/en/publications/guides/#gum>>. Acesso em 21 de fev. de 2015.
63. *Eurachem Guides*. Disponível em <<http://eurachem.org/index.php/publications/guides>>. Acesso em 21 de fev. de 2015.
64. Albano, F. M. e Raya-Rodriguez, M. T.; *Validação e Garantia da Qualidade de Ensaios Laboratoriais*; Rede Metrológica RS: Porto Alegre, 2009.
65. Rede Metrológica RS. *RM 68 – Incerteza de Medição: Guia Prático do Avaliador de Laboratórios*. Revisão 05, 2013.
66. EURACHEM / CITAC; *Guide CG 4 - Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*. 3. Ed., 2012.
67. Chuí, Q. S. H.; *J. Braz. Chem. Soc*. 2007, 18, 424.
68. Theodorou, D.; Meligotsidou, L.; Karavoltsos, S.; Burnetas, A.; Dassenakis, M.; Scoullou, M.; *Talanta*. 2011, 83, 1568.
69. Ohlsson, K. E. A.; *Accred. Qual. Assur*. 2012, 17, 301.
70. Yenisooy-Karakas, S.; *Food Chem*. 2012, 132, 1555.
71. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa Nº 5*, de 23 de fevereiro de 2007.

72. Disponível em <<http://lqta.iqm.unicamp.br/portugues/Downloads.html>>. Acesso em 19 de fev. de 2015.
73. Souza, S.V.C.; Junqueira, R.G.; *Anal. Chim. Acta*, 2005, 552, 25.
74. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: Programa de Ensaio de Proficiência em Análises de Fertilizantes e Corretivos do Mapa. *Relatório da 1ª Rodada de 2015*. Brasília, 2015.
75. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: Programa de Ensaio de Proficiência em Análises de Fertilizantes e Corretivos do Mapa. *Relatório Preliminar da 1ª Rodada de 2011*. Brasília, 2011.
76. Giné, M. F.; *Série Didática III. Espectrometria de Emissão Atômica*. CPG-CENA-USP: Piracicaba, 1998.
77. Mermet, J.M.; *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 1998, 13, 419.
78. Mermet, J.M.; *Anal. Chim. Acta*, 1991, 250, 85.
79. Novotny, I.; Farias, J. C.; Jia-Liang, W.; Poussel, E.; Mermet, J.M. *Spectrochim. Acta, Part B*, 1996, 51, 1517.
80. ABNT/INMETRO. *Guia para a Expressão da Incerteza de Medição (GUM)*. Terceira edição brasileira em língua portuguesa. ABNT, INMETRO: Rio de Janeiro, 2003.

ANEXO 1

Os procedimentos abaixo são transcrições do Manual de Métodos Analíticos Oficiais para Fertilizante e Corretivos⁸, publicado pelo MAPA. Foram retiradas as referências às variáveis utilizadas nas fórmulas de cálculo das concentrações por esses métodos oficiais. Os títulos de cada seção foram adicionados para facilitar a compreensão, tendo-se em vista que muitas vezes os procedimentos estão descritos dentro de um texto maior.

Preparo da solução de citrato neutro de amônio - CNA

Dissolver 370 g de ácido cítrico monohidratado cristalizado ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$), p.a., em 1500 mL de água e adicionar 345 mL de hidróxido de amônio (NH_4OH), p.a., com 28 a 29% de NH_3 . Se a concentração de NH_3 for menor que 28%, acrescentar volume adicional de NH_4OH , de modo a compensar a menor concentração de NH_3 , e diminuir na mesma medida o volume de água em que o ácido cítrico será dissolvido. Deixar esfriar e medir o pH. Se necessário, ajustar o pH a $7,0 \pm 0,05$ com solução aquosa de hidróxido de amônio (1 + 7), solução a 10% (m/v) de ácido cítrico ou soluções mais concentradas de ambos. Guardar a solução em frasco hermeticamente fechado. Verificar semanalmente o pH, ajustando-o quando necessário.

Extração do fósforo solúvel em citrato neutro de amônio mais água (CNA+H₂O)

a) Pesar 1 g de amostra, com precisão de 0,1 mg, e transferir para papel de filtro de porosidade média adaptado em funil e colocar sobre um balão volumétrico de 500 mL;

b) Lavar com aproximadamente 180 mL de água, em pequenas porções, tendo o cuidado de promover a suspensão da amostra e de adicionar nova porção somente após a anterior ter passado completamente;

c) Transferir o papel de filtro com o resíduo para erlenmeyer de 250-300 mL e lavar quantitativamente o funil com água, ainda adaptado ao balão volumétrico;

d) Adicionar ao erlenmeyer 100 mL de solução de citrato neutro de amônio previamente aquecida a 65°C;

e) Tampar e agitar vigorosamente por alguns minutos. Remover momentaneamente a tampa do frasco para diminuir a pressão;

f) Colocar o frasco bem fechado no agitador dentro da estufa ou banho-maria com agitador e agitar durante 1 hora, mantendo a temperatura a $65^{\circ} \pm 5^{\circ} \text{C}$;

g) Após 1 hora, retirar o frasco do sistema de agitação, esfriar até a temperatura ambiente e transferir o conteúdo do erlenmeyer para o balão volumétrico de 500 mL que contém o fósforo solúvel em água. Completar o volume e agitar;

h) Deixar em repouso até obter um sobrenadante límpido, filtrar em papel de filtro de porosidade média ou centrifugar.

Extração do boro em frasco aberto e aquecimento em chapa metálica

a) Pesar 0,5 a 1 g da amostra, com precisão de 0,1 mg, transferir para béquer de 250 mL, adicionar 50 mL de água e 3 mL de HCl concentrado, p.a.;

b) Aquecer até o início da ebulição, manter a solução aquecida por 10 minutos, esfriar, transferir para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água. Homogeneizar, deixar em repouso por 5 minutos e filtrar em papel de filtro de porosidade média ou fina, se necessário.

Extração do molibdênio em frasco aberto e aquecimento em chapa metálica

a) Pesar 0,5 a 2,5 g da amostra, de acordo com a especificação do produto, com precisão de 0,1 mg. Transferir para um béquer de 150 mL e adicionar 10 mL de HCl concentrado para massas de até 1 g de amostra. Para massa maior que 1g, aumentar proporcionalmente o volume de HCl concentrado. Cobrir com vidro de relógio, levar à ebulição moderada em placa ou chapa aquecedora até próximo à secura, sem deixar queimar o resíduo. Para amostras com concentração de molibdênio acima de 5% em massa ou matérias-primas menos solúveis, esta etapa deverá ser repetida, com nova adição de HCl concentrado, aquecendo-se novamente até próximo à secura.

Preparar, em paralelo, uma prova em branco.

ANEXO 2 - FOR UGQ 085 - Planilha para verificação da linearidade

Página: 1 de 6

Título do Método:

Enxofre por ICP OES - 181,972 nm

Tipo de curva:

Linear

Analito:

Enxofre (181,972 nm)

Faixa de trabalho:

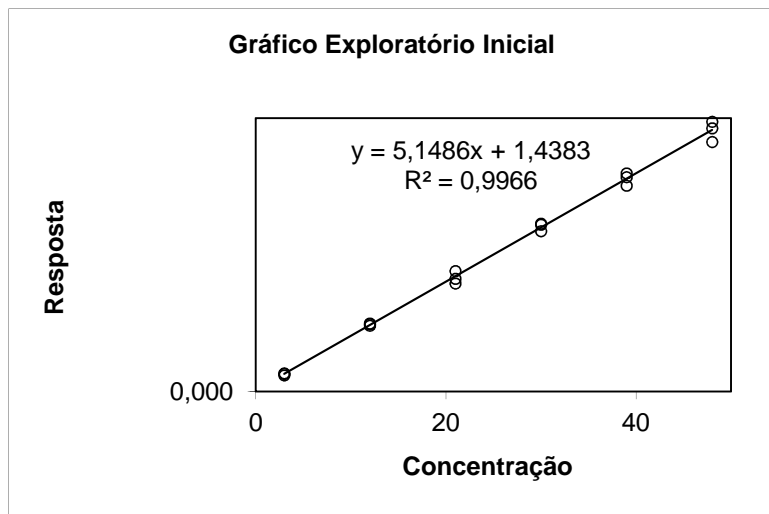
3 a 48 mg/L-1

Analista:

Tiago Charão de Oliveira

Tabela de dados originais

Pontos	Concentração	Resposta
1	3	15,542
2	3	16,877
3	3	17,446
4	12	62,762
5	12	64,137
6	12	64,823
7	21	102,894
8	21	107,313
9	21	114,596
10	30	152,560
11	30	159,706
12	30	158,775
13	39	195,826
14	39	203,951
15	39	207,540
16	48	237,379
17	48	250,388
18	48	256,579



Teste do Resíduo Padronizado Jacknife - Outliers

Pontos	x_i	y_i	e_i	J_{ei}
1	3,0	16	-1,02	-0,501
2	3,0	17	0,31	0,151
3	3,0	17	0,88	0,430
4	12,0	63	-1,17	-0,550
5	12,0	64	0,20	0,093
6	12,0	65	0,89	0,412
8	21,0	107	-4,00	-2,161
9	21,0	115	3,29	1,667
11	30,0	160	1,03	0,473
12	30,0	159	0,09	0,043
14	39,0	204	-2,10	-1,040
15	39,0	208	1,49	0,719
17	48,0	250	-3,04	-1,731
18	48,0	257	3,15	1,819

O número máximo de outliers deletados é

4

Macros para deletar outliers

Resumo dos Resultados

Outliers

No. deletado = 4

Normalidade

Req = 0,9832 $p > 0,10$
Segue a Normal

Independência

Não há auto autocorrelação
 $p > 0,10$

Homoscedasticidade

Há homocedasticidade
 $p > 0,05$

Desvio de linearidade

A regressão é significativa
 $p < 0,001$

Não há desvio de linearidade
 $p > 0,05$

S_{eq}	25,6696
S_{ee}	57,7612
S_{qq}	11,8004
R_{eq}	0,9832

ANEXO 2 - FOR UGQ 085 - Planilha para verificação da linearidade

Página: 2 de 6

Teste de Ryan-Joiner - Normalidade dos resíduos

Pontos	p_i	q_i	e_i
1	0,0439	-1,7076	-4,00
2	0,1140	-1,2053	-3,04
3	0,1842	-0,8994	-2,10
4	0,2544	-0,6608	-1,17
5	0,3246	-0,4550	-1,02
6	0,3947	-0,2670	0,09
7	0,4649	-0,0881	0,20
8	0,5351	0,0881	0,31
9	0,6053	0,2670	0,88
10	0,6754	0,4550	0,89
11	0,7456	0,6608	1,03
12	0,8158	0,8994	1,49
13	0,8860	1,2053	3,15
14	0,9561	1,7076	3,29

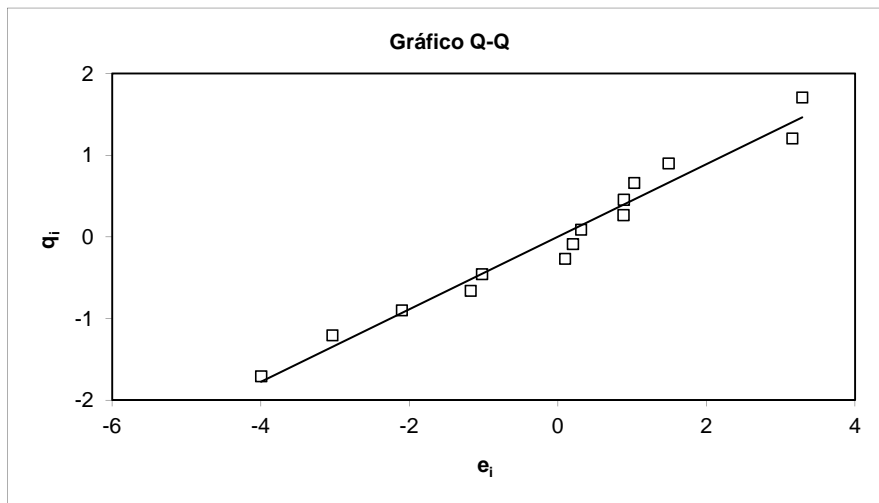
$R_{eq} = 0,9832$
Desvio da Normal : $p > 0,10$
Conclusão
Os resíduos seguem a Normal

Valores Críticos de R
$R_{crítico} (\alpha: 0,10) = 0,9481$
$R_{crítico} (\alpha: 0,05) = 0,9351$
$R_{crítico} (\alpha: 0,01) = 0,9061$

Hipóteses

H₀: os resíduos seguem a distribuição Normal

H_a: os resíduos seguem outra distribuição de probabilidade



Max	Min
1,71	-1,71
3,29	-4,00

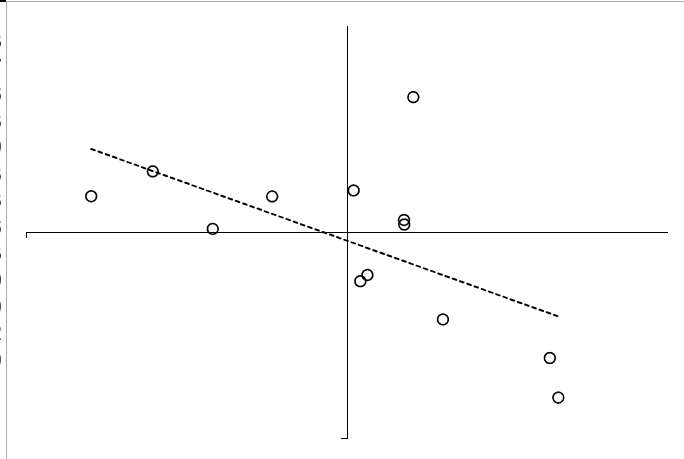
ANEXO 2 - FOR UGQ 085 - Planilha para verificação da linearidade

Página: 3 de 6

Teste de Durbin-Watson - Independência dos resíduos

Pontos	e_i	e_{i-1}	$e_i - e_{i-1}$
1	-1,02		
2	0,31	-1,02	1,33
3	0,88	0,31	0,57
4	-1,17	0,88	-2,06
5	0,20	-1,17	1,38
6	0,89	0,20	0,69
8	-4,00	0,89	-4,88
9	3,29	-4,00	7,28
11	1,03	3,29	-2,26
12	0,09	1,03	-0,93
14	-2,10	0,09	-2,20
15	1,49	-2,10	3,59
17	-3,04	1,49	-4,52
18	3,15	-3,04	6,19

Gráfico de Durbin-Watson (e_i x e_{i-1})



Max	Mín
3,29	-4,00

Hipóteses

Ho: não há autocorrelação entre os resíduos (Há independência)

Ha: há autocorrelação entre os resíduos (Não há independência)

d = 2,909427477

Conclusão

Não há auto autocorrelação, $p > 0,1$

$\alpha = 0,05$

Correlação Positiva	d_L	Não conclusivo	d_U	Não há correlação	$4-d_U$	Não conclusivo	$4-d_L$	Correlação Negativa
	1,05		1,35		2,65	2,909	2,95	

$\alpha = 0,025$

Correlação Positiva	d_L	Não conclusivo	d_U	Não há correlação	$4-d_U$	Não conclusivo	$4-d_L$	Correlação Negativa
	0,92		1,22		2,78	2,909	3,08	

$\alpha = 0,01$

Correlação Positiva	d_L	Não conclusivo	d_U	Não há correlação	$4-d_U$	Não conclusivo	$4-d_L$	Correlação Negativa
	0,77		1,06	2,909	2,94		3,23	

ANEXO 2 - FOR UGQ 085 - Planilha para verificação da linearidade

Página: 4 de 6

Teste de Brown-Forsythe ou Levene modificado - Homoscedasticidade dos resíduos

Hipóteses

Ho: as variâncias dos resíduos não são diferentes (Há homoscedasticidade) Ha: as variâncias dos resíduos são diferentes (Há heteroscedasticidade)
--

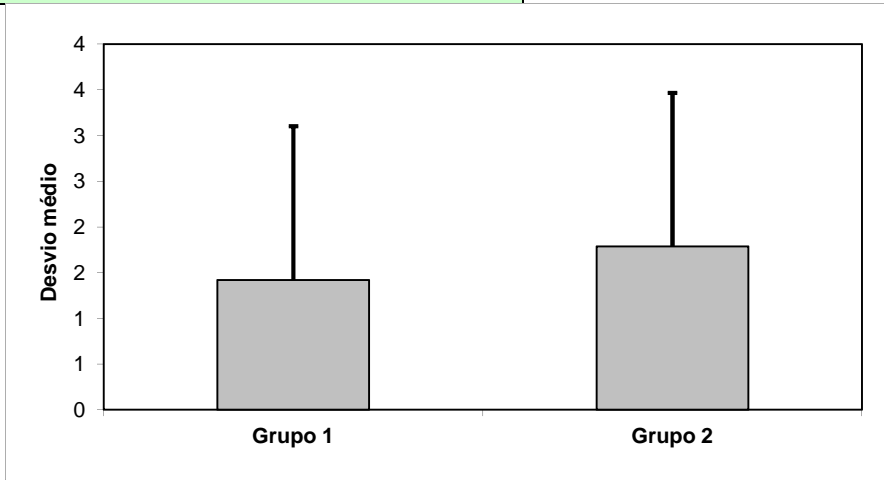
Grupo k=1		Grupo k=2			
e_{1j}	e_{2j}	$ d_{1j} $	$ d_{2j} $	$ d_{1j} ^*$	$ d_{2j} ^*$
-1,0229		1,2790		1,2790	
0,3116	1,0261	0,0556	0,4655	0,0556	0,4655
0,8812	0,0950	0,6251	0,4655	0,6251	0,4655
-1,1749		1,4310		1,4310	
0,2005	-2,1012	0,0556	2,6618	0,0556	2,6618
0,8860	1,4879	0,6300	0,9274	0,6300	0,9274
-3,9958	-3,0359	4,2518	3,5964	4,2518	3,5964
3,2877	3,1548	3,0316	2,5943	3,0316	2,5943

Estadística	Grupo k=1	Grupo k=2
n_k	8	6
e_k (mediana)	2,6E-01	5,6E-01
d_k (média)	1,42E+00	1,79E+00
SQD_k	1,56E+01	8,92E+00
s_p^2	2,04E+00	
t_L	-0,473	
p	0,6448	$p > 0,05$

*Corrigido para ocorrência de zero

Estadística	Grupo k=1	Grupo k=2
n_k	8	6
e_k (mediana)	2,6E-01	5,6E-01
d_k (média)	1,42E+00	1,79E+00
SQD_k	1,56E+01	8,92E+00
s_p^2	2,04E+00	
t_L	-0,473	
p	0,6448	$p > 0,05$

Conclusão
 Não há evidência para rejeitar Ho
 Há homoscedasticidade



Grupo 1	Grupo 2	t^*EP
1,4	1,8	1,7

ANEXO 2 - FOR UGQ 085 - Planilha para verificação da linearidade

Página: 5 de 6

MMQO ou Análise de Regressão Linear (Modelo: $Y = a + bX$)

Estatísticas da regressão	
R^2	0,999392694
n	14

Estatísticas auxiliares	
S_{xy}	1,81E+04
S_{xx}	3,43E+03
S_{yy}	9,51E+04
$t_{critico}$	2,179
$J_{critico}$	2,201

ANOVA - Teste do desvio da linearidade e significância da regressão

$S^2_{res} = 4,813437$

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>Sign.</i>	<i>F_{critico}</i>
Regressão	1	9,51E+04	9,51E+04	19747,41	1,13E-20	p < 0,001	4,747225347
Resíduo	12	5,78E+01	4,81E+00				
Desvio da lín	4	1,09E+00	2,72E-01	0,038	9,97E-01	p > 0,05	3,837853355
Entre nívei	5	9,51E+04					
Erro puro	8	5,67E+01	7,08E+00				
Total	13	9,51E+04					

Hipóteses

Ho: a regressão não é significativa

Ha: a regressão é significativa

Conclusão

A regressão é significativa p < 0,001

Não há desvio de linearidade p > 0,05

Ho: o modelo linear simples é correto (Não há desvio da linearidade)

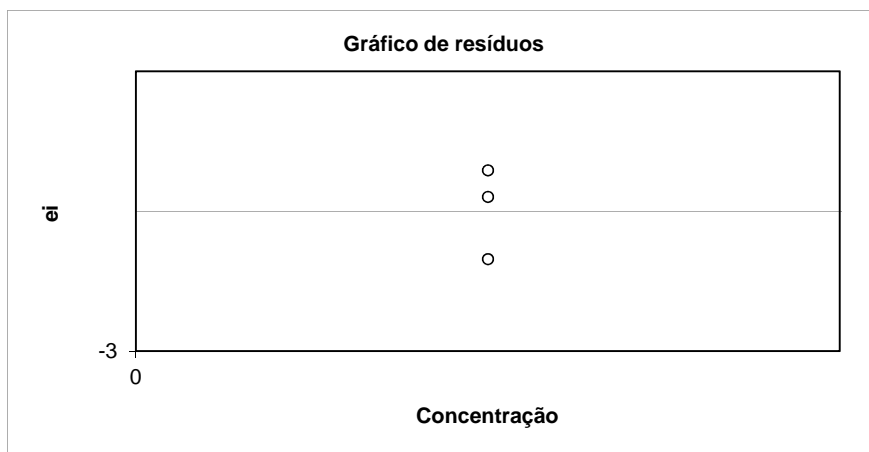
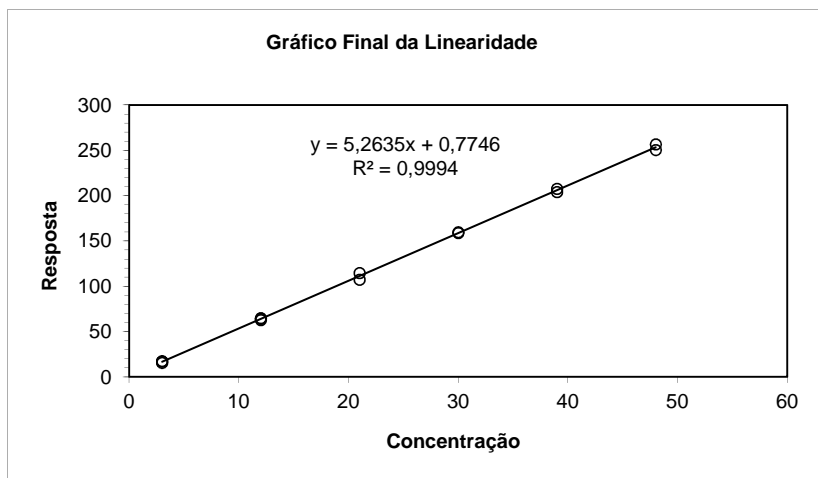
Ha: o modelo linear simples não é correto (Há desvio da linearidade)

ANEXO 2 - FOR UGQ 085 - Planilha para verificação da linearidade

Página: 6 de 6

Estimativas dos parâmetros, desvios, significância e intervalos de confiança

Coefficiente	Valor	s (EP)	Stat t	p	IC 95% inf	IC 95% sup
Linear (a)	0,7746	1,0399	0,745	4,71E-01	-1,4911	3,0403
Angular (b)	5,26353	0,03746	140,525	8,76E-12	5,1819	5,3451



Linhas do zero e do intervalo $\pm t\sqrt{QMRes}$

X	Zero	B+	B-
0	0	5	-5
120	0	5	-5

Tabela de Outliers

X	Outlier
48	-16,05
39	-10,23
21	-8,42
30	-6,12

Referência: SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. Anal. Chim. Acta, v. 552, p. 25-35, 2005.