

VALIDAÇÃO DE MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE H₂O₂ EM ÁGUA DE ABASTECIMENTO PÚBLICO

Railson de Oliveira Ramos (1); Josivaldo Rodrigues Sátiro (2); Maria Virgínia da Conceição Albuquerque (3); Wilton Silva Lopes (4)

Universidade Estadual da Paraíba-UEPB – railson_uepb@outlook.com¹

Universidade Estadual da Paraíba-UEPB – josivaldosatiroo@gmail.com²

Universidade Estadual da Paraíba-UEPB – virginia.albuquerque@yahoo.com.br³

Universidade Estadual da Paraíba-UEPB – wiltonuepb@gmail.com

RESUMO

O peróxido de hidrogênio é uma das substâncias mais utilizadas em processos de oxidação aplicados no tratamento de águas e efluentes. O monitoramento dos níveis deste composto é indispensável, uma vez que, a presença de peróxido residual pode causar sérios danos ao meio ambiente, no caso de águas residuais tratadas, ou sérios danos à saúde da população, no caso de água destinada ao abastecimento público. Para que uma metodologia analítica possa ser considerada segura, ela deve atender aos critérios preconizados por entidades reguladoras, viabilizando a obtenção de respostas analíticas confiáveis. O presente trabalho, descreve o desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para determinação de peróxido de hidrogênio em águas. O método desenvolvido atende todos os parâmetros preconizados pela Resolução nº 833 de 2003 da ANVISA, com R² 0,99, coeficiente de variação (precisão) 3,7%, exatidão 97%, limite de quantificação de 0,65 mg/L e limite de detecção de 2,17 mg/L, podendo ser aplicado para determinação de peróxido de hidrogênio residual em águas.

Palavra – Chave: Peróxido de Hidrogênio residual, validação de método, espectrofotometria, água potável.

INTRODUÇÃO

O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é uma das substâncias mais utilizadas em processos de oxidação aplicados no tratamento de águas e efluentes. Diversos processos oxidativos avançados com fotólise de H₂O₂, Fenton e Foto-fenton empregam o peróxido de hidrogênio como reagente precursor. Este composto é um agente oxidante forte, com potencial padrão de 1,80 e 0,87 V em pH 0 e 14, respectivamente. No entanto, o peróxido de hidrogênio sozinho não possibilita a oxidação de compostos poluentes, sendo necessário combiná-lo com outros agentes químicos e físicos para

geração de radicais hidroxila. Esses agentes incluem o íon ferroso, o ozônio e a radiação UV (IKEHATA, 2006). O uso do peróxido de hidrogênio como oxidante possui inúmeras vantagens sobre outros tratamentos químicos como aqueles que utilizam cloro e ozônio: é comercialmente disponível, possui estabilidade térmica, pode ser estocado on-site, apresenta solubilidade infinita em água e não gera subprodutos em processos de desinfecção, como organoclorados (PEIXOTO, 2013).

O monitoramento dos níveis deste composto é indispensável, uma vez que, a presença de peróxido residual pode causar sérios danos ao meio ambiente, no caso de águas residuais tratadas, ou sérios danos a saúde da população, no caso de água destinada ao abastecimento público. De acordo com Mendes (2011), para que uma metodologia analítica possa ser considerada segura, ela deve atender aos critérios de aceitação descritos por entidades reguladoras, permitindo uma correta interpretação dos resultados analíticos. A validação de um método analítico é definida como um processo segundo o qual se estabelece, através de ensaios laboratoriais, que o desempenho do método obedece aos requisitos da aplicação analítica. É um aspecto crucial para garantir a qualidade analítica desse método e implementar um sistema de controle de qualidade em qualquer laboratório analítico (LEITE, 2011).

A ANVISA em sua resolução nº 899, de 29 de maio de 2003, e o INMETRO no documento DOQCGCRE- 008, de 2006, citam os requisitos mínimos para a validação de um método analítico. De acordo com Barbosa (2012), os parâmetros considerados os mais significativos para a realização de validação de método são linearidade, precisão, exatidão e limiares analíticos dos quais fazem parte, o limite de quantificação (LQ) e o limite de detecção (LD).

Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Esta relação é obtida através de uma expressão matemática bem definida que relaciona concentração do analito na amostra com uma resposta do método de detecção, e pode ser expressa matematicamente pela equação de reta.

$$y = a x + b$$

Equação 1

Em que,

y - é a resposta medida (altura ou área do pico), variável dependente;

x - concentração do analito, variável independente;

a - inclinação da curva de calibração (coeficiente angular);

b - intersecção com o eixo y (coeficiente linear).

A linearidade estima-se avaliando a razão das áreas dos picos dos padrões e as concentrações dos padrões de calibração e é estabelecida em função da reta de calibração, a qual consiste numa representação gráfica de um determinado coeficiente de correlação (r) que permite uma estimativa da qualidade da curva. É importante ressaltar, que quando maior o coeficiente angular obtido, maior será a sensibilidade do método em relação ao analito em estudo, uma vez que, este coeficiente representa a resposta no cromatograma referente à presença do analito. Resolução nº 899 da ANVISA recomenda que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser = 0,98.

Precisão

Este parâmetro pode ser avaliado de duas formas: através da repetitividade e da reprodutibilidade. Assim sendo, a repetitividade expressa à precisão durante o processamento de uma sequência analítica num curto período de tempo, no mesmo laboratório, com a mesma instrumentação e condições de operação, e pelo mesmo analista. Por outro lado, a reprodutibilidade reflete a precisão em dias diferentes, podendo implicar diferentes analistas, equipamentos e reagentes (LEITE, 2013).

A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas através do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a Equação 2.

$$CV\% = \frac{DP}{CMd} \times 100\%$$

Equação 2

Em que, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada. O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 20% (ANVISA, 2003; INMETRO, 2006). Este é um importante parâmetro porque possibilita decidir se o método analítico é confiável ou não para o objetivo da análise

Exatidão

A resolução nº 899 da ANVISA determina que este parâmetro deve ser verificado a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente conforme a Equação 9:

$$Exatidão = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100\%$$

Equação 3

Limites Analíticos

Limite de detecção: de acordo com a resolução nº 899 da ANVISA, em métodos instrumentais, a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação entre desvio padrão e coeficiente angular da curva de calibração, e calculado através da Equação 4.

$$LD = DP_a \times 3/CA$$

Equação 4

Em que: DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações próximas ao suposto limite de quantificação. CA é o coeficiente angular da curva de calibração

O limite de quantificação é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do analito até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis. Pode ser expresso pela equação 11.

$$LQ = DP_a \times 10/CA \quad \text{Equação 5}$$

Em que: DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação. CA é o coeficiente angular da curva de calibração (ANVISA, 2003).

METODOLOGIA

O procedimento para calibração da curva para análise de H_2O_2 residual compreendeu o preparo de padrões com diferentes concentrações de H_2O_2 em água destilada. Utilizou-se como indicador o Titanium (IV) bis (ammonium lactato) dihydroxide solution, da Sigma-Adrich, que ao reagir com o peróxido de hidrogênio em meio aquoso forma o ácido titânico, um sal amarelo que absorve no comprimento de onda de 410 nm. Para desenvolvimento da curva de calibração foram utilizados padrões de concentração de 1,25, 2,5, 5, 10, 20 e 50 mg/L. O espectrofotômetro utilizado foi um COLEMAN 35-D, e o comprimento de onda foi 410 nm.

O preparo dos padrões compreendeu a adição 0,3 ml de Titanium (IV) bis (ammonium lactato) dihydroxide em 3 ml do padrão contendo H_2O_2 . Os padrões foram então homogeneizados em um vortex, e após 10 minutos, realizaram-se as leituras de absorbância no espectrofotômetro.

A determinação da precisão foi realizada através do método da repetitividade (precisão intra-corrida) descrita na Resolução nº 833 de 2003 da ANVISA. Foram realizadas três leituras de absorbância para cada concentração.

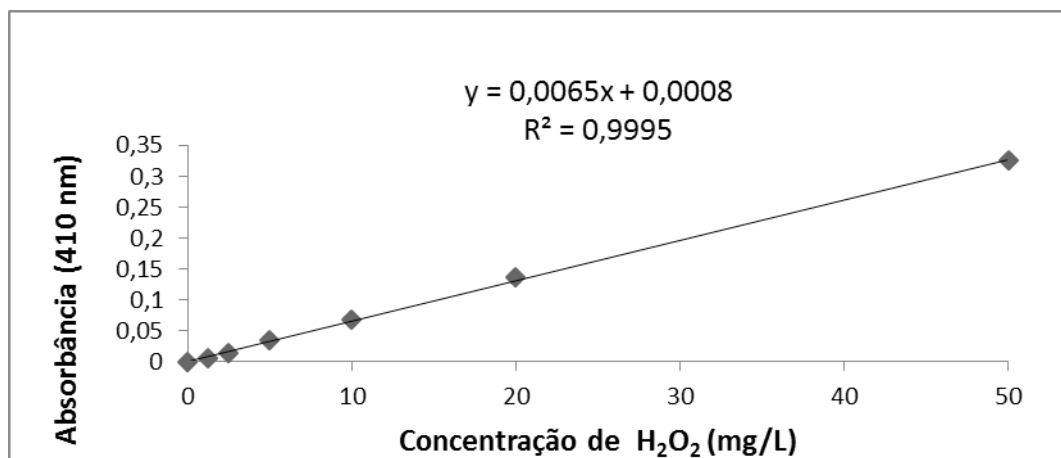
Para análise de exatidão, utilizou-se como matriz a água de abastecimento público da cidade de Campina Grande, que é captada no açude Epitácio Pessoa, tratada e distribuída pela Companhia de Água e Esgotos do Estado da Paraíba. Três amostras contendo concentração de 1,25, 5 e 50 mg/L de H_2O_2 foram preparadas utilizando a água matriz como solvente, e para cada concentração escolhida três leituras no espectrofotômetro foram realizadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Linearidade

A curva da Figura 12 a seguir apresenta a absorbância no comprimento de onda de 410 nm para cada padrão. O valor de absorbância desta curva corresponde ao valor médio para três leituras no espectrofotômetro.

Figura 1: Curva de calibração para análise de H₂O₂ residual.



Foi obtido um coeficiente de correlação linear de 0,99, que atende as recomendações da Resolução n° 833 de 2003 da ANVISA para a Equação 14 a seguir.

Precisão

A tabela 1 a seguir apresenta os valores de concentração, absorbância, média das absorbâncias, desvio padrão e coeficiente de variação utilizado na análise da precisão em espectrofotometria. Estes valores são referentes a três repetições de leitura dos padrões.

Tabela 1: Valores de concentração, absorbância, média das absorbâncias, desvio padrão e coeficiente de variação utilizada na análise da precisão em espectrofotometria.

Concentração (mg/L)	Absorbância			Média	Desvio Padrão	CV %
	1°	2°	3°			
0	0	0	0	0	0,0000	0
1,25	0,007	0,005	0,006	0,006	0,0006	8,7
2,5	0,014	0,014	0,017	0,015	0,0017	11,5
5	0,034	0,034	0,035	0,0343	0,0006	1,7
10	0,067	0,068	0,069	0,068	0,0010	1,5
20	0,137	0,135	0,136	0,136	0,0010	0,7
50	0,32	0,325	0,33	0,325	0,0050	1,5

Verificou-se que o valor de CV para cada ponto da reta, obtido pela Equação 2, obedeceu ao limite recomendado pela Resolução n° 833 de 2003 da ANVISA, que deve ser menor que 20%. O CV médio, que equivale a 3,7 % também atende as recomendações desta resolução.

Limites analítico

O desvio padrão médio obtido pela Tabela 1 é de 0,0014, e o coeficiente angular obtido na pela curva de calibração da Figura 1 é de 0,0065. O limite de detecção e de quantificação foram obtidos através das Equações 4 e 5, respectivamente.

Segue:

$$LD = 0,0014 \times 3/0,0065$$

$$LD = 0,65 \text{ mg/L}$$

$$LQ = 0,0014 \times 10/0,0065$$

$$LQ = 2,17 \text{ mg/l}$$

Desta forma, o limite de detecção foi de 0,65 mg/L e o de quantificação de LQ= 2,17 mg/l. Sobrinho (2008) na validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel, obteve valores LD e LQ de 0,75 e 2,51 mg/l respectivamente. Moura (2008), na validação de método analítico espectrofotométrico UV para determinação de ácido úsnico em lipossomas, obteve LD e LQ de 0,34 e 1,13 mg/L,

respectivamente. Desta forma, é possível observar que os valores obtidos de LQ e LD encontrados são próximos aos descritos na literatura para métodos espectrofotométricos.

Exatidão

A Tabela 2 a seguir apresenta os valores calculados de concentração, os valores experimentais de concentração obtidos, a média, o desvio padrão e os valores de exatidão calculados.

Tabela 2: Valores calculados de concentração, os valores experimentais de concentração obtidos, média, desvio padrão e os valores de exatidão para teste de H₂O₂ residual.

Concentração Teórica (mg/L)	Absorbância				Concentração experimental (mg/L)	Exatidão %
	1°	2°	3°	Média		
1,25	0,008	0,008	0,008	0,008	1,108	88,62
5	0,034	0,035	0,036	0,035	5,262	105,23
50	0,31	0,32	0,31	0,313	48,082	96,16

Os valores da exatidão foram obtidos através da equação 3. A média da exatidão referente às três concentrações é de 97 %, e este resultado indica o quanto os valores experimentais estão próximos dos valores teóricos.

CONCLUSÃO

A análise de mérito demonstrou que o método desenvolvido atende todas as preconizações esmaecidas pela ANVISA, apresentando coeficiente de correlação de 0,99, coeficiente de variação

de 3,7%, limite de detecção de 0,65 mg/L e de quantificação de LQ= 2,17 mg/L e exatidão de 97 %. O desenvolvimento do método é uma importante contribuição para os sistemas de tratamento de água que empregam peróxido de hidrogênio durante as operações do tratamento. Como recomendações para trabalhos futuros, é sugerido o teste de diferentes instrumentações que viabilizem a obtenção de limites analíticos menores.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil., Resolução RE n° 899 de 29/05/2003, Brasília (DF), 2003.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. Documento orientativo, DOQCGCRE- 008. 35 p, 2011.

IKEHATA, K.; EL-DIN, M. G. Aqueous pesticide degradation by hydrogen peroxide/ultraviolet irradiation and Fenton-type advanced oxidation processes: a review. Journal of Environmental Engineering and Science, v. 5,n. 2, p.81-135, 2006.

LEITE, M., Desenvolvimento e Optimização de uma Metodologia Analítica para a Determinação de α - e β - Amanitina em urina humana por LC-MS/MS. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências Tecnológicas da Universidade de Coimbra. 1-136. 2011.

MENDES, A. S. R., Implementação e Validação de Métodos Analíticos. 2011. <http://www3.uma.pt/valimed/livro%202004/artigo6-AR.pdf>

MOURA, S. P. M., LIRA, M. C. B., MAGALHÃES, N. S. S., Validação de método analítico espectrofotométrico UV para determinação de ácido úsnico em lipossomas, Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 44, n. 4, out./dez., 2008.

PEIXOTO, A. L. C., Degradação do herbicida amicarbazona por fotólise direta e H₂O₂ em reator totoquímico anular coaxial, Tese de doutorado, escola politécnica, USP, 2013.



SOBRINHO, P. S. J. T., SILVA, H. T. P. C., NASCIMENTO, J. E., MONTEIRO, J. M. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de Bauhinia cheilantha (Bongard) Steudel, Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 44, n. 4, out./dez., 2008.