

MANUAL DE
GARANTIA
DA QUALIDADE ANALÍTICA

Resíduos e Contaminantes em Alimentos

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA)

MANUAL DE
GARANTIA
DA QUALIDADE ANALÍTICA

Missão

Promover o desenvolvimento sustentável e a competitividade do agronegócio em benefício da sociedade brasileira.

BRASÍLIA - 2011

© 2011 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
Todos os direitos reservados. Permitida a reprodução desde que citada a fonte.
A responsabilidade pelos direitos autorais de textos e imagens desta obra é do autor.

1ª edição - Ano 2011
Tiragem: 1.000
Elaboração, distribuição e informações:
MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO
Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA)
Coordenação-Geral de Apoio Laboratorial (CGAL)
Esplanada dos Ministérios, Bloco D, Anexo B, sala 440
CEP 70043-900 - Brasília - DF
Telefones: (61) 3218-2535
www.agricultura.gov.br
E-mail: cgal@agricultura.gov.br
Central de Relacionamento: 0800 704 1995

COORDENAÇÃO EDITORIAL:

Assessoria de Comunicação Social

EQUIPE TÉCNICA DO PROJETO:

Coordenação

Angelo de Queiroz Mauricio (CGAL/Mapa)

Concepção e Revisão Técnico-Científica

Marcelo Cláudio Pereira (CGAL/Mapa)
Wellington Ferreira de Magalhães (DQ/ICEx/UFMG)

Consultoria

Wellington Ferreira de Magalhães (DQ/ICEx/UFMG)

Redação, Desenvolvimento e Colaboração

Angelo de Queiroz Mauricio (CGAL/Mapa)
Beatriz Rauber (Lanagro/RS)

Dario Abbud Righi (CGAL/Mapa)
Edna Silvana (Lanagro/PE)
Eleonora Vieira dos Santos (Lanagro/MG)
Eliene Alves dos Santos (Lanagro/MG)
Eugênia Azevedo Vargas (Lanagro/MG)
Fabiano Aurélio da Silva Oliveira (Lanagro/MG)
Fernando Antunes Lopes (Lanagro/SP)
Helena Müller Queiroz (Lanagro/SP)
Igor Olivares (Lanagro/SP)
Josefa Abucáter Lima (Lanagro/MG)
Kátia Letícia Carvalho (Lanagro/MG)
Lilian Costa (Lanagro/PA)
Marcelo Cláudio Pereira (CGAL/Mapa)
Maria Aparecida Brum (Lanagro/RS)
Nélio Fleury Filho (Lanagro/GO)
Wellington Ferreira de Magalhães (DQ/ICEx/UFMG)

Apoio

Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários

Impresso no Brasil/Printed in Brazil

Catálogo na Fonte
Biblioteca Nacional de Agricultura – BINAGRI

Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.
Manual de garantia da qualidade analítica. / Ministério da Agricultura Pecuária
e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília : MAPA/ACS, 2011.

227 p.

ISBN 978-85-7991-055-5

1. Controle de qualidade. 2. Medicamento. 3. Análise química I. Secretaria
de Defesa Agropecuária. II. Título.

AGRI Q55, L70
CDU 636.084.41

SUMÁRIO

Apresentação	7
Prefácio	9
Parte I	13
Introdução e Requisitos Gerais	13
I.1 Objetivo	13
I.2 Responsabilidades	13
I.3 Evitando Contaminação	13
I.4 Padrões de Trabalho (Analíticos), de Referência e MRC	14
I.5 Cadeia de Custódia de Padrões de Trabalho (Analíticos).....	15
I.6 Preparação, Uso e Armazenamento de Soluções Padrão	15
I.7 Reagentes e suas Soluções.....	16
I.8 Recepção, Armazenamento e Preparação de Amostras	16
I.9 Desenvolvimento e Otimização do Procedimento Analítico ...	17
I.10 Validação de Procedimentos Analíticos	19
I.11 Condições do Processo de Validação	22
Parte II	25
Parâmetros e Critérios de Aceitação de Desempenho de um Procedimento Analítico	25
II.1 Níveis de Interesse Analítico	25
II.2 Critérios de Desempenho Aplicáveis à Detecção por EM	26
II.3 Curvas de Calibração, Linearidade, Sensibilidade e Faixa de Trabalho (FT).....	28
II.4 Seletividade e Efeito Matriz.....	33
II.5 Veracidade/Recuperação	37
II.6 Precisão	40
II.7 Limites de Detecção (LD), Limite de Quantificação (LQ), Limite de Decisão ($CC\alpha$) e Capacidade de Detecção ($CC\beta$)....	42
II.8 Incerteza de Medição Analítica (IMA).....	50
II.9 Estudo de Robustez, Escopo e Portabilidade	64
II.10 Expressão e Interpretação dos Resultados de Medições.....	67
II.11 Relatório de Validação	71
Parte III	73
Estudos de Estabilidade	73
III.1 Estabilidade do Analito na Matriz não Processada.....	73
III.2 Estabilidade do Analito na Matriz Processada	74
III.3 Estabilidade do Analito no Extrato ou na Solução de Abertura de Amostra	75

III.4 Estabilidade das Soluções Padrão.....	76
III.5 Estabilidade dos Padrões de Trabalho e dos Materiais de Referência não Certificados	76
Parte IV	79
A Rotina Analítica e o Controle de Qualidade Analítica (CQA).....	79
Parte V	81
Ampliação do Escopo do Procedimento Analítico Validado: Inclusão de Nova Matriz ou Novo Analito em Procedimento Analítico Validado	81
V.1 Procedimento de Determinação do Efeito de Matiz para a Inclusão de Nova Matriz ou Novo Analito Comparando-se Duas Curvas de Calibração.....	82
V.2 Estudo de Veracidade e Precisão para a Inclusão de Nova Matriz ou Novo Analito.....	84
Parte VI	85
Aspectos Específicos da Validação de Procedimentos Analíticos para as Diferentes Categorias de Analitos.....	85
VI.1 Resíduos de Medicamentos Veterinários	85
VI.2 Resíduos de Praguicidas (Agrotóxicos)	89
VI.3 Contaminantes Inorgânicos	97
VI.4 Micotoxinas.....	112
ANEXO I.....	127
Cálculos da Estimativa dos Parâmetros da Regressão pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO)	127
ANEXO II	131
Qualidade do Ajuste e Verificação da Homoscedasticidade ou Heteroscedasticidade da Resposta Instrumental na Regressão pelo MMQO.....	131
ANEXO III	139
Avaliação dos Pontos Duvidosos, Aberrantes, Extremos (<i>outliers</i>) e Critérios de Aceitação para a Linearidade no MMQO.....	139
ANEXO IV.....	141
Avaliação da Incerteza de Previsão da Concentração do Analito na Curva de Calibração Cálculo de Incerteza de Calibração no MMQO.....	141
ANEXO V.....	143
Planilhas de Cálculos no Excel validado.....	143

ANEXO VI	145
Cálculo da Estimativa dos Parâmetros da Regressão pelo Método dos Mínimos Quadrados Ponderados (MMQP)	145
ANEXO VII	149
Qualidade do Ajuste e Verificação da Heterocedasticidade da Resposta Instrumental na Regressão pelo MMQP	149
ANEXO VIII	151
Avaliação dos Pontos Duvidosos, Aberrantes, Extremos (<i>outliers</i>) e Critérios de Aceitação para a Linearidade no MMQP	151
ANEXO IX	153
Avaliação da Incerteza de Previsão da Concentração do Analito na Curva de Calibração, Cálculo de Incerteza de Calibração no MMQP.....	153
ANEXO X	155
Glossário: Definições, Vocábulos, Termos, Siglas e Abreviações ..	155
ANEXO XI	177
Matrizes Representativas (Praguicida e Micotoxinas)	177
ANEXO XII	179
Planejamento Fatorial para o Estudo de Robustez.....	179
Planejamentos Fatoriais Completos	180
Planejamentos Fatoriais Fracionários	190
Critérios de Aceitação, Análise dos Resultados dos Planejamentos Fatoriais.....	195
ANEXO XIII	205
Referências Normativas e Bibliográficas.....	205
ANEXO XIV	211
Quadros Comparativos: Manual de Garantia da Qualidade Analítica <i>versus</i> outras Referências Normativas	211
Quadros Comparativos	212
Abrangência do Manual de Garantia da Qualidade Analítica em Relação aos Parâmetros de Validação Preconizados pelas Principais Normas e Referências Utilizadas.....	212



APRESENTAÇÃO

Apresentação

Ao longo dos anos nos quais os laboratórios da rede do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) têm conduzido seus trabalhos analíticos, convivemos com diversos cenários e perspectivas, enfrentamos vários desafios, superamos inúmeras adversidades e alcançamos importantes vitórias.

Contudo, nenhuma vitória foi tão significativa quanto a implantação dos conceitos referentes à validação de métodos de ensaio e garantia da qualidade analítica nos trabalhos do dia a dia da Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários no que diz respeito à área de resíduos e contaminantes em alimentos.

Durante muito tempo, os procedimentos de validação e da garantia da qualidade dos resultados ficaram dispersos, cada laboratório possuindo seus próprios procedimentos em face da vasta gama de guias e documentos internacionais existentes.

Com a publicação deste Manual de Garantia da Qualidade Analítica, o Mapa reúne, em um único documento didático e elucidativo, a bibliografia mais atual referente ao assunto, produzindo um guia de referência de alto nível que aponta as tendências e vanguardas em relação ao controle analítico de perigos químicos.

Este Manual tem por objetivo esclarecer e disseminar conceitos tecnicamente consistentes, bem como instruir os laboratórios, de forma clara e didática, sobre como realizar um estudo de validação passo a passo e implantar procedimentos de garantia de qualidade de resultados, de modo a permitir uma avaliação objetiva de seu próprio desempenho e de seus métodos de ensaio.

A implantação efetiva dos requisitos e orientações constantes deste Manual não é a maneira mais curta de se fazer as coisas, mas é, sem dúvida, a garantia inequívoca e inquestionável da confiabilidade, qualidade e competência técnica de qualquer laboratório que o utilize.

A todos os que se dedicaram, contribuíram e se empenharam nos incontáveis esforços de elaboração do Manual de Garantia da Qualidade Analítica, agradecemos fortemente. Estejam certos de um trabalho bem feito.

Angelo de Queiroz Mauricio

PREFÁCIO

Prefácio

O resultado de uma medição é sempre usado para subsidiar alguma tomada de decisão, seja ela a conformidade de um produto ou serviço a alguma especificação, ao requisito de alguma norma nacional ou internacional ou à obediência a alguma lei. Essa tomada de decisão pode também constituir o atendimento a algum contrato ou critério interno ou externo de qualidade.

No entanto, o resultado de qualquer medição está sempre sujeito a erros, sejam eles sistemáticos ou aleatórios, os quais resultam na perda de sua acurácia. Nesse sentido, é necessário que os laboratórios de ensaios que realizam tais medições disponham de orientações científicas e conceitualmente consistentes de como proceder para reduzir os erros e aumentar a confiabilidade dos resultados das medições, reduzindo-se gradualmente os riscos da tomada de decisão. Particularmente no caso das medições analíticas, são escassas as publicações com essas orientações, especialmente em língua portuguesa. Soma-se a isso o fato de que são muitas as divergências conceituais e as desarmonias de vocabulários entre as publicações existentes, sendo que várias não apresentam consistência estatística e metrológica.

Considerando a necessidade de se dispor de orientações harmonizadas e cientificamente consistentes dentro do cenário nacional de controle de resíduos e contaminantes em alimentos, assim como a de atender às crescentes exigências de qualidade dos resultados analíticos de nossos compradores internacionais de alimentos, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), por intermédio da Secretaria de Defesa Agropecuária (das) e da Coordenação-Geral de Apoio Laboratorial (CGAL), resolveu redigir e publicar este Manual de Garantia da Qualidade Analítica. Ele foi elaborado em ampla consonância com as mais recentes versões do Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM) e do Guia sobre Terminologia em Química Analítica do Codex Alimentarius CAC-GL72/2009, assim como com os requisitos das normas ABNT ISO/IEC 17025/2005 Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de Calibração e Ensaio, ISO 11843-1/1997 *Capability of Detection – Part 1: Terms and Definitions*, ISO 11843-2/2000 *Capability of Detection – Part 2: Methodology in the Linear Calibration Case*, e série ISO 5725 Accuracy (Trueness and precision) of method measurements and results.

Assim, o presente Manual foi idealizado e concebido visando fornecer referências conceituais consistentes e pormenorizadas dos critérios analíticos que devem ser observados pelos laboratórios da Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários que prestam serviços ao Plano Nacional de

Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) em Produtos de Origem Animal e Vegetal. Entretanto, esta obra não se circunscreve somente aos laboratórios que trabalham com a determinação de resíduos e contaminantes em alimentos, podendo ser aplicada em diversas áreas da atividade analítica laboratorial.

Elaborado para ser uma ampla fonte de informações, o Manual de Garantia da Qualidade Analítica é dividido em seis partes e 14 anexos, perfazendo um total de 20 seções.

A Parte I apresenta os cuidados gerais que devem ser observados em relação à qualidade analítica das instalações, ao recebimento e guarda das amostras e reagentes e ao desenvolvimento, otimização e condução do processo de validação dos procedimentos analíticos.

A Parte II, juntamente com os anexos nela citados, define e descreve os procedimentos de estimação dos parâmetros de validação para a avaliação do desempenho de um procedimento analítico, estabelecendo os critérios mínimos de aceitação que devem ser atingidos para que um determinado procedimento analítico seja considerado validado.

A Parte III trata da realização dos estudos de estabilidade, essencial para que se possa garantir a qualidade do resultado analítico, estimando o tempo máximo que uma amostra pode aguardar análise sob determinadas condições ou por qual período de tempo uma solução reagente pode ser reutilizada sem comprometer o resultado analítico.

A Parte IV contém informações sobre a rotina analítica e os controles de qualidade analíticos que devem ser utilizados para monitorar as corridas analíticas, permitindo que o analista possa prover evidências seguras de que o sistema analítico está operando sobre controle estatístico de qualidade, dentro de faixas consideradas adequadas ao propósito de uso.

A Parte V descreve os procedimentos que devem ser observados para a inclusão de novos analitos ou matrizes em procedimento já validados para outro(s) analito(s) e matriz(es).

A Parte VI abrange as especificidades inerentes a quatro categorias de analitos: 1) Resíduos de Medicamentos Veterinários; 2) Resíduos de Praguicida (Agrotóxico); 3) Contaminantes Inorgânicos; e 4) Micotoxinas. A proposta é disponibilizar informações minuciosas sobre a determinação desses analitos de maneira concentrada, em uma única seção.

Em relação aos anexos, eles foram elaborados com a finalidade de complementar as informações apresentadas nas seções anteriores, facilitando o entendimento e a utilização deste Manual. Os anexos I a IX e XII trazem os detalhes do tratamento estatístico, incluindo planejamentos fatoriais, necessários para extrair de forma confiável as informações contidas

nos resultados das medições, e subsidiam estatisticamente as tomadas de decisões nos níveis de confiança desejados. O Anexo X traz um extenso glossário dos termos usados no manual, auxiliando na sua leitura. Demos preferência às definições constantes no Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM) ou a aquelas do Codex Alimentarius. Os anexos XI, XIII e XIV apresentam, respectivamente, a bibliografia, uma relação de matrizes representativas e quadros comparativos deste Manual com outros documentos e normas nacionais e internacionais, permitindo uma avaliação de suas correspondências e respectivas abrangências.

Por fim, entendemos que este Manual configura-se como uma ferramenta útil a todos que atuam na área analítica laboratorial, bem como a estudantes e pesquisadores. No entanto, nenhum documento é completo e perfeito, assim, críticas e sugestões de melhoria serão sempre bem-vindas, para que possamos promover o seu contínuo aprimoramento em edições futuras.

*Marcelo Cláudio Pereira
Wellington Ferreira de Magalhães*

PARTE 1

Introdução e Requisitos Gerais

Parte I

Introdução e Requisitos Gerais

I.1 Objetivo

Este Manual foi elaborado com o objetivo de estabelecer parâmetros e critérios de aceitação aplicáveis à validação de métodos analíticos e à rotina analítica dos laboratórios públicos e privados que pertencem ou desejam pertencer à Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários, credenciados ou autorizados a realizar análises para o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes.

A validação dos procedimentos analíticos, segundo os requerimentos deste Manual, visa garantir a qualidade metrológica dos resultados analíticos, conferindo-lhes rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade.

I.2 Responsabilidades

Os parâmetros e critérios descritos neste documento devem ser observados por todos os laboratórios pertencentes à Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários, credenciados para determinação de resíduos e contaminantes em produto de origem animal e vegetal.

O laboratório que pretenda solicitar credenciamento ou ampliação de escopo, na área de resíduos e contaminantes, também deve atender aos requerimentos presentes neste Manual.

Alterações nos procedimentos, parâmetros e critérios estabelecidos poderão ser necessários devido à especificidade de determinados procedimentos analíticos ou peculiaridade do laboratório. Nestes casos, modificações poderão ser consideradas desde que sejam adequadamente justificadas, garantindo sua consistência científica e conceitual com os princípios deste Manual e o não comprometimento da rastreabilidade, da comparabilidade e da confiabilidade dos resultados analíticos gerados.

I.3 Evitando Contaminação

O laboratório e as áreas afins (recepção, armazenamento de amostras, armazenamento de reagentes, lavagem de vidrarias e instrumentos, sala de preparo e extração, descarte em geral) necessitam ser planejados tendo em vista diminuir ao máximo a possibilidade de contaminações.

Procedimentos operacionais devem ser escritos de forma a padronizar todas as operações realizadas, contemplando desde a recepção das amostras até a emissão dos resultados. Sempre que possível, o fluxo de amostras, instrumentos, reagentes e vidrarias deve ser unidirecional.

Reagentes e soluções de altas concentrações devem ser manipulados em locais distintos daqueles onde são preparadas as soluções de baixa concentração. Na impossibilidade deve ser demonstrada, por intermédio de controles, a ausência de contaminação cruzada.

Especial atenção deve ser dispensada ao sistema de exaustão utilizado, de forma a minimizar os riscos de contaminação.

O controle de insetos e roedores, no laboratório e em suas proximidades, somente poderá ser efetuado se devidamente autorizado pelo responsável do laboratório e deve ser feito sob seu controle, de preferência, sem a utilização de substâncias químicas voláteis ou altamente impregnantes.

Artigos de borracha, plásticos e lubrificantes são fontes frequentes de interferência e devem ser usados com cautela. Quando necessário, o selamento de recipientes deve ser feito com PTFE – Politetrafluoroetileno (teflon) ou silicone.

I.4 Padrões de Trabalho (Analíticos), de Referência e MRC

Na validação devem ser utilizados materiais/padrões de referência certificados e homologados pela Farmacopeia Brasileira ou outras instituições competentes, nacionalmente ou internacionalmente reconhecidas.

A utilização de material/padrão de trabalho é permitida, desde que o material/padrão de trabalho seja devidamente rastreável a um material/padrão de referência, que por sua vez tenha sido calibrado com um Material de Referência Certificado (MRC).

Os MRC, materiais/padrões de referência, padrões de trabalho (analíticos) e demais padrões devem ser armazenados em local seco, quando necessário protegido da luz, de preferência em baixas temperaturas e sempre sob condições controladas e monitoradas, visando diminuir as taxas de degradação, contaminação ou perdas por evaporação. As condições de armazenamento prescritas pelos fornecedores dos MRC e demais padrões devem ser estritamente observadas.

I.5 Cadeia de Custódia de Padrões de Trabalho (Analíticos)

Os padrões de trabalho (analíticos) devem possuir cadeia de custódia, para permitir total rastreabilidade sobre seu uso, qualidade, procedência e origem.

As seguintes informações devem constar da cadeia de custódia:

1. Código de identificação (CAS);
2. Identificação da substância (IUPAC, DCB/DCI, nome comum);
3. Procedência;
4. Origem;
5. Prazo de validade;
6. Pureza;
7. Análises suplementares;
8. Quantidade adquirida;
9. Quantidade utilizada e destinação;
10. Quantidade restante;
11. Responsável pelas informações.

I.6 Preparação, Uso e Armazenamento de Soluções Padrão

O processo de preparação das soluções padrão deve ser devidamente registrado, identificando os componentes e as respectivas quantidades. As soluções devem ser devidamente rotuladas e datadas, acondicionadas em recipientes adequados e hermeticamente fechados, para evitar perdas de solventes voláteis e contaminações, e armazenadas à temperatura adequada, se possível entre 10°C e -18°C.

A preparação das soluções padrão deve ser baseada em sua massa, usando balanças com resolução de pelo menos 0,01 mg, deve-se evitar pesar massas de padrões inferiores a 10 mg. A massa de tara (do recipiente de pesagem) nunca deve ser inferior a 0,1 g, massa (carga) mínima de calibração das balanças analíticas, que são balanças da classe I (Portaria Inmetro

nº 236 de 1994), pois elas não podem ser calibradas abaixo de cem vezes a sua divisão de verificação.

Recomenda-se que logo após o seu preparo e acondicionamento em frasco adequado, as soluções padrão sejam pesadas. Recomenda-se que essa pesagem seja refeita antes e após a utilização de qualquer volume dessas soluções. As datas e valores dessas pesagens e os nomes dos técnicos que prepararam ou utilizaram a solução padrão devem ser anotados para controle (cadeia de custódia).

Soluções padrão estoque (de referência) e de trabalho armazenadas devem ser comparadas com soluções recém-preparadas, para se averiguar se há diferenças nas concentrações e, dessa forma, estabelecer o prazo de validade de utilização.

O estabelecimento dos prazos de validade deve fazer parte dos procedimentos de validação do método analítico, caso o laboratório opte por trabalhar com armazenamento de soluções. Admite-se que a determinação do prazo de validade seja conduzida de forma concorrente à rotina analítica.

O laboratório, para preparo de soluções padrão, necessita ser climatizado e todas as operações devem ser realizadas sob uma faixa de temperatura previamente estabelecida.

I.7 Reagentes e suas Soluções

As especificações técnicas dos reagentes analíticos devem ser compatíveis com a finalidade de seu uso, de forma a evitar a ocorrência de contaminações e/ou interações que venham interferir na qualidade dos resultados analíticos.

Os reagentes devem ser preferencialmente armazenados em suas embalagens originais, nas condições preconizadas pelo fabricante. O laboratório deve manter controle efetivo sobre o estoque dos reagentes.

I.8 Recepção, Armazenamento e Preparação de Amostras

As amostras recebidas no laboratório devem ser avaliadas em relação aos aspectos de inviolabilidade e adequabilidade do recipiente de contenção, identificação, conservação e quantidade encaminhada. Estando as amostras de acordo com os requisitos de recepção, elas devem ser

cadastradas e receber um código, numérico ou alfanumérico, o qual será associado, no mínimo, às seguintes informações:

1. Origem;
2. Data de recepção;
3. Estado de conservação;
4. Quantidade;
5. Tipo de amostra (especificação).

Após a recepção, as amostras devem ser encaminhadas para a preparação, antes da análise, ou armazenadas de acordo com as suas peculiaridades e requisitos específicos.

I.9 Desenvolvimento e Otimização do Procedimento Analítico

O desenvolvimento e a otimização de um procedimento analítico não constituem sua validação e sim a precedem, como mostrado na Figura 1. No entanto, quando feito pelo laboratório, essas atividades trazem muita expertise na execução do procedimento analítico e muitas informações úteis para o planejamento e condução da validação.

A validação de um procedimento analítico sem sua prévia otimização intralaboratorial pode resultar no não atendimento aos requisitos de validação, além de perda de tempo, trabalho e recursos do laboratório.

A otimização interna do procedimento analítico inclui as calibrações dos instrumentos de medições, a verificação (qualificação) da adequação dos instrumentos de medições e das instalações do laboratório ao procedimento analítico, bem como a verificação da adequação dos reagentes e demais insumos analíticos, o treinamento dos analistas etc.

Na otimização do procedimento analítico é feito um estudo dos efeitos dos diversos fatores experimentais que podem afetar o resultado analítico, procurando-se estabelecer as condições experimentais que produzam um resultado com acurácia adequados ao propósito de uso do resultado analítico.

O procedimento de otimização pode usar os planejamentos fatoriais sequenciais, a metodologia de análise de superfície de respostas [4,14,29,30] ou os algoritmos ou métodos SIMPLEX [4,29,30,37]. As informações obti-

das durante a otimização do procedimento analítico constituem um estudo prévio de sua robustez.

Quando for necessário desenvolver um procedimento analítico para uma combinação analito-matriz (um dado analito em uma dada matriz) de interesse, podemos iniciar por pesquisar se existe algum procedimento já desenvolvido para aquele analito, ou outra substância com propriedades químicas semelhantes, na matriz de interesse ou em uma matriz semelhante. Caso exista, usamos esse procedimento sem alterações para a análise de um MRC, ou uma amostra de controle, ou uma matriz branca fortificada, da combinação analito-matriz de nosso interesse. Avaliamos então a veracidade e a precisão, i.e., a exatidão ou acurácia desse procedimento. Caso a exatidão do procedimento original não atenda ao propósito de uso, procedemos então a alterações desse procedimento, visando à sua adaptação à combinação analito-matriz de nosso interesse.

Durante o desenvolvimento e a otimização de um procedimento analítico, especial atenção deve ser dada a algumas de suas etapas, como discutido a seguir:

1. No processo de extração, digestão ou abertura a alíquota de amostra utilizada deve ser totalmente desintegrada durante. Excetuando os casos onde isso não é necessário ou é inapropriado (e.g. determinação de resíduos presentes em superfícies).
2. Durante o processo de concentração, especial atenção deve ser dada à etapa de evaporação do solvente, devido ao fato de que alguns analitos podem ser perdidos por arraste. A temperatura de evaporação deve ser a mais baixa possível e um pequeno volume de solvente, com alto ponto de ebulição, deve ser utilizado de forma a minimizar o arraste. Não se recomenda o uso de corrente de ar, pela possibilidade de contaminação, oxidação e introdução de umidade no sistema.
3. A estabilidade do analito sob o processo de extração, no extrato e sob a temperatura do injetor automático deve ser considerada e demonstrada durante o desenvolvimento do método. Caso disponível, a estabilidade do analito poderá ser demonstrada por intermédio da apresentação de trabalhos científicos publicados, os quais deverão ser anexados ao dossiê de validação.

I.10 Validação de Procedimentos Analíticos

A validação é um estudo experimental e documentado que objetiva demonstrar que o procedimento analítico avaliado é adequado à finalidade proposta, de forma a assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos.

É essencial que a validação seja realizada sobre o procedimento analítico exatamente da forma que ele será executado na rotina do laboratório.

O planejamento, a preparação e a execução da validação devem seguir protocolos de validação detalhados contemplando:

1. Adequação ao uso pretendido: finalidade e âmbito de aplicação;
2. Responsável técnico do projeto;
3. Pessoal técnico envolvido com as respectivas responsabilidades;
4. Identificação das unidades, equipamentos/instrumentos utilizados;
5. Procedimento Operacional Padrão (POP) inicial de execução do procedimento analítico para pré-validação;
6. Parâmetros de desempenho e critérios de aceitação;
7. Experimentos de pré-validação e de validação propriamente dita;
8. Características de desempenho dos equipamentos/instrumentos;
9. Qualificação dos materiais (padrões, reagentes, amostras e alíquotas, entre outros);
10. Realização dos experimentos da pré-validação: dados (registros) e conclusão;
11. Realização dos experimentos da validação: dados (registros) e conclusão;
12. POP final e definitivo para a execução do procedimento analítico na rotina;
13. Relatório final de validação.

Em se tratando de método normalizado, os parâmetros críticos (veracidade e precisão) devem ser avaliados com o intuito de demonstrar que os procedimentos preconizados atendem aos critérios de aceitação estabelecidos neste Manual.

Caso sejam realizadas alterações no procedimento normalizado, a validação deverá ser conduzida na extensão necessária. No mínimo, os estudos de veracidade e de precisão deverão ser realizados.

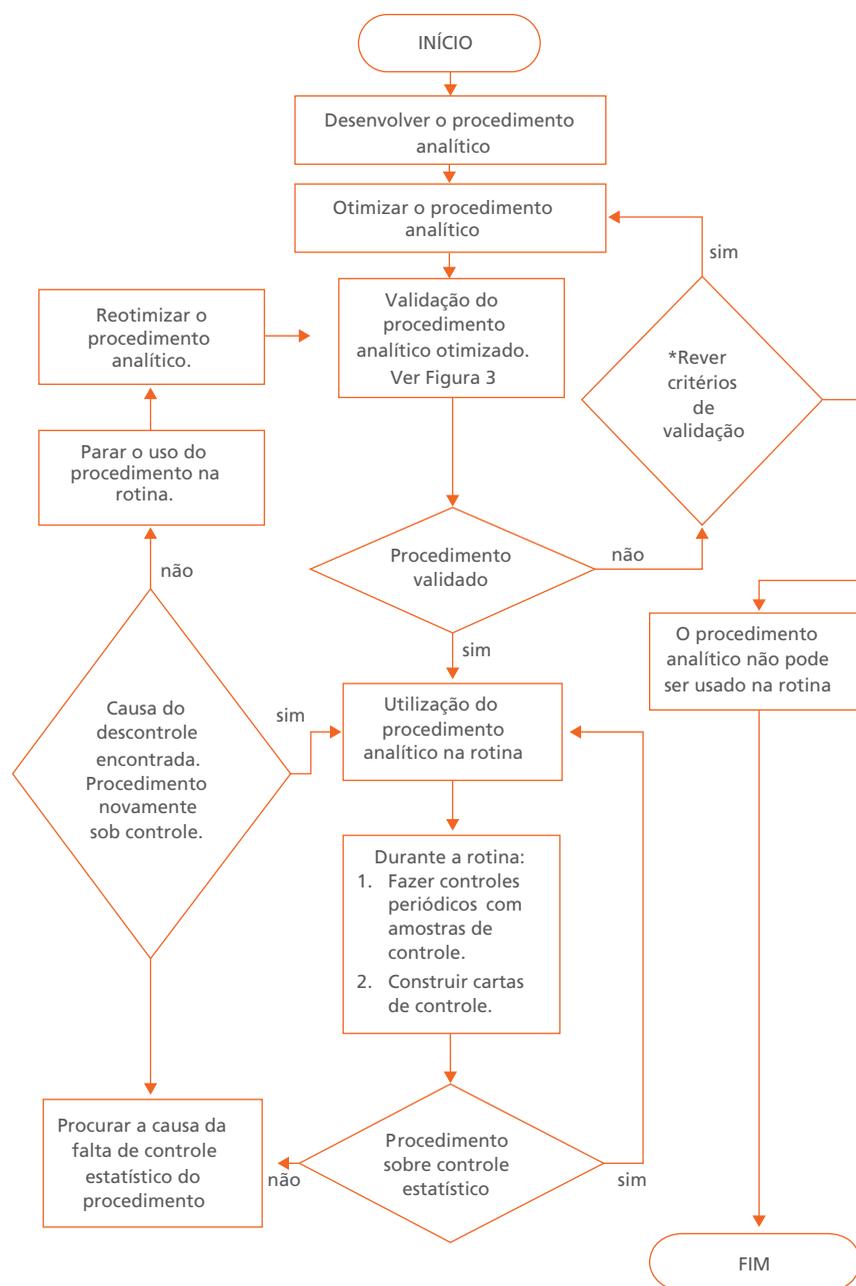
Após o término dos estudos de validação, o laboratório deve deixar **IMEDIATAMENTE DISPONÍVEIS** (o que significa produzir e deixar cópia impressa pronta para ser entregue ao Mapa) os seguintes documentos, os quais comporão o chamado Pacote de Validação do laboratório:

1. O procedimento de validação empregado pelo laboratório nos estudos, escrito na forma de POP ou documento padronizado do laboratório;
2. O respectivo relatório de validação. Neste relatório devem estar claramente descritos os parâmetros de validação estudados e os resultados obtidos, bem como uma avaliação sobre o cumprimento dos critérios de aceitação para cada um dos parâmetros estudados. Salienta-se que o relatório de validação não se resume apenas aos dados brutos, razão pela qual se recomenda a utilização do modelo de relatório de validação estabelecido pela CGAL/SDA;
3. Todos os dados brutos referentes a cada um dos ensaios e parâmetros estudados durante a validação e constantes do respectivo relatório.

Um fluxograma geral, mostrando as etapas de desenvolvimento e otimização do procedimento, sua validação, utilização na rotina de análises e controle estatístico, é mostrado na Figura 1.

Em relação à validação e garantia da qualidade de procedimentos analíticos, recomendamos a leitura e consulta das referências bibliográficas [34] e [57] do anexo XIII as quais, por sua relevância e amplitude, constituem-se em contribuições notáveis a esta área do conhecimento, bem como as referências [10], [15], [16], [29], [33], [34], [35], [36] e [47].

Figura 1 – Delineamento experimental, fluxograma das etapas básicas de desenvolvimento, validação e controle na rotina de um procedimento de análise química



Nota: *Desde que os critérios legais de aceitação estabelecidos sejam atendidos.
Fonte: Adaptado das refs. [15, 34, 57, 58]

I.11 Condições do Processo de Validação

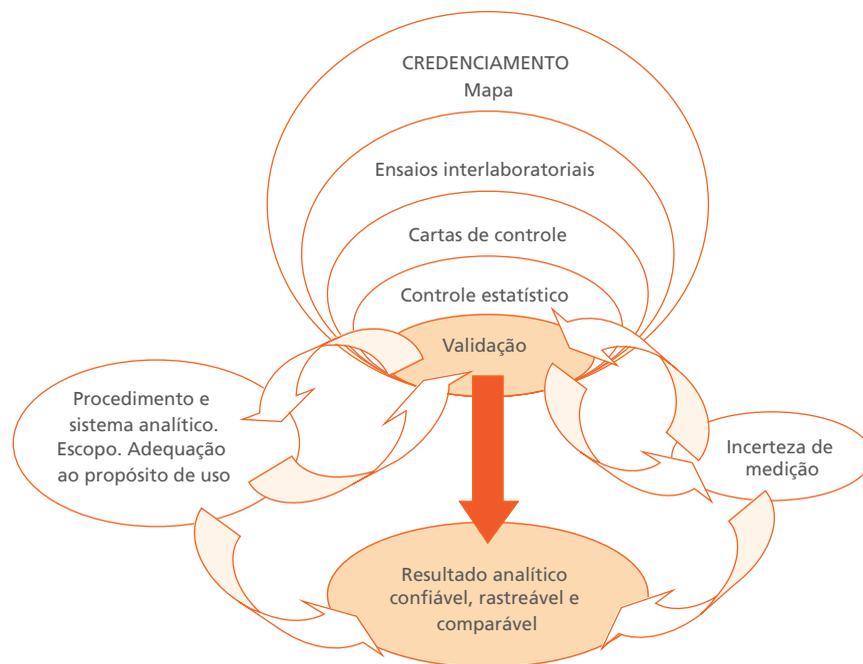
A validação de um procedimento analítico constitui o primeiro nível e primeira ferramenta da garantia da qualidade de um sistema de qualidade laboratorial. Os demais níveis do sistema de qualidade e suas ferramentas são o controle de qualidade interno, a participação em ensaios interlaboratoriais colaborativos e/ou de proficiência, culminando com a acreditação do procedimento analítico validado (Figura 2 [34]).

Para minimizar a carga de trabalho do processo de validação, recomenda-se que seja adotado um planejamento cuidadoso e estatisticamente consistente, que permita combinar ensaios de forma a determinar diferentes parâmetros de validação em um mesmo experimento. A Figura 3 mostra um fluxograma alternativo para a condução do procedimento de validação.

Os experimentos de veracidade e precisão podem ser combinados se um MRC ou outro material de referência ou padrão adequado for utilizado nas análises químicas, para o levantamento desses parâmetros.

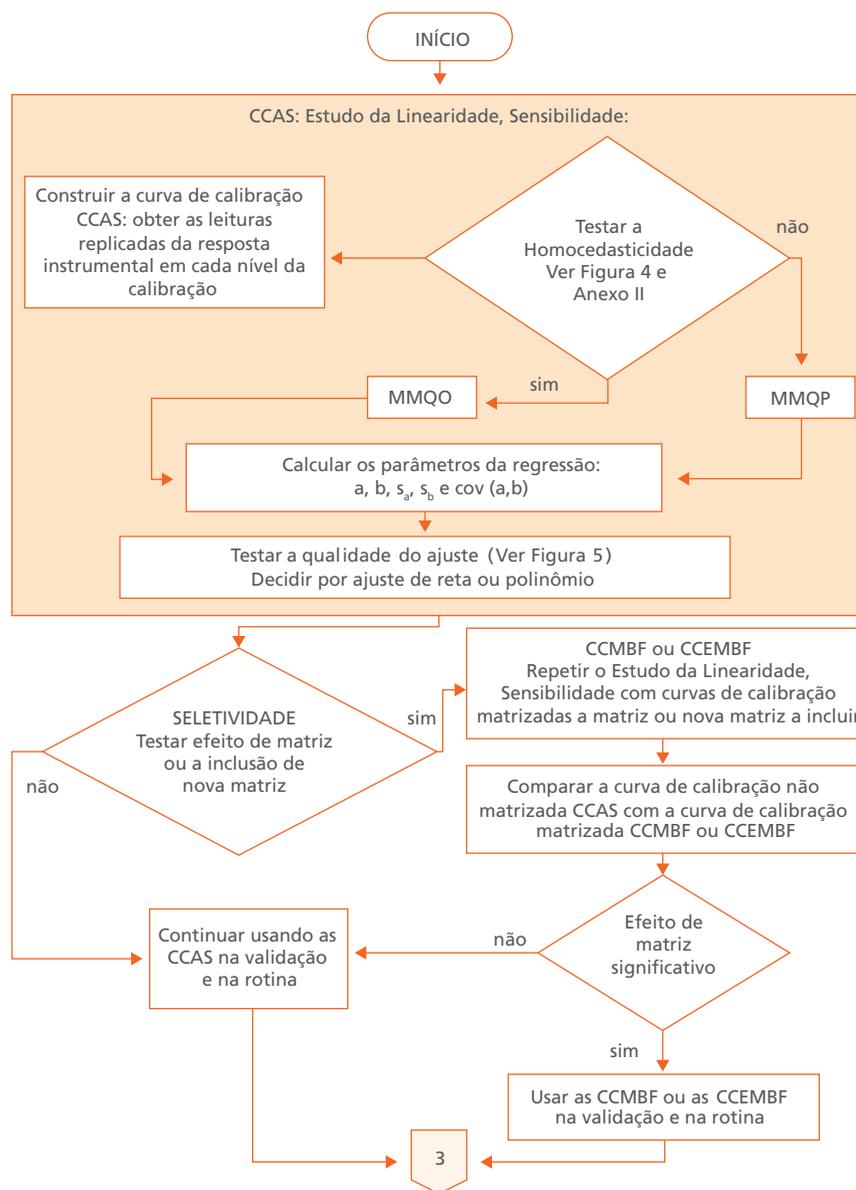
Se o laboratório optar por determinar a repetitividade associada a cada combinação de instrumentos analíticos, analistas, entre outras; o conjunto desses dados também pode ser levado em consideração na estimação da precisão intermediária (reprodutibilidade intralaboratorial).

Figura 2 – A validação de um procedimento analítico no contexto do sistema de gestão da qualidade de um laboratório

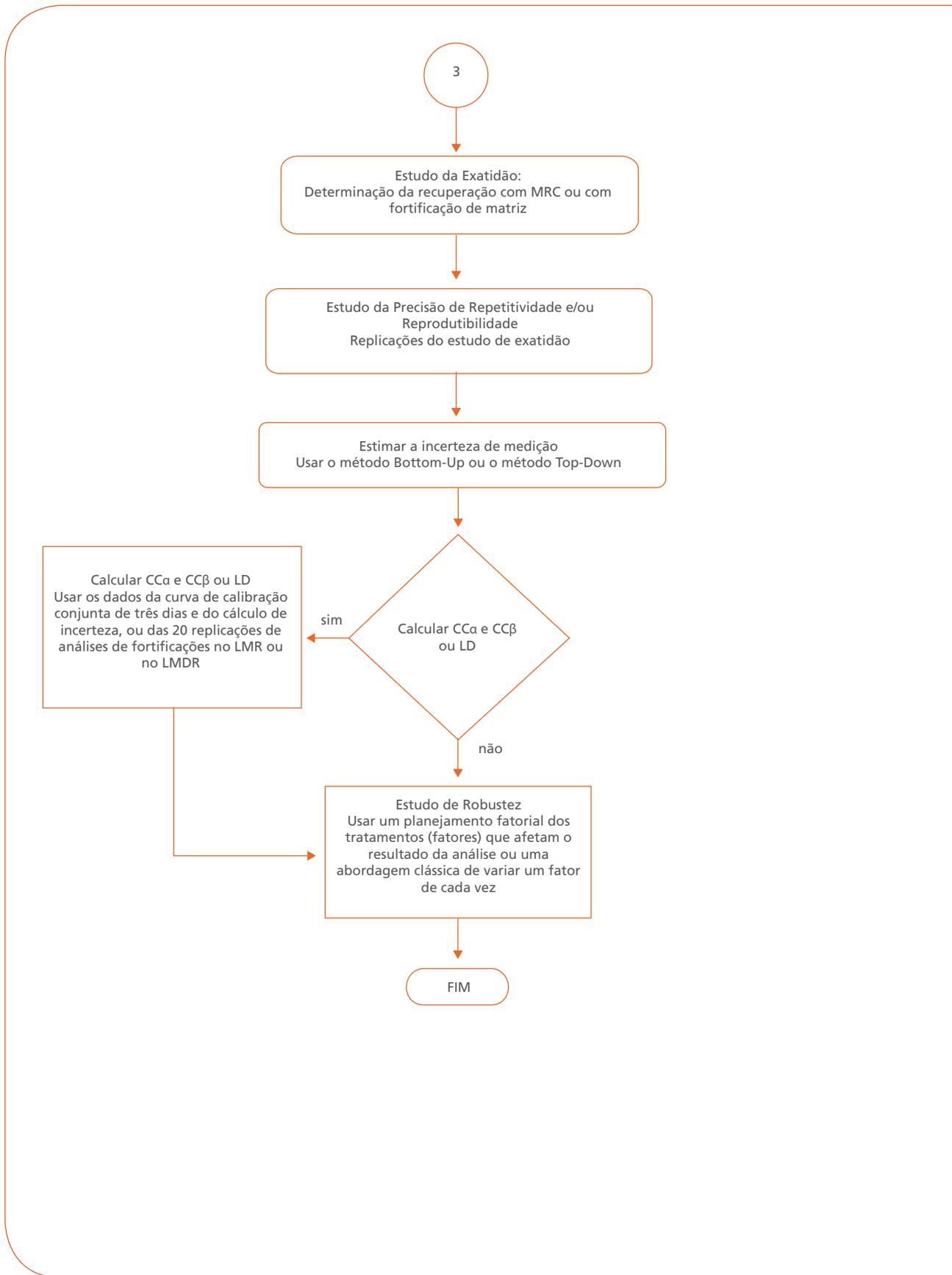


Fonte: Adaptado das refs. [34, 59].

Figura 3 – Conduta do procedimento de validação: delineamento experimental, fluxograma alternativo das etapas de validação



Fonte: Adaptado das refs. [34, 57]



PARTE 2

Parâmetros e Critérios de Aceitação de Desempenho de um Procedimento Analítico

Parte II

Parâmetros e Critérios de Aceitação de Desempenho de um Procedimento Analítico

II.1 Níveis de Interesse Analítico

Os parâmetros e os critérios de validação aplicáveis às determinações dos analitos (resíduos ou contaminantes) devem levar em consideração o nível de concentração de interesse, ou simplesmente o nível de interesse – limite máximo permitido ou limite máximo de resíduo (L) ou teor máximo de contaminante (TMC) ou limite mínimo de desempenho requerido (LMDR), ou o limite de quantificação (LQ) ou semelhantes – no qual alguma decisão será tomada.

Para as substâncias permitidas (toleradas), devem ser levados em consideração os Limites Máximos Permitidos (LMR ou TMC).

Quando não houver LMR ou TMC definidos para os analitos permitidos, deve ser tomado como referência o valor arbitrado estabelecido nas normativas publicadas pela área competente do Mapa.

Para os analitos banidos ou proibidos, os laboratórios devem utilizar como referência – o Limite Mínimo de Desempenho Requerido (LMDR) estabelecido nas normativas específicas.

Quando não houver LMDR definido para o método de quantificação do analito banido ou proibido, deve ser tomado como referência o valor arbitrado estabelecido nas normativas publicadas pela área competente do Mapa.

Alguns requisitos para técnicas específicas como espectrometria de massas (EM) devem ser observados durante o processo de validação de um procedimento analítico. São apresentados, a seguir, critérios de desempenho aplicáveis à técnica de detecção por espectrometria de massas (EM).

II.2 Critérios de Desempenho Aplicáveis à Detecção por EM

Os métodos de espectrometria de massas (EM) são adequados como métodos de confirmação, quando usados após separação cromatográfica.

A detecção por espectrometria de massas deve ser realizada com a utilização de técnicas de EM, tais como: registro de espectro total de massa (varrimento total); monitoramento seletivo de íons (MIS) ou técnicas EM/EM como monitoramento de reações múltiplas (MRM) ou ainda EM/EM combinadas com modos adequados de ionização.

Quando a determinação por EM for efetuada por meio de varrimento total, é obrigatória a presença no espectro de no mínimo quatro íons com intensidades relativas $\geq 10\%$ do pico base. Pelo menos quatro íons devem atender ao critério das tolerâncias máximas permitidas de intensidades relativas de íons, expressas em porcentagem, conforme Tabela 1.

Quando a determinação for efetuada no modo MIS, o íon molecular deve, de preferência, ser um dos íons diagnósticos selecionados; estes não devem ter exclusivamente origem na mesma zona da molécula. A razão sinal/ruído para cada íon diagnóstico deve ser maior ou igual 3:1 e as intensidades relativas de íons devem estar de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 – Tolerâncias máximas permitidas para as intensidades relativas de íons utilizando diversas técnicas analíticas de espectrometria de massas

Intensidade relativa (% do pico de base)	CG-EM (IE)	CG-EM (IQ), CG-EM/EM, LC/EM, CL-EM/EM (relativa)
>50%	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$
20%-50%	$\pm 15\%$	$\pm 25\%$
10%-20%	$\pm 20\%$	$\pm 30\%$
$\leq 10\%$	$\pm 50\%$	$\pm 50\%$

Fonte: Decisão 2002/657/CE Quadro 4 [10].

Deve-se verificar a variabilidade das intensidades relativas dos íons no padrão de calibração e amostras fortificadas.

Sempre que os fragmentos forem medidos com outra técnica que não a do varrimento total, deve-se usar um sistema de pontos de identificação (Tabela 2).

Um mínimo de quatro pontos de identificação é requerido no caso de confirmação de substâncias proibidas e um mínimo de três pontos de identificação para substâncias com Limite Máximo Permitido estabelecido.

Tabela 2 – Pontos de identificação de acordo com a técnica de espectrometria de massas utilizada

Técnica de EM	Pontos de Identificação Obtidos por Íon
Espectrometria de massas de baixa resolução	1,0
Íon precursor (espectrometria de massa de baixa resolução)	1,0
Produtos de transição (espectrometria de massas de baixa resolução)	1,5
Espectrometria de massa de alta resolução	2,0
Íon precursor (espectrometria de massas de alta resolução)	2,0
Produtos de transição (espectrometria de massas alta resolução)	2,0

Fonte: Decisão 2002/657/CE Quadro 5 [10].

Obs.: Cada íon só pode ser contabilizado uma vez. Nos produtos de transição estão incluídos os produtos de segunda e de terceira geração.

A CG-EM com a utilização da ionização por impacto eletrônico é considerada uma técnica diferente da CG-EM que utiliza a ionização química.

Diferentes analitos podem ser utilizados para aumentar o número de pontos de identificação apenas se os derivativos resultarem de reações com mecanismos diferentes.

A Tabela 3 apresenta exemplos de número de pontos de identificação utilizando diferentes técnicas analíticas e suas combinações (n = 1).

Tabela 3 – Pontos de identificação utilizando diferentes técnicas analíticas e suas combinações

Técnica (s)	Fonte de Identificação	Pontos de Identificação
CG-EM (IE ou IQ)	N	n
CG-EM (IE + IQ)	2 (IE) + 2 (IQ)	4
CG-EM (IE) + CG-EM (IQ) (2 derivativos)	2 (Derivativo A) + 2 (Derivativo B)	4
CL-EM	N	n
CG-EM/EM	1 precursor + 2 íons produtos	4
CL-EM/EM	1 precursor + 2 íons produtos	4
CG-EM/EM	2 íons precursores, cada um com um íon produto	5
CL-EM/EM	2 íons precursores, cada um com um íon produto	5
CL-EM/EM/EM	1 precursor, 1 íon produto e 2 íons produtos de primeira geração	5,5
EM de alta resolução	N	2n
CG-EM e CL-EM	2 + 2	4
CG-EM e EM de alta resolução	2 + 1	4

Fonte: Decisão 2002/657/CE Quadro 5 [10].

Nota: n = 1.

Detectors seletivos utilizados em CG ou CL, tais como captura de elétrons (ECD), fotométrico de chama (FPD), de nitrogênio e fósforo (NPD), arranjo de diodos (DAD) e de fluorescência (FL) só oferecem

seletividade limitada. Seu uso, mesmo em combinação com colunas de diferentes polaridades, pode fornecer somente evidência confirmatória limitada.

Essas limitações podem ser aceitáveis para os resíduos frequentemente encontrados, especialmente se alguns resultados forem também confirmados através de uma técnica de detecção mais específica. Tais limitações no grau de confirmação devem ser mencionadas ao se apresentar os resultados da análise.

A Tabela 4 apresenta exemplos de métodos adequados para análise confirmatória de substâncias.

Tabela 4 – Exemplos de métodos adequados para análise confirmatória de substâncias

Técnica (s)	Critério
CG ou LC e EM	Se o número suficiente de íons é monitorado
CL/DAD	Se o espectro UV é característico
CL/FL	Em combinação com outras técnicas
TLC bidimensional (espectro-fotometria)	Em combinação com outras técnicas
CG/ECD, NPD, FPD	Apenas se combinado com duas ou mais técnicas de separação*
Derivatização	Se esta não for o primeiro método de escolha
CL/Imunograma	Em combinação com outras técnicas
CL/UV/VIS (com comprimento de onda único)	Em combinação com outras técnicas

Fonte: Codex Alimentarius Commission – Discussion Paper Methods of Analysis for Residues of Veterinary Drugs in Foods-Cx/Rvdf 10/19/60, April 2010.

Nota: *Outros sistemas cromatográficos (aplicando fases estacionárias ou móveis de diferentes seletividades) ou outras técnicas.

II.3 Curvas de Calibração, Linearidade, Sensibilidade e Faixa de Trabalho (FT)

Linearidade é a capacidade de o método produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

De uma forma mais geral, a linearidade é a capacidade de o procedimento analítico produzir curvas de calibração que podem ser adequadamente ajustadas pela equação de uma reta (função afim).

A sensibilidade do procedimento analítico é principalmente determinada pelo gradiente, a inclinação da curva de calibração. Se a curva de calibração é uma reta, a sensibilidade é constante em toda a faixa de traba-

lho e é determinada, principalmente, pela inclinação b da reta de calibração. Se a curva de calibração não é retilínea, então a sensibilidade será a determinada principalmente pela derivada da curva de calibração. Neste caso, a sensibilidade é variável com a concentração dentro da faixa de trabalho. Um dos fatores que pode reduzir o tamanho da faixa de trabalho é a redução da sensibilidade (inclinação) da curva de calibração em algum de seus extremos (o outro fator é a incerteza de medição, como será discutido na posteriormente na § II.7.2). Por exemplo, se a curva de calibração é um polinômio de segundo grau com concavidade para baixo, então a sensibilidade diminui com o aumento da concentração, e pode ocorrer que acima de uma dada concentração a inclinação da curva se torne muito pequena, tendendo a zero, formando por exemplo um *plateau*. Nesse caso pode ocorrer que a faixa de trabalho vá do limite de quantificação (LQ), em unidades e de concentração do analito na amostra de ensaio (no domínio da amostra de ensaio) até uma dada concentração máxima, que ainda tem incerteza de medição menor que a incerteza máxima aceitável (I_{max}), mas cuja sensibilidade se tornou inaceitavelmente pequena.

Tendo em vista que o objetivo principal das análises realizadas para o PNCRC é avaliar se as amostras estão ou não violadas, a curva de calibração deve ser construída de forma que o limite máximo permitido se encontre preferencialmente próximo da região central da curva de calibração, o centroide, ou próximo do baricentro, dependendo se a curva de calibração é homoscedástica ou heterocedástica, respectivamente.

No caso de substâncias banidas, o LMDR deve estar contemplado na curva de calibração.

II.3.1 Procedimento de Estimação e Critérios de Aceitação da Curva de Calibração e da Linearidade

Três são os tipos possíveis de curva de calibração que podem ser elaboradas:

1. CCAS – Curva de Calibração do Analito em Solução: construída a partir dos padrões de calibração do analito puro em solvente. Este tipo de curva de calibração somente poderá ser utilizado se comprovada a inexistência do efeito de matriz.
2. CCMBF – Curva de Calibração da Matriz Branca Fortificada: construída a partir da matriz branca fortificada com os padrões de calibração do analito puro.
3. CCEMBF – Curva de Calibração do Extrato da Matriz Branca Fortificada: construída a partir do extrato da matriz branca fortificada com os padrões de calibração do analito puro.

De uma forma geral, o planejamento de elaboração da curva analítica deve contemplar os seguintes critérios:

O número de níveis de concentração das soluções padrão de calibração, designado por I , deve ser no mínimo cinco, $I \geq 5$.

Cada i -ésimo nível de concentração deve ter sua solução preparada independentemente no mínimo três vezes, $J \geq 3$. Isso resultará em um número total N_x de soluções de calibração independente igual a $N_x = I \times J$.

Cada uma das N_x soluções de calibração deve ser medida (injetada, apresentada) no instrumento de medição analítica um número L de vezes. Isso resultará em um número total de leituras da resposta instrumental igual a $N_y = I \times J \times L = N_x \times L$. Se $L = 1$ então $N_x = N_y$.

1. O número total de respostas instrumentais N_y deve ser igual ou superior a 30 ($N_y \geq 30$).
2. Todas as N_y leituras instrumentais devem ser feitas aleatoriamente.

Dessa forma, as curvas analíticas devem ser obtidas a partir de, no mínimo, cinco níveis ($I \geq 5$) de concentração, preferencialmente distribuídos de forma equidistante, se as respostas instrumentais forem homoscedásticas.

Todos os i -ésimos níveis de concentração da curva de calibração devem ser preparados em pelo menos três réplica ($J \geq 3$). Cada j -ésima réplica da i -ésima concentração deve ser lida (injetada, inserida, apresentada, colocada) no instrumento de medição analítica no mínimo uma vez ($L \geq 1$).

As J replicatas de cada nível de concentração devem ser replicatas independentes, e não somente subalíquotas de uma mesma solução de calibração. Isso significa que as J soluções padrão de uma mesma concentração devem ser preparadas independentemente e injetadas no instrumento de medição analítica L vezes cada ($L \geq 1$).

As leituras (medidas instrumentais das soluções padrão de calibração) devem ser feitas em ordem aleatória, inclusive as leituras das soluções padrão de calibração de mesma concentração, adotando-se os devidos cuidados para evitar contaminações cruzadas.

Os ajustes das curvas de calibração *não* devem ser forçados a passar pela origem (pelo zero).

Se os desvios-padrão de repetitividade da resposta instrumental em cada nível de concentração (s_{y_i}) da curva de calibração não forem estatisticamente iguais, sugerindo heterocedasticidade, significa que os dados da

calibração devem ser tratados pelo Método dos Mínimos Quadrados Ponderados (MMQP) – ver Anexo VI.

No caso de homoscedasticidade podem ser usados ambos os Métodos dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO) – ver Anexo I – ou o MMQP. Observação: o MMQO é um caso particular do MMQP, assim no caso de homoscedasticidade ambos os métodos levam ao mesmo resultado.

No entanto, como o MMQO é um caso particular do MMQP, a utilização deste último é sempre correta e recomendada, eliminando, no caso, a necessidade de se fazer o teste de homoscedasticidade da curva de calibração.

Em ambos os casos, os parâmetros da reta de calibração – o intercepto e a inclinação – devem ser estimados, assim como suas incertezas (desvios-padrão), s_a e s_b , respectivamente, e a covariância, $s_{ab}^2 = \text{cov}(a,b)$, entre eles.

A faixa linear de trabalho deve compreender os valores de LMR ou LMDR por meio da equivalência funcional estabelecida pela curva de calibração.

A avaliação dos parâmetros ajustados da curva de calibração, de sua qualidade e da linearidade deve ser conduzida conforme indicado do Anexo I ao Anexo VI e nos fluxogramas das figuras 4 e 5.

Caso seja verificado que a curva de calibração não é estatisticamente bem representada por uma reta (função afim), pode-se proceder ao ajuste da curva de calibração outras funções, incluindo os polinômios de ordem superior a um (curva de calibração polinomial). Deve-se evitar polinômios de graus altos. Polinômios de até terceiro grau devem satisfazer a quase totalidade das situações experimentais.

A solução analítica geral para a regressão de polinômios de grau um (reta), grau dois (parábola) ou graus maiores pelos métodos dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO) ou Ponderados (MMQP) ou Generalizados (MMQG) envolve cálculo matricial [29,31,48,49,50,51]. Ela é mais complexa, mas perfeitamente factível em qualquer computador pessoal. Com essa solução analítica, além de obter os valores dos parâmetros ajustados, tem-se também a matriz das variâncias e covariâncias dos parâmetros ajustados. Os elementos dessa matriz são usados na lei de propagação das incertezas para se estimar a incerteza de calibração na concentração do analito interpolada na curva de calibração.

Figura 4 – Ajuste da curva de calibração da resposta instrumental (RI) versus a concentração das soluções padrão de calibração. Procedimento para a escolha da regressão pelo MMQO ou pelo MMQP. Estimativa dos parâmetros de ajuste suas incertezas e covariâncias. Avaliação da qualidade dos dados e do modelo ajustado por inspeção visual (gráfica) dos resíduos e tratamento de valores extremos (espúrios, duvidosos, aberrantes, outliers) – Continua na Figura 5

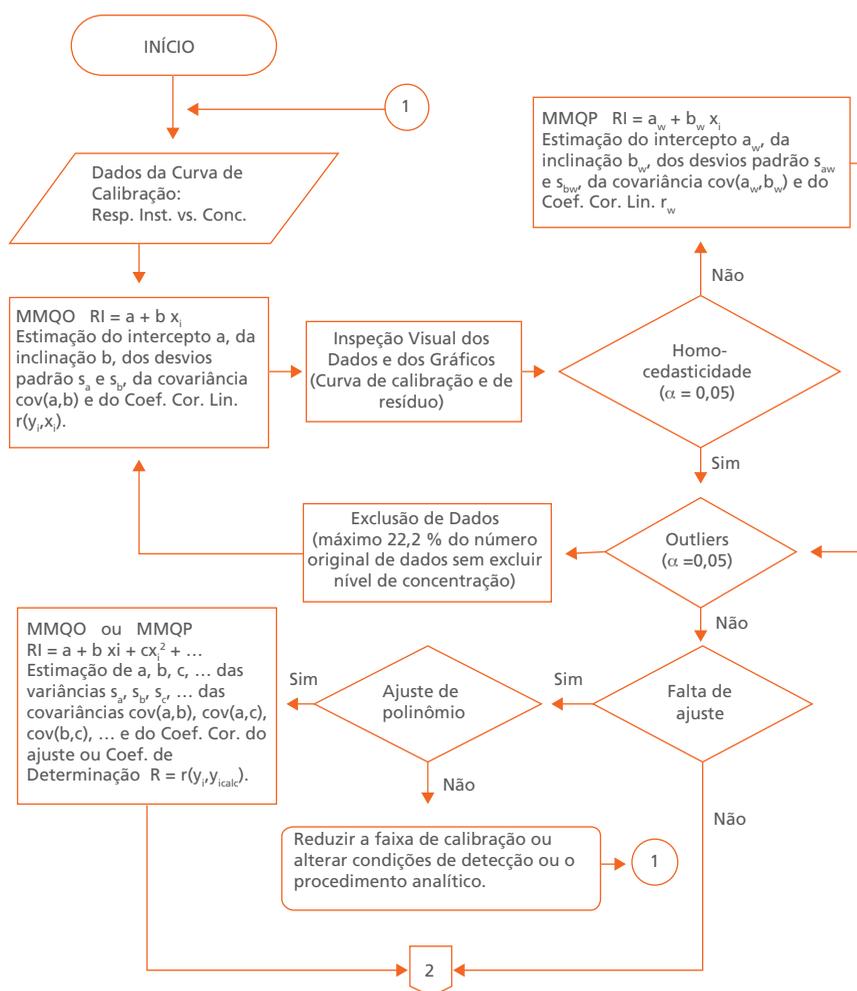
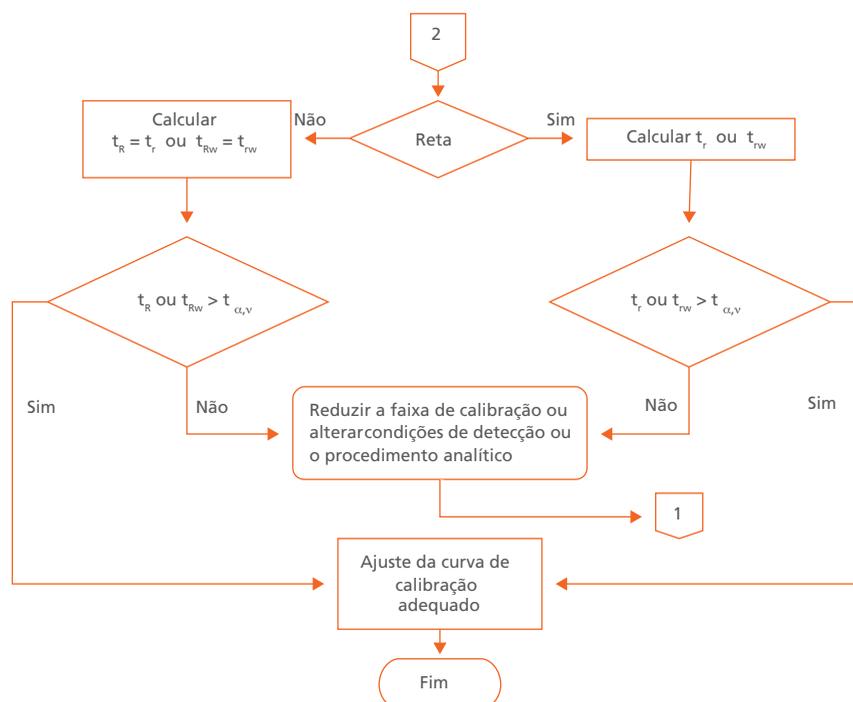


Figura 5 – Avaliação da qualidade do ajuste: Teste r para a linearidade entre x e y no caso da reta. Teste de r para a linearidade entre y e y_{calc} no caso de ajuste polinomial



II.4 Seletividade e Efeito Matriz

A seletividade é a extensão na qual um procedimento analítico pode determinar analito(s) particular(es) em mistura(s) ou matriz(es) sem a interferência de outros componentes de comportamento semelhante. Portanto, é a capacidade do procedimento analítico de discriminar entre a substância a analisar e substâncias análogas (isômeros, metabólitos, produtos de degradação, substâncias endógenas, componentes da matriz, isóbaros e componentes que possam gerar interferência poliatômica, entre outras).

A verificação da seletividade do procedimento analítico deve ser realizada a partir da comparação entre os sinais (resposta instrumental) advindos do processamento da matriz, do extrato/digerido da matriz fortificada e do analito puro em solvente.

Algumas técnicas instrumentais, como espectrometria de massas acoplada à cromatografia, podem ser altamente seletivas, garantindo uma identificação inequívoca do analito e nenhum ou quase nenhum efeito de matriz.

Efeito Matriz é um estudo de seletividade que objetiva averiguar possíveis interferências causadas pelas diversas substâncias que compõem a matriz amostral, gerando, basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal instrumental ou resposta instrumental.

O estudo de efeito matriz não necessita ser realizado no caso de se utilizar uma curva de calibração CCMBF E CCEMBF.

II.4.1 Procedimento de Determinação do Efeito Matriz

Preparar uma curva de calibração CCAS com no mínimo cinco níveis I de concentração ($I \geq 5$), usando soluções padrão de calibração, não matrizadas, de analito puro em solvente puro.

Analisar, usando a CCAS, amostras elaboradas no mínimo em três níveis de fortificação, de tal forma que o limite permitido se encontre preferencialmente na região central dos níveis. Um mínimo J de seis réplicas ($J \geq 6$) por nível de fortificação de:

1. Analito em solvente puro (amostra não matrizada);
2. Analito em matriz branca ou em extrato/digerido de matriz branca (amostra matrizada).

Após as análises replicadas dessas amostras matrizadas e não matrizadas, realizadas usando a CCAS, proceder à avaliação dos resultados das concentrações do analito obtidas nas várias fortificações analisadas como indicado a seguir.

II.4.2 Procedimentos de Avaliação e Critérios de Aceitação do Efeito Matriz

Utilizando os dados obtidos dos experimentos, usando a CCAS, de análise do analito em solvente e dos extratos/digeridos de matriz branca fortificados: aplicar o teste F (Fischer-Snedecor), de homogeneidade de variâncias, para verificar se as variâncias das amostras não matrizadas e matrizadas podem ser consideradas estatisticamente iguais, em cada nível i de fortificação.

Para tanto, aplicam-se os seguintes cálculos para cada nível i de concentração (fortificação), comparando-se amostras não matrizadas com aquelas matrizadas:

$$F_{calc,i} = \frac{s_{i,1}^2}{s_{i,2}^2} \quad (1)$$

Onde:

- $s_{i,1}^2$ e $s_{i,2}^2$ são as variâncias das sextuplicatas das amostras não matrizadas e matrizadas, em cada nível de concentração, com a maior variância no numerador.

Ao mesmo tempo, obtém-se o valor crítico tabelado de $F_{crit,\alpha,\nu_1,\nu_2}$ com $\nu_{i,1} = n_{i,1} - 1 \geq 5$ graus de liberdade no numerador e $\nu_{i,2} = n_{i,2} - 1 \geq 5$ graus de liberdade no denominador. Adotar um nível de significância $\alpha = 0,05$ (5%) ou nível de confiança $1 - \alpha = 0,95$ (95%).

Se em um dado nível de concentração i o valor de $F_{calc,i}$ for menor que o $F_{crit,\alpha,\nu_1,\nu_2}$, as variâncias desse nível de concentração podem ser consideradas iguais, ou seja, a matriz não tem efeito importante sobre a precisão do método nesse nível de fortificação i considerado. Nesse caso, os desvios-padrão desses dois grupos de análises podem ser agrupados e a igualdade das médias dos dois conjuntos de amostras pode ser testada com a distribuição t de Student: comparação das médias de concentração do nível i .

Desse modo, calculam-se:

1. $\bar{x}_{i,1}$ e $\bar{x}_{i,2}$ = médias das concentrações do analito em amostras "com matriz" (extrato/digerido de matriz branca fortificado) e "sem matriz" (analito puro em solvente puro), respectivamente, em cada nível de concentração (fortificação).
2. $s_{i,1}$ e $s_{i,2}$ = desvios-padrão das concentrações do analito no i -ésimo nível de fortificação.
3. O valor da estatística $t_{calc,i}$:

$$t_{calc,i} = \frac{|\bar{x}_{i,1} - \bar{x}_{i,2}|}{\sqrt{s^2 \left(\frac{1}{n_{i,1}} + \frac{1}{n_{i,2}} \right)}} \quad (2)$$

Onde:

$$s^2 = \frac{(n_{i,1} - 1)s_{i,1}^2 + (n_{i,2} - 1)s_{i,2}^2}{(n_{i,1} + n_{i,2} - 2)} \quad (3)$$

- $n_{i,1}$ e $n_{i,2}$ = são os números de replicatas nas amostras 1 e 2 (não matrizada e matrizada ou vice-versa).

O valor crítico tabelado de $t_{\text{crit},\alpha,\nu}$ é obtido, para cada nível i , a partir da tabela da distribuição de Student para ($\nu_i = n_{i,1} + n_{i,2} - 2$) graus de liberdade e nível de significância $\alpha = 0,05$ (5%) ou nível de confiança $1 - \alpha = 0,95$ (95%).

Se em um dado nível de concentração i o valor de $F_{\text{calc},i}$ for maior que o $F_{\text{crit},\alpha,\nu_1,\nu_2}$, as variâncias não podem ser consideradas estatisticamente iguais no nível de fortificação i considerado. Verifica-se então o efeito de matriz com a distribuição t de Student, usando a seguinte equação:

$$t_{\text{calc},i} = \frac{|\bar{x}_{i,1} - \bar{x}_{i,2}|}{\sqrt{\frac{S_{i,1}^2}{n_{i,1}} + \frac{S_{i,2}^2}{n_{i,2}}}} \quad (4)$$

Neste caso, para a obtenção do valor crítico tabelado $t_{\text{crit},\alpha,\nu'}$ o número de graus de liberdade para cada nível i é igual a:

$$\nu_i = \frac{\left(\frac{S_{i,1}^2}{n_{i,1}} + \frac{S_{i,2}^2}{n_{i,2}} \right)^2}{\frac{\left(\frac{S_{i,1}^2}{n_{i,1}} \right)^2}{n_{i,1} + 1} + \frac{\left(\frac{S_{i,2}^2}{n_{i,2}} \right)^2}{n_{i,2} + 1}} - 2 \quad (5)$$

Se o valor de $t_{\text{calc},i}$ calculado pela eq. (2) ou pela eq. (4), conforme o caso, for menor que o $t_{\text{crit},\alpha,\nu'}$ pode-se concluir que a matriz não afeta o ensaio no i -ésimo nível de fortificação.

Se o valor de $t_{\text{calc},i}$ calculado pela eq. (2) ou pela eq. (4), conforme o caso, for maior que o $t_{\text{crit},\alpha,\nu'}$ pode-se concluir que a matriz tem um efeito estatisticamente significativo sobre o resultado.

Para aceitação da não existência de efeito matriz, não deve haver efeito matriz em nenhum nível de concentração das fortificações.

II.4.3 Procedimento Alternativo para Determinação do Efeito Matriz

Outro procedimento, mais simples, para verificar a existência do efeito de matriz, consiste em comparar os interceptos e as inclinações de um par de curvas de calibração.

As curvas de calibração devem ser construídas a partir de soluções de calibração de analito puro em solvente puro (CCAS) e de soluções de

calibração matrizadas obtidas da fortificação de extrato/digerido de matriz branca (CCEMBF).

Ambas as curvas de calibração devem contar com no mínimo cinco ($I \geq 5$) níveis de concentração, um mínimo de três ($J \geq 3$) reparos independentes das soluções de calibração e $N_y \geq 30$.

As comparações estatísticas dos pares de interceptos e inclinações são feitas como mostrado na Parte V– *Ampliação do Escopo do Procedimento Analítico Validado: Inclusão de Analito ou Matriz em Procedimento Analítico Validado*.

Caso os resultados desses procedimentos indiquem a presença de efeito matriz, o analito deve ser quantificado na rotina, adotando-se uma das possibilidades a seguir:

1. Usar soluções de calibração obtidas de material de referência certificado.
2. Usar soluções de calibração obtidas da matriz branca fortificada ou extrato de matriz branca fortificado com o analito.
3. Promover mudanças no procedimento analítico de forma a eliminar o efeito de matriz, alterando, por exemplo, o pré-tratamento da amostra ou a separação do analito ou as condições e a detecção do analito.
4. Analisar as amostras de ensaio pelo método de adição.

II.5 Veracidade/Recuperação

O vocabulário internacional de metrologia define a veracidade como: “grau de concordância entre a média de um número infinito de valores medidos repetidos e um valor de referência”.

A veracidade é a concordância entre a média de um número suficientemente grande de resultados de um ensaio e o valor de referência aceito convencionalmente como verdadeiro.

A veracidade está inversamente relacionada ao erro sistemático ou à correção ou ao fator de correção.

A determinação da veracidade deve ser feita por intermédio de ensaios de recuperação utilizando-se material de referência certificado – MRC. Caso não haja MRC disponível, a determinação da recuperação deve ser feita por intermédio de matriz branca fortificada. Na falta de uma matriz branca pode-se usar uma amostra de ensaio com baixa concentração do analito.

Não se deve confundir a recuperação com a eficiência de extração ou de digestão da amostra. A recuperação mede a tendência total do procedimento analítico e, portanto, é uma expressão de sua veracidade.

A recuperação tem por objetivo corrigir o resultado da análise dos erros sistemáticos oriundos dos efeitos de extração ou digestão e das perdas advindas de todas as etapas da marcha analítica, realizadas até a leitura da resposta instrumental, tais como limpeza (*clean-up*), diluições ou pré-concentração, derivatizações, secagens.

Para corrigir o resultado pela recuperação, pode-se usar o fator de recuperação, f_{rec} , cujo inverso é o fator de correção de recuperação, $FC_{rec} = 1/f_{rec}$, e é, portanto, um fator multiplicativo; ou usar uma correção de recuperação, C_{rec} , que é uma parcela aditiva.

O fator de recuperação f_{rec} , ou o fator de correção da recuperação FC_{rec} ou a correção de recuperação C_{rec} deve ser inserido na função de medição (modelo de medição) ou equação do mensurando para fins da estimação da incerteza de medição, mesmo se a correção de recuperação não for efetuada.

II.5.1 Procedimento de Determinação da Veracidade/ Recuperação

Analisar seis réplicas de Material de Referência Certificado (MRC) ou de matriz branca, antes e após fortificação com os padrões de calibração, em no mínimo três níveis de concentração (alta, média e baixa).

Para as substâncias permitidas, os limites de interesse estabelecidos (LMR/TMC) devem se encontrar preferencialmente na região central dos níveis de concentração da curva de calibração.

Para as substâncias banidas, o LMDR deve estar próximo ao Menor Nível Calibrado (MNC).

Quando a recuperação é obtida a partir de fortificações de matriz branca, o fator de recuperação f_{rec} é calculado pela equação:

$$f_{rec} = \frac{c_f - c_{nf}}{c_{ad}} \times 100 \quad (6a)$$

Onde:

- c_f = teor medido após fortificação da matriz branca;
- c_{nf} = teor medido na matriz branca não fortificada, *i.e.*, antes da fortificação;

- c_{ad} = teor do analito puro adicionado à matriz branca.

Quando a recuperação é obtida a partir do uso do MRC, o fator de recuperação é calculado por meio da equação:

$$f_{rec,MRC} = \frac{c_{med}}{c_{MRC}} \times 100 \quad (6b)$$

Onde:

- c_{med} = teor medido na análise do MRC;
- c_{MRC} = teor declarado no certificado do MRC.

Dependendo se o estudo de determinação da recuperação foi feito com Matriz branca fortificada ou com MRC, a correção de recuperação C_{rec} é calculada pelas seguintes equações, respectivamente:

$$C_{rec} = C_{nf} + C_{ad} - C_f \quad (6c)$$

$$C_{rec,MRC} = C_{MRC} - C_{med} \quad (6d)$$

Para corrigir o resultado usando o fator de recuperação, multiplica-se o resultado não corrigido pelo fator de correção de recuperação, igual ao inverso do fator de recuperação. Independentemente se o fator de recuperação foi obtido através de fortificação ou com MRC:

$$FC_{rec} = 1/f_{rec} \quad \text{ou} \quad FC_{rec} = 1/f_{rec,MRC} \quad (6e)$$

Calcular o fator recuperação médio e/ou a correção de recuperação média e o coeficiente de variação (CV) em cada nível de concentração do estudo de veracidade/recuperação.

II.5.2 Critérios de Aceitação da Veracidade/Recuperação

A veracidade do procedimento analítico medida pela eq. (6a) ou eq. (6b) deve estar compreendida dentro de intervalos especificados por norma, legislação específica, contrato com o cliente, ou na falta desses, especificados internamente no laboratório ao redor de 100%, de acordo com as respectivas faixas de concentrações. Excepcionalmente, valores fora das faixas especificadas poderão ser aceitos desde que devidamente justificados.

A Tabela 5 apresenta os critérios de aceitação para a veracidade, aplicáveis à análise de resíduos e contaminantes em produtos de origem animal.

Tabela 5 – Faixas de Aceitação do Fator de Recuperação acima e abaixo de 100%

Concentração (C)	Intervalos (%)
$c \leq 1 \mu\text{g/kg}$	-50 % a +20%
$1 \mu\text{g/kg} < c < 10 \mu\text{g/kg}$	-30 % a +10 %
$c \geq 10 \mu\text{g/kg}$	-20 % a +10 %

Fonte: Decisão 2002/657/CE, Quadro 2.

II.6 Precisão

É a estimativa da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas.

As três maneiras de expressá-la são por meio da repetitividade, da precisão intermediária (ou reprodutibilidade interna ou reprodutibilidade intralaboratorial) e da reprodutibilidade. Sendo que a reprodutibilidade de um procedimento analítico somente pode ser estimada mediante a participação de um ensaio interlaboratorial colaborativo (EC), raramente disponível.

II.6.1 Repetitividade

É a precisão intracorrida, ou seja, é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas, efetuadas sob as mesmas condições de medição (ver definições no Anexo X).

II.6.2 Precisão Intermediária ou Reprodutibilidade Intralaboratorial

Também denominada reprodutibilidade interna, refere-se à precisão intermediária avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, mesmo laboratório, mas alterando algumas condições, tais como: dias de análise, analistas, equipamentos e condições ambientais, entre outras, se necessário.

II.6.3 Procedimento de Determinação da Repetitividade

Preparar e analisar um conjunto de amostras constituídas de matrizes brancas fortificadas ou de MRCs, no mínimo em três níveis de concentração, com as substâncias a analisar, de tal forma que os limites permitidos se encontrem preferencialmente na região central dos níveis de concentração e o LMDR seja contemplado, conforme se trate de substâncias permitidas ou banidas.

Para cada nível, a análise deve ser realizada em, pelo menos, seis réplicas independentes.

Calcular a concentração determinada para cada amostra replicada.

Calcular as concentrações médias, os desvios-padrão de repetitividade (s_r) e os coeficientes de variação de repetitividade (%) das amostras fortificadas em cada nível de concentração.

II.6.4 Procedimento de Determinação da Precisão Intermediária ou Reprodutibilidade Intralaboratorial

Preparar e analisar um conjunto de amostras constituídas de matrizes brancas fortificadas ou de MRCs, no mínimo em três níveis de concentração, com as substâncias a determinar, de tal forma que os limites permitidos se encontrem preferencialmente na região central dos níveis e concentração e o LMDR seja contemplado, conforme se trate de substâncias permitidas ou banidas.

Para cada nível de concentração, a análise deve ser realizada em, pelo menos, seis réplicas independentes.

Repetir estes passos pelo menos mais duas vezes em dias diferentes, variando sempre que possível os operadores, os instrumentos, as condições ambientais, lotes de reagentes e solventes, entre outros fatores experimentais. Assim o estudo da precisão intermediária constitui-se essencialmente de repetidos estudos de repetitividade em diferentes condições experimentais dentro de um laboratório.

Calcular a concentração detectada para cada amostra replicada.

Calcular a concentração média, os desvios padrão de reprodutibilidade (s_R) e os coeficientes de variação para cada nível de concentração das amostras fortificadas, combinando todos os resultados de cada nível.

II.6.5 Critérios de Aceitação da Precisão

Em condições de repetitividade, o coeficiente de variação deve tipicamente situar-se abaixo de dois terços dos valores apresentados na Tabela 6 conforme a faixa de concentração.

No caso de análises repetidas de uma amostra em condições de reprodutibilidade intralaboratorial, o coeficiente de variação intralaboratorial da média não deve exceder aos valores da Tabela 6.

Tabela 6 – Critérios de Aceitação da Reprodutibilidade

Concentração (c)	Coefficiente de Variação (CV) (%)
$c < 1 \mu\text{g/kg}$	35
$1 \mu\text{g/kg} \leq c < 10 \mu\text{g/kg}$	30
$10 \mu\text{g/kg} \leq c < 100 \mu\text{g/kg}$	20
$100 \mu\text{g/kg} \leq c < 1 \text{ mg/kg}$	15
$1 \text{ mg/kg} \leq c < 10 \text{ mg/kg}$	10
$10 \text{ mg/kg} \leq c < 100 \text{ mg/kg}$	7,3
$100 \text{ mg/kg} \leq c < 1 \text{ g/kg}$	5,3
$1 \text{ g/kg} \leq c < 10 \text{ g/kg}$	3,7
$10 \text{ g/kg} \leq c < 100 \text{ g/kg}$	2,7
$100 \text{ g/kg} \leq c < 1 \text{ kg/kg}$	2,0

Nota: $CV = u_c(c_{anal})/c_{anal}$, isto é, o coeficiente de variação é igual à incerteza combinada da concentração do analito dividido pela própria concentração do analito.

II.7 Limites de Detecção (LD), Limite de Quantificação, (LQ), Limite de Decisão ($CC\alpha$) e Capacidade de Detecção ($CC\beta$)

II.7.1 Limite de Detecção (LD)

Esse termo é definido no VIM como: “Valor medido, obtido por um dado procedimento de medição, para o qual a probabilidade de declarar falsamente a ausência de um componente em um material é β , sendo α a probabilidade de declarar falsamente a sua presença” (ver Anexo X).

Essa definição é completamente equivalente à definição de limite mínimo detectável da variável líquida de estado da norma ISO 11843 [24, 25] e com a definição de Capacidade de Detecção ($CC\beta$) para substâncias banidas da Decisão 2002/657/CE [10].

Assim, o valor de $CC\alpha$ calculado no nível de concentração zero (como no caso de uma substância banida) é o limite de detecção, mesmo para as substâncias toleradas, e essa é a abordagem que recomendamos.

II.7.2 Limite de Quantificação (LQ)

O VIM não define esse termo. Várias definições e diferentes procedimentos são apresentados na literatura e em diferentes normas internacionais (ver Anexo X).

A grande maioria das definições de LQ da literatura é consistente com a seguinte definição: “O limite de quantificação é a menor concentra-

ção ou teor que pode ser quantificada com a maior incerteza aceitável ou Incerteza Máxima Aceitável (I_{max})”.

Portanto, para se determinar o LQ é preciso estabelecer primeiramente, seja por lei ou resolução legal de organismo normalizador nacional, por norma nacional ou internacional, por acordo contratual ou informal com o cliente ou, na falta das alternativas anteriores, por decisão interna do laboratório, qual é a I_{max} para cada combinação analito-matriz do escopo analítico. Essa abordagem é por critério ou baseada nos riscos.

Para calcular o LQ usando a Incerteza Máxima Aceitável, procede-se ao cálculo da incerteza da medição analítica, conforme mostrado na seção 8 – *Incerteza de Medição Analítica*, da Parte II, para concentrações cada vez mais baixas do analito, a partir do nível mais baixo calibrado, até se encontrar a concentração que atinge a I_{max} .

Esse mesmo procedimento pode ser usado para estabelecer o limite superior de concentração ($c_{sup, I_{max}}$), acima do nível mais alto calibrado, a partir do qual a I_{max} é ultrapassada. Lembrar que a incerteza de medição sempre aumenta à medida que nos distanciamos do baricentro da curva de calibração. Dessa forma é possível estabelecer uma “faixa de trabalho” usando critérios estatísticos e metrológicos. Nesse sentido, a faixa de trabalho (FT) é estatisticamente definida pelo intervalo de concentração dentro do qual a incerteza de medição é inferior ou igual à Incerteza Máxima Aceitável (I_{max}):

$$LQ \leq FT \leq c_{sup, I_{max}}$$

Os conceitos de limite de decisão e limite mínimo detectável da variável líquida de estado foram introduzidos pela norma ISO 11843 [24,25] com o objetivo de propor um método para determinar o limite a partir do qual um sistema de medição pode ser declarado diferente do seu estado básico.

II.7.3 Limite de Decisão ($CC\alpha$) e Capacidade de Detecção ($CC\beta$)

São parâmetros definidos na Decisão 2002/657/CE [10] que medem o desempenho do procedimento analítico, levando em consideração a incerteza da medição no nível de concentração no qual se toma alguma decisão, o chamado nível de interesse.

II.7.4 Procedimento de Determinação do $CC\alpha$

De acordo com a série de normas ISO 11843 [24,25], os cálculos do $CC\alpha$ devem ser realizados, preferencialmente, utilizando a curva de calibração adequada para o procedimento analítico, conforme escolha feita

nas seções 3 – *Curvas de Calibração, Linearidade, Sensibilidade e Faixa de Trabalho* e 4 – *Seletividade e Efeito Matriz*, da Parte II.

II.7.5 Limite de Decisão ($CC\alpha$) para Substâncias Permitidas ($\alpha = 5\%$)

Usando os dados dos pontos de três curvas de calibração, adequadas ao procedimento analítico com níveis de concentração em torno da concentração do limite definido (ver as seções 3 – *Curvas de Calibração, Linearidade, Sensibilidade e Faixa de Trabalho* e 4 – *Seletividade e Efeito Matriz*, da Parte II) e medidas em três dias diferentes, calcular:

$$CC\alpha = LMR + 1,64 \times u_{cLMR} \quad (7)$$

Onde:

- $CC\alpha$: é o valor da concentração do analito correspondente ao $CC\alpha$ nas unidades de concentração do resultado final.
- LMR : é a concentração do LMR nas mesmas unidades de concentração do resultado final.
- U_{cLMR} : é a incerteza combinada na concentração do analito no nível do LMR, levando em consideração a incerteza de amostragem, se disponível; a incerteza de reprodutibilidade intralaboratorial; a incerteza de recuperação e a incerteza de calibração no nível de concentração do LMR obtida da curva de calibração conjunta de três dias.

Para determinar U_{cLMR} procede-se da seguinte forma:

1. Construir uma curva de calibração conjunta de três dias, juntando em uma única curva de calibração todos os pontos de três curvas de calibração obtidas em três dias diferentes, consecutivos ou não.
2. Ajustar a essa curva de calibração conjunta de três dias a reta de calibração pelo MMQO ou MMQP, conforme necessário (ver seção 3 – *Curvas de Calibração, Linearidade, Sensibilidade e Faixa de Trabalho*, da Parte II, e Anexo I a Anexo IV ou Anexo VI a Anexo IX).
3. Calcular U_{calib} usando uma ou outra das equações eq. (A.IV.1a), eq. (A.IV.1b) ou eq. (A.IV.1c) do Anexo IV no caso de ajuste pelo MMQO; ou as equações eq. (A.IX.1a), eq. (A.IX.1b) ou eq. (A.IX.1c) do Anexo IX no caso de ajuste pelo MMQP. Nessas equações fazer $x^* = x_{LMR}$ e $y^* = y_{calcLMR}$. $y_{calcLMR}$ é a resposta instrumental calculada para x_{LMR} na curva de calibração conjunta de

três dias. Também os demais parâmetros dessas equações – o intercepto, a inclinação, suas incertezas ou desvios padrão e a covariância $cov(a,b)$ – são aqueles obtidos na curva de calibração conjunta de três dias.

4. Calcular $U_{cLMR} = U_c(c_{anal})$ usando a eq.(15) como mostrada no item 8.2 – *Cálculo da Incerteza pela Metodologia Top-Down*, da Parte II.
5. Usar na eq.(15) $u_{repro} = s_{reproLMR}$.

Caso o laboratório não queira utilizar os dados da curva de calibração conjunta, poderá utilizar o $CC\alpha$ calculado a partir dos resultados de análise de pelo menos 20 matrizes brancas fortificadas na concentração do LMR, por tipo de matriz analisada no escopo do procedimento validado. Dessa forma, $CC\alpha$ será calculado por:

$$CC\alpha = LMR + 1,64 \times s_{reproLMR} \quad (8)$$

Onde:

- $s_{reproLMR}$: é o desvio-padrão amostral das concentrações determinadas dessa série de 20 análises no nível de concentração do LMR, em condições de precisão intermediária ou reprodutibilidade intralaboratorial.

Para obter $s_{reproLMR}$ podem ser usados os dados do ensaio de reprodutibilidade interna do laboratório. A partir desses dados pode-se obter um modelo matemático da reprodutibilidade intralaboratorial em função da concentração, por meio de um ajuste pelo método dos mínimos quadrados (linha de tendência no Excel).

II.7.6 Limite de Decisão ($CC\alpha$) para Substâncias Banidas ($\alpha = 1\%$)

Usando os dados dos pontos de três curvas de calibração adequadas ao procedimento analítico, com níveis de concentração em torno da concentração do LMDR definido (ver as seções 3 – *Curvas de Calibração, Linearidade, Sensibilidade e Faixa de Trabalho* e 4 – *Seletividade e Efeito Matriz*, da Parte II), e medidas em três dias diferentes, calcular:

$$CC\alpha = 2,33 \times u_{c0} \quad (9)$$

Onde:

- $CC\alpha$: é o valor de concentração do analito correspondente ao $CC\alpha$ nas unidades finais de concentração do resultado final.

- U_{c0} : é a incerteza combinada na concentração do analito no nível de concentração zero, levando em consideração a incerteza de amostragem, se disponível; a incerteza de reprodutibilidade intralaboratorial; a incerteza de recuperação e a incerteza de calibração no nível de concentração zero, ou seja, o desvio-padrão do intercepto obtido da curva de calibração conjunta de três dias.

Para determinar U_{c0} procede-se da seguinte forma:

1. Construir uma curva de calibração conjunta de três dias, juntando em uma única curva de calibração todos os pontos de três curvas de calibração obtidas em três dias diferentes, consecutivos ou não.
2. Ajustar a essa curva de calibração conjunta de três dias a reta de calibração pelo MMQO ou MMQP, conforme necessário (ver seção 3 – *Curvas de Calibração, Linearidade, Sensibilidade e Faixa de Trabalho*, da Parte II, e Anexo 1 a Anexo IV ou Anexo VI a Anexo IX).
3. Calcular $U_{calib} = S_a$ obtendo a raiz quadrada do valor da variância do intercepto obtida pela eq. (A.I.11) do Anexo I, no caso de ajuste pelo MMQO, ou da eq. (A.VI.13), do Anexo VI, no caso de ajuste pelo MMQP.
4. Calcular $U_{c0} = U_c(c_{anal})$ usando a eq.(15) como mostrada no item 8.2 – *Cálculo da Incerteza pela Metodologia Top-Down*, da Parte II. Usar na eq.(15) $u_{repro} = s_{reproLMDR}$.

Caso o laboratório não queira utilizar os dados da curva de calibração conjunta, poderá utilizar o $CC\alpha$ calculado a partir dos resultados de análise de pelo menos 20 matrizes brancas fortificadas na concentração do LMDR ou inferior – o $CC\alpha$ esperado, por exemplo, por tipo de matriz analisada no escopo do procedimento validado. Dessa forma, $CC\alpha$ será calculado por:

$$CC\alpha = 2,33 \times s_{reproLMDR} \quad (10)$$

Onde:

- $s_{reproLMDR}$: é o desvio-padrão amostral das concentrações do analito dessa série de 20 análises no nível de concentração do LMDR ou inferior, em condições de precisão intermediária ou reprodutibilidade intralaboratorial.

Para obter $s_{reproLMDR}$ podem ser usados os dados do ensaio de reprodutibilidade interna do laboratório. A partir desses dados, pode-se obter um modelo matemático da reprodutibilidade intralaboratorial em função da concentração, através de um ajuste pelo método dos mínimos quadrados (linha de tendência no Excel).

II.7.7 Procedimento de Determinação do CC β

De acordo com a série de normas ISO 11843 [24,25], os cálculos do CC β devem ser realizados, preferencialmente, utilizando os procedimentos da curva de calibração adequada para o procedimento analítico, conforme escolha feita nas seções 3 – *Curvas de Calibração, Linearidade, Sensibilidade e Faixa de Trabalho* e 4 – *Seletividade e Efeito Matriz*.

II.7.8 Capacidade de Detecção (CC β) para Substâncias Permitidas ($\beta = 5\%$)

Uma vez calculado CC α para as substâncias permitidas, usando os dados dos pontos de três curvas de calibração adequadas ao procedimento analítico, com níveis de concentração em torno da concentração do LMR definido (ver as seções 3 – *Curvas de Calibração, Linearidade, Sensibilidade e Faixa de Trabalho* e 4 – *Seletividade e Efeito Matriz*) e medidas em três dias diferentes, calcular:

$$\begin{aligned} CC\beta &= CC\alpha + 1,64 \times u_{cLMR} = \\ &= LMR + 3,28 \times u_{cLMR} \end{aligned} \quad (11)$$

Onde:

- u_{cLMR} : é a incerteza padrão combinada no nível de concentração do LMR da curva de calibração conjunta de três dias, cujo cálculo é mostrado anteriormente.

De acordo com a Figura 3, na Decisão 2002/657/CE [10], na eq. (11), deveria aparecer $u_{cCC\beta}$ a incerteza padrão combinada da concentração do analito na capacidade de medição. Porém, seu valor, particularmente no MMQO, é muito próximo daquele de u_{xLMR} que adotamos para simplificar o procedimento.

De forma análoga, caso o laboratório não queira utilizar os dados da curva de calibração conjunta, poderá utilizar o CC α calculado a partir dos resultados de análise de pelo menos 20 matrizes brancas fortificadas na concentração do LMR, por tipo de matriz analisada no escopo do procedimento validado. Dessa forma, CC β será calculado por:

$$\begin{aligned} CC\beta &= CC\alpha + 1,64 \times s_{reproLMR} = \\ &= LMR + 3,28 \times s_{reproLMR} \end{aligned} \quad (12)$$

Onde:

- $s_{reproLMR}$: é o desvio-padrão amostral das concentrações do analito dessa série de 20 análises no nível de concentração do LMR, em condições de precisão intermediária ou reprodutibilidade intralaboratorial.

De acordo com a Figura 3, na Decisão 2002/657/CE [10], as matrizes brancas deveriam ser fortificadas no $CC\alpha$ cujo valor é em geral muito próximo do LMR. Na eq. (12) também deveria aparecer $s_{reproCC\beta}$ o desvio-padrão de reprodutibilidade intralaboratorial na capacidade de medição. Porém seu valor, particularmente no MMQO, é muito próximo daquele de $s_{reproLMR}$ que adotamos para simplificar o procedimento.

Para obter $s_{reproLMR}$ podem ser usados os dados do ensaio de reprodutibilidade interna do laboratório. A partir desses dados pode-se obter um modelo matemático da reprodutibilidade intralaboratorial em função da concentração, por meio de um ajuste pelo método dos mínimos quadrados (linha de tendência no Excel).

II.7.9 Capacidade de Detecção ($CC\beta$) para Substâncias Banidas ($\beta = 5\%$)

Uma vez calculado $CC\alpha$ para as substâncias banidas, usando os dados dos pontos de três curvas de calibração adequadas ao procedimento analítico, com níveis de concentração em torno da concentração do LMDR definido (ver as seções 3 – *Curvas de Calibração, Linearidade, Sensibilidade e Faixa de Trabalho* e 4 – *Seletividade e Efeito Matriz*), medidos em três dias diferentes, calcular:

$$\begin{aligned} CC\beta &= CC\alpha + 1,64 \times u_{c_0} = \\ &= 3,97 \times u_{c_0} \end{aligned} \quad (13)$$

Onde:

- u_{c_0} : é a incerteza combinada na concentração do analito no nível de concentração zero, levando em consideração a incerteza de amostragem, se disponível, a incerteza de reprodutibilidade intralaboratorial, a incerteza de recuperação e a incerteza de calibração no nível de concentração zero, ou seja, o desvio-padrão do intercepto, obtido da curva de calibração conjunta.

Para determinar u_{c_0} procede-se da seguinte forma:

1. Construir uma curva de calibração conjunta de três dias, juntando em uma única curva de calibração todos os pontos de três curvas de calibração obtidas em três dias diferentes, consecutivos ou não.
2. Ajustar a essa curva de calibração conjunta de três dias a reta de calibração pelo MMQO ou MMQP, conforme necessário (ver seção 3 – *Curvas de Calibração, Linearidade, Sensibilidade e Faixa de Trabalho*, da Parte II, e Anexo I a Anexo IV ou Anexo VI a Anexo IX).

3. Calcular $U_{calib} = S_a$ obtendo a raiz quadrada do valor da variância do intercepto obtida pela eq. (A.I.11) do Anexo I, no caso de ajuste pelo MMQO, ou da eq. (A.VI.13), do Anexo VI, no caso de ajuste pelo MMQP.
4. Calcular $U_{c0} = U_{c_{anal}}$ usando a eq.(15) como mostrada no item 8.2 – Cálculo da Incerteza pela Metodologia Top-Down, da Parte II. Usar na eq.(15) $u_{repro} = s_{reproLMDR}$.

Caso o laboratório não queira utilizar os dados da curva de calibração conjunta, poderá utilizar o $CC\beta$ calculado a partir dos resultados de análise de pelo menos 20 matrizes brancas fortificadas na concentração do LMDR ou inferior, o $CC\alpha$, por exemplo, por tipo de matriz analisada no escopo do procedimento validado. Dessa forma, calcular:

$$\begin{aligned} CC\beta &= CC\alpha + 1,64 \times s_{reproLMDR} = \\ &= 3,97 \times s_{reproLMDR} \end{aligned} \quad (14)$$

Onde:

- $s_{reproLMDR}$: é o desvio-padrão amostral das concentrações do analito dessa série de 20 análises no nível de concentração do LMDR ou inferior, em condições de precisão intermediária ou reprodutibilidade intralaboratorial.

De acordo com a Figura 3, na Decisão 2002/657/CE [10] as matrizes brancas deveriam ser fortificadas no $CC\beta$ cujo valor é em geral muito próximo e abaixo do LMDR. Também, na eq. (14) deveria aparecer $s_{reproCC\beta}$ o desvio-padrão de reprodutibilidade intralaboratorial na capacidade de medição. Porém seu valor, particularmente no MMQO, é muito próximo e maior que aquele de $s_{reproLMDR}$ que adotamos para simplificar o procedimento.

Para se obter $s_{reproLMR}$ podem ser usados os dados do ensaio de reprodutibilidade interna do laboratório. A partir desses dados pode-se obter um modelo matemático da reprodutibilidade intralaboratorial em função da concentração, mediante um ajuste pelo método dos mínimos quadrados (linha de tendência no Excel).

II.7.10 Critérios de Aceitação do $CC\alpha$ e $CC\beta$

$CC\alpha$ e $CC\beta$ devem ser inferiores ao Limite Mínimo de Desempenho Requerido (LMDR), no caso de substâncias banidas.

Para as substâncias com LMR definidos, $CC\alpha$ e $CC\beta$ são sempre maiores que o LMR, devendo ser o mais próximo possível dele.

$CC\beta$ não deve ultrapassar mais de duas vezes o valor em fração da unidade do CV da Tabela 6, conforme a faixa de concentração do analito, multiplicado pelo LMR:

$$CC\beta \leq \left(1 + 2 \times \frac{CV_{\text{Tabela 6}}}{100} \right) \times LMR$$

II.8 Incerteza de Medição Analítica (IMA)

O Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM) [22,28] define a incerteza como um “parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas”.

A incerteza (precisão) e a tendência (veracidade) constituem as duas mais importantes características (parâmetros) metrológicas e de qualidade de um resultado de medição, permitindo a comparabilidade e a avaliação da conformidade do resultado de medição em relação a normas, a limites legais ou contratuais ou a valores de referências [16,18]. Portanto, a incerteza é a principal característica metrológica do resultado de uma medição para se estabelecer e se verificar o atendimento ao critério de “adequação ao uso pretendido” [35,36]

A incerteza de medição deve ser relatada juntamente com todo resultado de medição. Um resultado de medição não está completo se faltar alguma expressão de sua incerteza. A ISO 17.025 [23] preconiza que a incerteza de medição seja avaliada ou que pelo menos seus principais componentes sejam estimados.

A incerteza final do resultado de uma medição, obtida de uma combinação das incertezas de múltiplas fontes, é chamada de *Incerteza Padrão Combinada*, sendo representada pelo símbolo $u_c(y)$. Onde y representa o mensurando, o resultado analítico.

As fontes que mais contribuem para a incerteza combinada do resultado analítico são:

1. As incertezas de amostragem, subamostragem e de preparo de amostras de análise;
2. A incerteza de reprodutibilidade ou de precisão intermediária (ou reprodutibilidade intralaboratorial), u_{repro} ou $u_{precint}$;
3. A incerteza relacionada com a estimação da recuperação, caso o resultado seja corrigido por ela, ou com a faixa permitida de variação da recuperação, se o resultado não for corrigido pela recuperação, u_{recup} .

4. A incerteza de previsão da curva de calibração do instrumento de medição analítica, u_{calib} . (ver exemplo na Figura 8 e na Figura 9).

A incerteza de previsão da curva de calibração é constituída das incertezas devido:

1. À indicação da resposta instrumental para a amostra;
2. Ao intercepto da reta de calibração;
3. À inclinação da reta de calibração; e
4. À covariância entre o intercepto e a inclinação da reta de calibração.

A primeira dessas quatro contribuições é a maior delas, enquanto a covariância negativa entre o intercepto e a inclinação da curva de calibração é a única contribuição que leva a uma redução da incerteza combinada da concentração do analito, no caso da curva de calibração ser uma reta.

Existem duas metodologias para estimar a incerteza de medição, denominadas de *Bottom-Up* e *Top-Down*.

Essencialmente, não há diferenças significativas no processo de cálculo de incerteza dessas duas metodologias. Elas consistem em combinar, por meio da lei de propagação das incertezas, as fontes significativas de incerteza identificadas para o procedimento de medição. A diferença entre essas duas metodologias está no grau de detalhamento e aprofundamento do cálculo e no sentido lógico desse cálculo

As quatro etapas básicas dessas metodologias para o cálculo da incerteza, esquematizadas no fluxograma da Figura 6, são:

1. Especificar o mensurando;
2. Identificar as fontes de incerteza;
3. Quantificar ou estimar as incertezas de cada fonte de incerteza;
4. Calcular a incerteza padrão combinada.

A essas quatro etapas básicas podemos adicionar outras duas etapas acessórias:

1. Calcular a incerteza expandida; e
2. Realizar uma análise crítica da incerteza de medição estimada e, se necessário, sua re-estimação ou a de algum componente significativo.

Na **etapa 1** de especificação do mensurando, escrevemos a equação do mensurando que relaciona as grandezas de entrada obtidas de medi-

ções diretas com a grandeza de saída (ver exemplo na Figura 6). Um detalhado procedimento de medição deve ser estabelecido nessa etapa.

Na **etapa 2** de identificação das fontes de incerteza, recomenda-se a elaboração um diagrama de causa e efeito ou diagrama de Ishikawa, para representar visualmente as interações das fontes de incerteza identificadas (ver Figura 8).

A exaustiva análise do procedimento de medição, um amplo conhecimento científico e a experiência do processo de medição e das características físico-químicas do mensurando são imprescindíveis para o bom êxito da etapa 2.

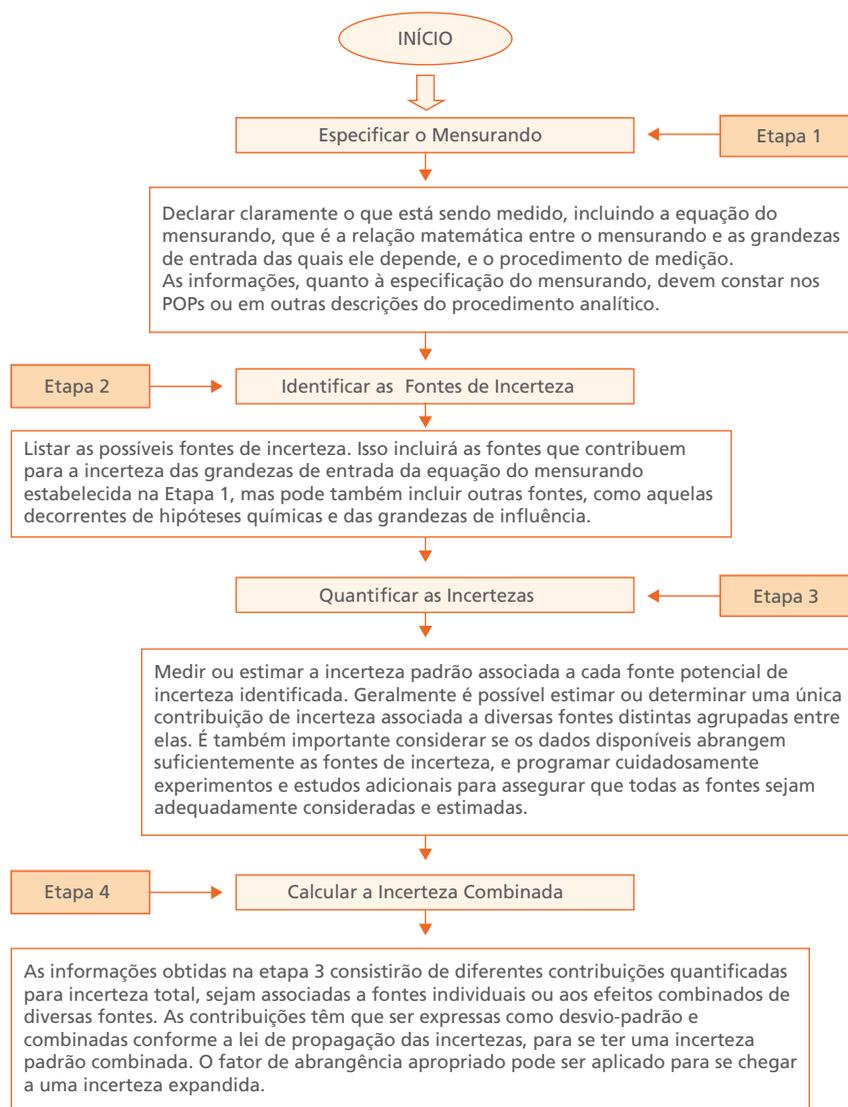
Na **etapa 3** procede-se a uma valoração das incertezas de cada componente de incerteza elencado na etapa 2.

Para tanto, utiliza-se a **estimação do Tipo A**, baseada na análise estatística de medições repetidas feitas durante o processo de medição do mensurando; ou a **estimação do Tipo B**, que se baseia em outras informações que não aquelas utilizadas na estimação do Tipo A, tais como características do instrumento de medição fornecidas por seu fabricante, certificados de calibração ou de MRC, classe de exatidão de instrumentos e padrões e outras medições não ligadas diretamente à do mensurando, como aquelas da validação de procedimento analítico.

Na **etapa 4** de cálculo da incerteza combinada é recomendável a elaboração de uma planilha eletrônica de cálculos, especialmente no caso da metodologia *Bottom-Up*, para permitir o uso adequado da lei de propagação das incertezas, combinando corretamente os valores das incertezas padrão das fontes de incertezas quantificadas na etapa 3 (ver Figura 10).

É recomendável a construção de um histograma de causa e efeito ou histograma de Yshikawa ou de espinha de peixe (ver Figura 9), apresentando as fontes que mais contribuem para a incerteza combinada do mensurando. Esse histograma auxilia na interpretação dos resultados e no planejamento de melhorias no procedimento de medição, bem como na aquisição de novos equipamentos.

Figura 6 – Fluxograma das quatro etapas básicas do procedimento de cálculo para a estimação da incerteza de medição



Consideremos o exemplo da análise do metal cádmio em uma dada amostra por absorção atômica. O procedimento dessa análise consiste basicamente na pesagem da alíquota de análise, abertura da amostra com mistura de ácidos a quente, seguida de diluições ou pré-concentração da solução de abertura e, finalmente, a injeção da solução diluída no espectrômetro.

Os dados da curva de calibração (ver Exemplo A.5 do Guia EURACHEM de cálculo de incerteza) ajustados pelo MMQP levou aos seguintes valores para os parâmetros da reta de calibração: $a = 3,4276 \times 10^{-3}$, $s_a = 4,090 \times 10^{-4}$, $b = 2,5555 \times 10^{-1}$ kg/mg, $s_b = 1,3984 \times 10^{-3}$ kg/mg e $cov(a,b) = -4,1109 \times 10^{-7}$ kg/mg.

A faixa para o fator de recuperação permitida para o ensaio é de 90% a 110%, ou $f_{recmin} = 0,9$ e $f_{recmax} = 1,1$. Uma dada amostra foi analisada duas vezes $K = 2$, dando uma resposta instrumental média $RI_{amos} = 0,19$, com desvio-padrão de $s(RI_{amos}) = 3,5271 \times 10^{-3}$. A concentração do analito na curva de calibração é, portanto, $c_{analCC} = 0,73009$ mg/kg (Figura 7).

A solução de abertura da amostra passou por uma pré-concentração antes de sua leitura na absorção atômica, tal que 100 ml da solução de abertura foi evaporada até atingir 10 mL. Logo houve um fator de pré-concentração de 10 vezes. Logo a concentração do analito na amostra de ensaio é $c_{anal} = 0,07009$ mg/mol (Figura 7).

Nesse nível de concentração do analito na amostra, a incerteza de reprodutibilidade interna do procedimento é estimada em $u_{repro} = s_{repro} = 3,6504 \times 10^{-3}$ mg/kg.

A Figura 7 mostra a equação do mensurando e o cálculo da concentração do analito na curva de calibração e sua concentração na amostra de ensaio.

II.8.1 Cálculo da Incerteza pela Metodologia *Bottom-Up*

A metodologia *Bottom-Up* é aquela preconizada pelo BIPM, pela ISO e outras instituições internacionais de padronização, mediante o Guia para a Expressão da Incerteza de Medição, conhecido como ISO-GUM [38,39]. Ela também é indicada pela EURACHEM [16].

Nessa metodologia, procura-se fazer a combinação exaustiva de todas as fontes de incerteza do procedimento de medição. Partindo-se das fontes de incerteza de todas as medições diretas das grandezas de entrada presentes na equação do mensurando e das grandezas de influência, constrói-se um diagrama de causa e efeito, como aquele mostrado na Figura 8 para o exemplo da análise de cádmio por espectroscopia de absorção atômica.

A Figura 9 apresenta a planilha eletrônica (Excel®) detalhada para combinar as incertezas de todas as fontes de incerteza representadas na Figura 8. Essa planilha está disponível, juntamente com este Manual, no sítio eletrônico do Mapa na internet.

Figura 7 – Exemplo de Função de medição ou equação do mensurando para a concentração de um metal determinada pela espectroscopia de absorção atômica (EAA)

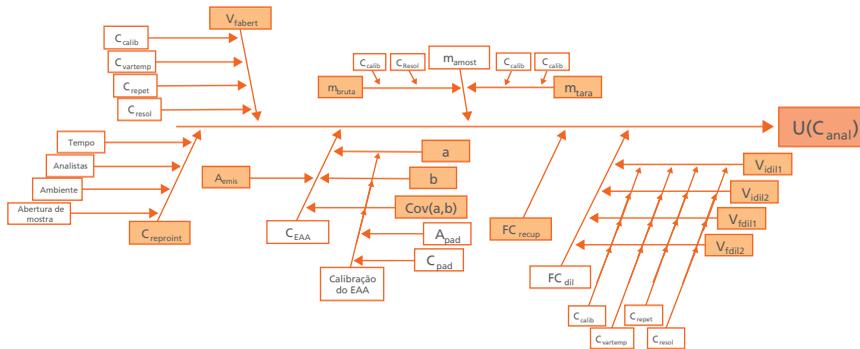
$$\begin{aligned}
 C_{anal} &= c_{calc} + C_{rec} + C_{repoint} = c_{calc} \times FC_{rec} + C_{repoint} = \\
 &= \frac{c_{analCC} \times V_{fabert}}{m_{bruta} - m_{tara}} \frac{V_{fdil1}}{V_{idil1}} \frac{V_{fdil2}}{V_{idil2}} \times FC_{rec} + C_{repoint} = \\
 &= \frac{\left(\frac{\bar{A}_{amostra} - a}{b} \right) \times V_{fabert}}{m_{bruta} - m_{tara}} \times \frac{V_{fdil1}}{V_{idil1}} \times \frac{V_{fdil2}}{V_{idil2}} \times FC_{rec} + C_{repoint} = \\
 &= \frac{0,19 - 3,4276 \times 10^{-3}}{0,2555488 \text{ L/mg}} \times 100 \text{ mL} \times \frac{10 \text{ mL}}{100 \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 1 + 0 = \\
 &= \frac{0,73009 \text{ mg/L} \times 100 \text{ mL}}{100 \text{ g}} \frac{1}{10} = \frac{0,73009 \text{ mg/L} \times 0,1 \text{ L}}{1000 \text{ g}} = 0,073009 \text{ mg/kg}
 \end{aligned}$$

C_{anal}	Concentração do analito na amostra de ensaio analisada. Unidades: mg/kg
C_{calc}	Concentração calculada do analito na amostra de ensaio sem correções. Unidades: mg/kg
C_{analCC}	Concentração do analito interpolada na curva de calibração. Unidades: mg/L
$\bar{A}_{amostra}$	Absorvância média da amostra de reinjeção em duplicatas. Unidades: adimensional
a	Intercepto da reta de calibração obtido do ajuste pelo método dos mínimos quadrados ponderado. Unidades: adimensional
b	Inclinação da reta de calibração, sensibilidade, obtida do ajuste pelo método dos mínimos quadrados ponderado. Unidades: L/mg
$cov(a,b)$	Covariância entre o intercepto e a inclinação da reta de calibração obtida do ajuste pelo método dos mínimos quadrados ponderado absoluto. Unidades: kg/mg
V_{fabert}	Volume final da solução de abertura/extração/digestão da amostra. Unidades: mL
m_{bruta}	Massa bruta do recipiente de pesagem e da amostra seca. Unidades: g
m_{tara}	Massa de tara do recipiente de pesagem vazio. Unidades: g
V_{idil1}	Volume inicial, alíquota, da solução de abertura da amostra para sua primeira diluição. Unidade: mL
V_{fdil1}	Volume final da primeira diluição da solução de abertura da amostra. Unidade: mL
V_{idil2}	Volume inicial, alíquota, da solução de abertura da amostra para sua segunda diluição. Unidade: mL
V_{fdil2}	Volume final da segunda diluição da solução de abertura da amostra. Unidade: mL
$C_{repoint}$	Correção nula de reprodutibilidade interna ou de precisão intermediária. Unidades: mg/kg
FC_{recup}	Fator de correção unitário de recuperação, $FC_{recup} = 1/f_{rec}$ se não se faz a correção pela recuperação, caso contrário ele é diferente de um. Unidade: adimensional

A Dose Semanal Admissível Provisória – DSAP de massa corpórea adotada em 2 de junho de 1995 pelo Comitê Científico da Alimentação Humana – CCAH é: DSAP = 7 µg/kg http://ec.europa.eu/food/ifs/sc/scf/reports/scf_reports_36.pdf.

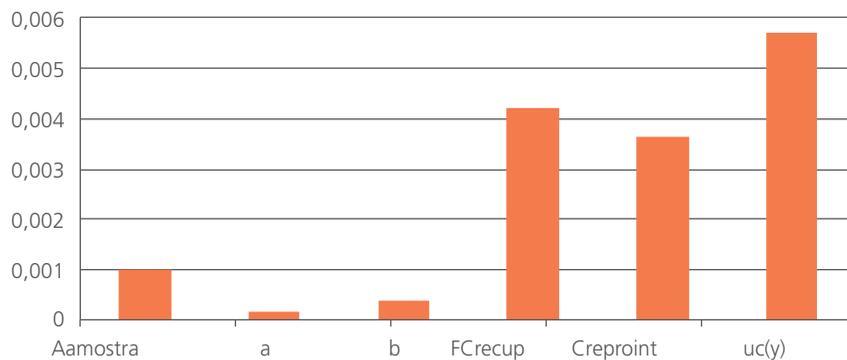
Isso significa 0,070 mg para uma pessoa de 100 kg.

Figura 8 – Exemplo de um diagrama de causa e efeito ou diagrama de Ishikawa para o cálculo de incerteza de uma determinação de Cd por espectroscopia de absorção atômica (EAA)



Nota: $A_{emis} = A_{amostra}$ que aparece na equação do mensurando (Figura 7).

Figura 9 – Histograma mostrando a incerteza combinada da concentração de Cd determinada por EAA e as suas maiores contribuições positivas, conforme calculado pela planilha mostrada na Figura 8.



A contribuição de incerteza para o fator de correção de recuperação foi calculada supondo uma faixa permitida para o fator de recuperação de 90% a 110%.

Se essa faixa fosse de 95% a 105% essa contribuição passaria a ser 0,0021ng/kg, a segunda maior, e a incerteza combinada de C_{anal} seria 0,0044 mg/kg.

Figura 10 – Exemplo de uma planilha de cálculo de incerteza simples para a determinação de Cd por espectroscopia de absorção atômica (EAA)

Laboratório de Metrologia e Ensaio

Planilha de Cálculo de incerteza de Medição

Calibração, Medição, ou Ensaio: Concentração de Cd na amostra em mg/kg determinada por Absorção Atômica
 Técnico: Wellington F. de MAGALHÃES Serviço num.: 190857 Folha 1/1 Rubrica:

Grandezas de entrada ou de influência Fontes de incerteza (uncertainty sources)			Função Densidade de probabilidade (Probability density function)			Contribuição de incerteza: $u(y)$ (Uncertainty contribution)			$GL[u(y),k]$ = v_{rel} ou $GL_{rel} = v_{rel}$	$[u(y)]^{1/2}$	
Símbolo	Valor	meio intervalo declarado	unidade	Tipo	Nome	Divisor k	incerteza padrão $u(x_i)$	Coef. Sens. c_i	$u(y) = u(y,x_i)$ $c_i \cdot u(x_i)$		
M_{base}	119,0857		g								
C_{corr}	0,0	0,00021	g	B	Normal	2,26	9,29204E-05	-0,00073	6,78398E-08	9,00E+99	2,35E-129
C_{recal}	0,0	0,0001	g	B	Retangular	1,732051	5,7735E-05	-0,00073	4,21515E-08	9,00E+99	3,51E-130
M_{base}	119,0857		g				0,000109396	-0,00073	7,98685E-08	1,50E+100	2,70E-129
M_{base}	19,0857		g								
C_{corr}	0,0	0,00021	g	B	Normal	2,26	9,29204E-05	0,00073	6,78398E-08	9,00E+99	2,35E-129
C_{recal}	0,0	0,0001	g	B	Retangular	1,732051	5,7735E-05	0,00073	4,21515E-08	9,00E+99	3,51E-130
M_{base}	19,0857		g				0,000109396	0,00073	7,98685E-08	1,50E+100	2,70E-129
V_{labat}	100,000		mL								
C_{corr}	0,000	0,08	mL	B	Normal	2	0,04	0,00073	2,92034E-05	9,00E+99	8,08E-119
C_{labat}	0,000	0,063	mL	B	Retangular	1,732051	0,036373067	0,00073	2,65554E-05	9,00E+99	5,53E-119
C_{repe}	0,00E+00	0,05	mL	A	Normal	1	0,05	0,00073	3,65043E-05	9,00E+00	1,97E-19
C_{recal}	0	0	mL	B	Retangular	1,732051	0	0,00073	0	9,00E+99	0,00E+00
V_{labat}	100,000		mL				0,073641021	0,00073	5,37642E-05	4,23E+01	1,97E-19
V_{labat}	100,000		mL								
C_{corr}	0,000	0,02	mL	B	Normal	2	0,01	-0,00073	7,30085E-06	9,00E+99	3,16E-121
C_{labat}	0,000	0,063	mL	B	Retangular	1,732051	0,036373067	-0,00073	2,65554E-05	9,00E+99	5,53E-119
C_{repe}	0,00E+00	0,004	mL	A	Normal	1	0,004	-0,00073	2,92034E-06	9,00E+00	8,08E-24
C_{recal}	0	0	mL	B	Retangular	1,732051	0	-0,00073	0	9,00E+99	0,00E+00
V_{labat}	100,000		mL				0,037934153	-0,00073	2,76952E-05	7,28E+04	8,08E-24
V_{labat}	10,000		mL								
C_{corr}	0,000	0,08	mL	B	Normal	2	0,04	0,007301	0,000292034	9,00E+99	8,08E-115
C_{labat}	0,000	0,0063	mL	B	Retangular	1,732051	0,003637307	0,007301	2,65554E-05	9,00E+99	5,53E-119
C_{repe}	0,00E+00	0,05	mL	A	Normal	1	0,05	0,007301	0,000365043	9,00E+00	1,97E-15
C_{recal}	0	0	mL	B	Retangular	1,732051	0	0,007301	0	9,00E+99	0,00E+00
V_{labat}	10,000		mL				0,064134468	0,007301	0,000468238	2,44E+01	1,97E-15
V_{labat}	0,000		mL								
C_{corr}	0,000	0,02	mL	B	Normal	2	0,01	-0,073009	0,000730085	9,00E+99	3,16E-113
C_{labat}	0,000	0	mL	B	Retangular	1,732051	0	-0,073009	0	9,00E+99	0,00E+00
C_{repe}	0,00E+00	0,004	mL	A	Normal	1	0,004	-0,073009	0,000292034	9,00E+00	8,08E-16
C_{recal}	0	0	mL	B	Retangular	1,732051	0	-0,073009	0	9,00E+99	0,00E+00
V_{labat}	0,000		mL				0	-0,073009	0	0,00E+00	0,00E+00
V_{labat}	0,000		mL								
C_{corr}	0,000	0,08	mL	B	Normal	2	0,04	0,073009	0,002920341	9,00E+99	8,08E-111
C_{labat}	0,000	0	mL	B	Retangular	1,732051	0	0,073009	0	9,00E+99	0,00E+00
C_{repe}	0,00E+00	0,05	mL	A	Normal	1	0,05	0,073009	0,003650426	9,00E+00	1,97E-11
C_{recal}	0	0	mL	B	Retangular	1,732051	0	0,073009	0	9,00E+99	0,00E+00
V_{labat}	0,000		mL				0	0,073009	0	0,00E+00	0,00E+00
A_{labat}	0,1900		1								
C_{repe}	0,000	3,53E-03	1	A	Normal	1,414214	0,002494066	3,91E-01	0,000975965	9,00E+99	1,01E-112
A_{labat}	0,190		1				0,002494066	0,391315	0,000975965	9,00E+99	1,01E-112
a	3,43E-03	0,000409011	1	A	Normal	1	0,000409011	-3,91E-01	0,000160052	2,50E+01	2,62E-17
b	2,56E-01	0,001398367	kg/mg	A	Normal	1	0,001398367	-2,86E-01	0,000399504	2,50E+01	1,02E-15
$Cov(a,b)$		-4,11059E-07	kg/mg	A	Normal	1	-4,11059E-07	2,24E-01	-9,19094E-08	2,50E+01	2,85E-30
F_{crecup}	1,000	0,1	1	B	Retangular	1,732051	0,057735027	0,073009	0,004215149	9,00E+99	3,51E-110
C_{repe}	0,000	0,003650426	mg/kg	A	Normal	1	0,003650426	1	0,003650426	3,00E+00	5,92E-11
Soma									0,005688744		5,92E-11

Grandeza nominal	Valor Estimado	Incerteza padrão combinada $u_c(y)$	Graus de liberdade efetivos ν_{ef}	Probabilidade de abrangência $P / \%$	Fator de abrangência k	Incerteza expandida $U(y)$	Incerteza padrão relativa % RSD = CV	Incerteza expandida relativa % CVE
Y	y							
mg/kg	0,0730	0,005689	1,77E+01	95	2,1098	0,0120	7,7919	16,4395
Observações:								
		$C_{limCC} =$	7,30E-01					
		Varição de temperatura do Lab.:	+-	3 °C				

Os dados da curva de calibração mostrados na Tabela A.II.1 foram ajustados pelo MMQP e levam aos parâmetros acima.

II.8.2 Cálculo da Incerteza pela Metodologia *Top-Down*

A metodologia *Top-Down* consiste em usar a incerteza de reprodutibilidade, obtida em ensaios colaborativos, ou a incerteza de precisão intermediária (reprodutibilidade intralaboratorial), obtida em estudo de validação interna, ou ainda de dados de controle de qualidade de longo prazo, como uma estimação da incerteza do resultado analítico. A essa fonte de incerteza pode-se adicionar algumas outras fontes significativas.

A incerteza combinada do resultado final da concentração do analito na amostra $u_c(C_{anal})$, pode por exemplo ser obtida pela combinação das quatro maiores fontes de incerteza citadas, através da expressão dada pela eq. (15) (ver Figura 11 na Tabela 7 e a Figura 12):

$$\begin{aligned} u_c(C_{anal}) &= \sqrt{u_{amostragem}^2 + u_{repro}^2 + (c_{rec}u_{rec})^2 + (c_{calib}u_{calib})^2} = \\ &= \sqrt{u_{amostragem}^2 + u_{repro}^2 + (c_{rec}u_{rec})^2 + \left(\frac{C_{anal}}{C_{analCC}}u_{calib}\right)^2} \end{aligned} \quad (15)$$

Onde:

- c_{anal} é a concentração do analito na amostra de ensaio.
- c_{analCC} é a concentração do analito interpolada na curva de calibração.
- u_{repro} é a incerteza de reprodutibilidade obtida dos dados de participação em ensaios colaborativos (reprodutibilidade) ou dos dados de precisão intermediária $u_{precint}$ (ou reprodutibilidade intralaboratorial), conforme sua disponibilidade.
- u_{calib} é a incerteza devida à previsão da concentração do analito na curva de calibração.
- u_{rec} é a incerteza associada à estimação da recuperação ou com a faixa permitida da recuperação, conforme o resultado seja, respectivamente, corrigido ou não por ela.
- $u_{amostragem}$ é a incerteza devida ao processo de amostragem que leva à amostra que chega ao laboratório. Ela é a maior fonte de incerteza do resultado analítico, mas é em geral desconhecida. Neste caso, assumir o valor zero e reportar que a incerteza declarada não leva em consideração a incerteza de amostragem.
- $c_{calib} = c_{anal}/c_{analCC}$ é o coeficiente de sensibilidade para a incerteza de calibração, obtido da equação do mensurando escrita como uma função da concentração do analito interpolada na curva de cali-

bração. Este coeficiente de sensibilidade decorre do fato de que as unidades de concentração da curva de calibração podem não ser as mesmas do resultado, assim como da existência de outras medições (massas, volumes etc.), além da resposta instrumental do instrumento de medição analítica.

- c_{rec} é o coeficiente de sensibilidade associado ao fator de correção da recuperação $FC_{rec} = 1/f_{rec}$, que neste caso é igual à concentração do analito calculada c_{calc} e não corrigida pelo fator de recuperação. Se na equação do mensurando for usada uma correção de recuperação (C_{rec}) e não o fator de correção da recuperação (FC_{rec}) esse coeficiente de sensibilidade será unitário – $c_{rec} = 1$.

Em geral, as incertezas associadas aos processos de amostragem, subamostragens e preparo de amostra não têm sido consideradas nos cálculos de incerteza de resultados analíticos devido à grande dificuldade para a obtenção dos dados necessários para a estimação das incertezas dessas fontes.

É de reconhecimento internacional que a incerteza de amostragem em amostras representativas da população (amostras não representativas causam erros sistemáticos nos estimadores estatísticos e devem ser reamostradas) é a maior fonte de incerteza do resultado analítico [17].

Em geral, a amostragem não é responsabilidade do laboratório de análise química, o qual não costuma ter controle sobre ela. No entanto, o laboratório deve descartar toda amostra recebida que não atenda aos requisitos mínimos de qualidade estabelecidos neste Manual, na seção 8 – *Recepção, Armazenamento e Preparação de Amostras*, da Parte I.

A eq. (15) se baseia na aplicação da lei de propagação das incertezas sobre a equação de medição simplificada:

$$c_{anal} = c_{calc} + C_{amostragem} + C_{repro} + C_{rec} + c_{calib} C_{calib} =$$

ou

$$c_{anal} = c_{calc} \times FC_{rec} + C_{amostragem} + C_{repro} + c_{calib} C_{calib} \quad (16)$$

Onde:

- c_{calc} é a concentração do analito obtida nos cálculos feitos com os valores medidos na análise sem correções.
- $C_{amostragem}$ é a correção nula de amostragem.
- C_{repro} é a correção nula de reprodutibilidade intralaboratorial ou precisão intermediária, mas sua incerteza não é nula.

- C_{calib} é a correção nula de calibração do instrumento analítico, mas sua incerteza não é nula.
- $c_{calib} = c_{anal}/c_{analCC}$ é o coeficiente de sensibilidade para a incerteza de calibração obtido da equação do mensurando escrita como uma função da concentração do analito interpolada na curva de calibração.
- C_{rec} é a correção de recuperação, que pode ser nula ou não, dependendo, respectivamente, se a recuperação não será usada ou será usada para corrigir o resultado.
- FC_{rec} é o fator de correção da recuperação, que está relacionado ao fator de recuperação f_{rec} pela relação $FC_{rec} = 1/f_{rec}$. Se a recuperação não for usada para corrigir o resultado, então $f_{rec} = FC_{rec} = 1$. A relação entre a correção de recuperação e o fator de recuperação é dada pela equação:

$$C_{rec} = \left(\frac{1}{f_{rec}} - 1 \right) C_{calc} \quad (17)$$

A incerteza de calibração u_{calib} , que aparece na eq. (15) é calculada a partir da incerteza da resposta instrumental para a amostra ($u_{RIamostra}$), da incerteza do intercepto ($u_a = s_a$) ou (s_{av}), da incerteza da inclinação ($u_b = s_b$) ou (s_{bw}) e da covariância entre o intercepto e a inclinação – $cov(a,b)$ ou $cov(a_w, b_w)$ – da reta de calibração (vide anexos I e VI), através da eq. (18), a seguir, que é a equação E3.3 do Guia EURACHEM/CITAC QUAM2000 [10]:

$$u_{calib}(c_{analCC}) = \sqrt{\frac{u_{RIamostra}^2 + u_a^2 + c_{analCC}^2 u_b^2 + 2c_{analCC} cov(a,b)}{b^2}} =$$

$$= \sqrt{\frac{s^2(RI_{amos})/K + s^2(a) + c_{analCC}^2 s^2(b) + 2c_{analCC} cov(a,b)}{b^2}} \quad (18)$$

A incerteza de recuperação u_{rec} , que aparece na eq. (15) depende se o resultado será corrigido ou não pela recuperação. Se o resultado final da concentração for corrigido pela recuperação, então a incerteza da medição da correção de recuperação – $u_{rec} = u(C_{rec})$ – será aproximada pela incerteza da reprodutibilidade intralaboratorial – $u_{rec} = s_{repro}$.

Se uma faixa para a correção de recuperação (C_{rec}) ou para o fator de recuperação (f_{rec}) é permitida e o resultado não é corrigido pela recuperação, então a incerteza da recuperação é feita por uma estimativa do Tipo B, através da eq. 19, quando se usa a correção de recuperação C_{rec} ou através da eq. 20, quando se usa o fator de recuperação f_{rec} ou o fator de correção da recuperação FC_{rec} respectivamente.

$$u_{rec} = \frac{C_{rec\ max} - C_{rec\ min}}{2\sqrt{3}} \quad (19)$$

ou

$$u_{rec} = \frac{2(f_{rec\ max} - f_{rec\ min})}{\sqrt{3}(f_{rec\ max} + f_{rec\ min})^2} \quad (20)$$

Figura 11 – Exemplos de utilização da metodologia *Top-Down* para o cálculo da incerteza combinada da concentração de Cd determinada por EAA

$$u_{rec} = \frac{2 \times (1,1 - 0,9)}{\sqrt{3} \times (1,1 + 0,9)^2} = \frac{2 \times 0,2}{\sqrt{3} \times 2^2} = 0,057735$$

$$u_c(c_{anal}) = \sqrt{u_{repro}^2 + (c_{recup} u_{recup})^2} = \sqrt{0,0036504^2 + (0,073009 \times 0,057735)^2} =$$

$$= \sqrt{1,3325 \times 10^{-5} + 0,004215^2} = \sqrt{3,1093 \times 10^{-5}}$$

$$= 5,576 \times 10^{-3} = 0,005576 \text{ mg/kg} \quad (a)$$

$$u_{calib} = \left\{ \frac{(3,5271 \times 10^{-3})^2 / 2 + (4,090 \times 10^{-4})^2 + (0,73009)^2 \times (1,3984 \times 10^{-3})^2 + 2 \times 0,73009 \times (-4,11 \times 10^{-7})}{(2,555488 \times 10^{-1})^2} \right\}^{1/2} =$$

$$= (1,047383 \times 10^{-4} \text{ mg}^2/\text{kg}^2)^{1/2} = 1,023417 \times 10^{-2} \text{ mg/kg}$$

$$u_c(c_{anal}) = \sqrt{u_{repro}^2 + (c_{recup} u_{recup})^2 + \left(\frac{c_{anal}}{c_{analCC}} \right)^2 u_{calib}^2} =$$

$$= \sqrt{0,0036504^2 + (0,073009 \times 0,057735)^2 + \left(\frac{0,073009}{0,73009} \right)^2 \times (1,023417 \times 10^{-2})^2} =$$

$$= \sqrt{1,3325 \times 10^{-5} + 0,004215^2 + 0,1^2 \times 1,047382 \times 10^{-4}} = \sqrt{3,2139 \times 10^{-5}}$$

$$= 5,6692 \times 10^{-3} = 0,0056692 \text{ mg/kg} \quad (b)$$

Notas: (a) Cálculo da incerteza levando em consideração apenas a incerteza de precisão intermediária e a incerteza no fator de correção da recuperação. Seu valor, 0,005576 mg/kg, corresponde a 98% da incerteza 0,005689 mg/kg, calculada na metodologia *Bottom-Up*, na planilha mostrada na Figura 9. Cenário (c) na Tabela 7.

(b) Cálculo da incerteza levando em consideração a incerteza de precisão intermediária, a incerteza no fator de correção da recuperação e a incerteza de previsão na curva de calibração. Seu valor 0,0056692 mg/kg corresponde a 99,7% da incerteza 0,005689 mg/kg, calculada na metodologia *Bottom-Up*, na planilha mostrada na Figura 9. Cenário (b) na Tabela 7.

Obs.: Os dados numéricos foram extraídos de células da planilha apresentada na Figura 8.

Tabela 7 – Cálculo da incerteza combinada da concentração de Cd determinada por EAA pela metodologia *Top-Down*

Cenários	Incertezas (contribuições) / mg/kg				Inc. Comb.
	Amostragem	Repro int	Recup	Calib	
(a)	0,005	0,00365	0,004215	0,0010234	0,007559
(b)	0	0,00365	0,004215	0,0010234	0,005669
(c)	0	0,00365	0,004215	0	0,005576
(d)	0	0,00365	0,00365	0,0010234	0,005262
(e)	0	0,00365	0	0,0010234	0,00379

Notas: (a) A incerteza de amostragem é a maior fonte de incerteza e a incerteza de recuperação é aquela devida à faixa permitida de recuperação. Resultado não corrigido pela recuperação.

(b) A incerteza de amostragem não é computada e a incerteza de recuperação é aquela devida à faixa permitida de recuperação. Resultado não corrigido pela recuperação.

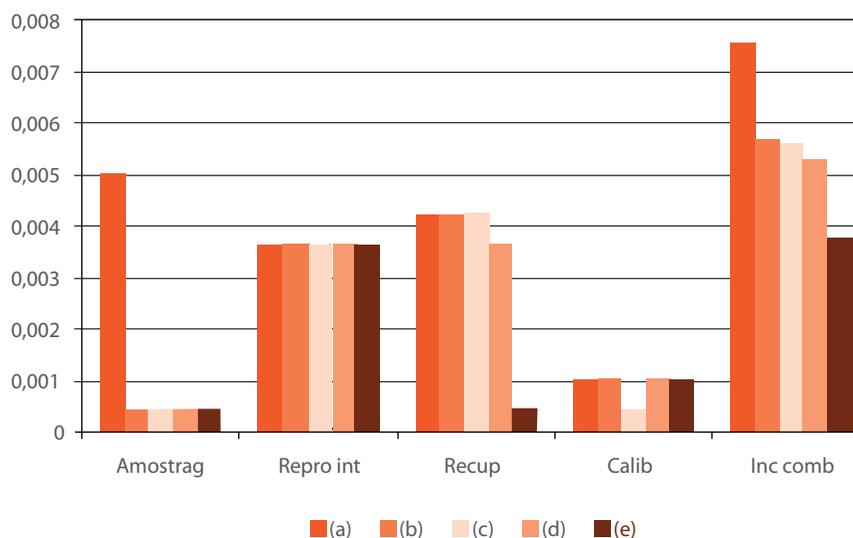
(c) As incertezas de amostragem e de calibração do instrumento analítico não são computadas e a incerteza de recuperação é aquela devida à faixa permitida de recuperação. Resultado não corrigido pela recuperação.

(d) A incerteza de amostragem não é computada e a incerteza de recuperação é aquela estimada como sendo igual à incerteza de reprodutibilidade interna. Resultado corrigido pela recuperação.

(e) As incertezas de amostragem e de recuperação não são computadas.

Obs.: As colunas 2 a 5 mostram as contribuições para a incerteza combinada da concentração do analito na amostra de ensaio, devido às quatro fontes de incerteza mais expressivas nos ensaios de análises químicas: a de amostragem, a de reprodutibilidade interna, a de recuperação e a de calibração do instrumento de medição analítica em diferentes cenários.

Figura 12: Cálculo da incerteza combinada da concentração de Cd determinada por EAA pela metodologia *Top-Down*



Obs.: As contribuições para a incerteza combinada da concentração do analito na amostra de ensaio se devem às quatro fontes de incerteza mais expressivas nos ensaios de análises químicas para cinco cenários, conforme dados da Tabela 7.

II.8.3 Critérios de Aceitação da Incerteza de Medição

É importante enfatizar que cada resultado analítico tem sua própria incerteza, uma vez que as fontes de incerteza não são sempre as mesmas, pois no mínimo a incerteza de calibração muda a cada nova calibração realizada, seja aquela do instrumento analítico como o espectrômetro ou o cromatógrafo etc., sejam aquelas dos instrumentos de medição de massa (balança) de volume (bureta, pipetas etc.). Também variam continuamente as fontes de incerteza, relacionadas às grandezas de influência, especialmente aquelas envolvendo condições ambientais e experimentais da batelada de análises. Além do mais, a incerteza de um resultado analítico é em geral uma função (dependente) do próprio valor da concentração do analito (heteroscedasticidade). Quando essa dependência funcional (u_c vs. c_{anal}) é de proporcionalidade ou é uma reta em uma dada faixa de concentração do analito, então o coeficiente de variação (CV) ou incerteza relativa é constante. Porém, essa constância de CV pode não existir, especialmente se a faixa de concentração validada do analito é de algumas ordens de grandeza. Dessa forma, recomenda-se que os cálculos de incerteza sejam feitos a cada batelada de análises. No entanto, o laboratório pode desenvolver estratégias para reduzir a carga trabalho desses cálculos, por exemplo, por meio do modelamento funcional da incerteza de medição com a concentração $u(c_{anal}) = f(c_{anal})$. Vale lembrar que, neste caso, o modelo desenvolvido deve ser periodicamente revalidado e pode ser constituído, por exemplo, de um polinômio, um crescimento exponencial ou outra função qualquer ajustada aos dados acumulados de u_c vs. c_{anal} .

A incerteza combinada padrão ou a expandida do resultado da análise química não deve exceder o limite máximo de incerteza estabelecido por legislação ou norma específica.

Na falta do valor do limite máximo de incerteza, relatado no parágrafo anterior, um dos quatro critérios a seguir deverá ser usado conforme as faixas de concentrações do analito estabelecidas na Tabela 6:

1. Se a incerteza padrão combinada do resultado de análise for calculada incluindo a precisão intermediária (incerteza ou desvio-padrão de reprodutibilidade intralaboratorial), então a incerteza padrão combinada relativa *não deve exceder* em mais de um terço (1/3) os valores da Tabela 6:

$$\frac{u_c(c_{anal})}{c_{anal}} \leq \left(1 + \frac{1}{3}\right) \times CV_{\text{Tabela 6}} \quad (21)$$

2. Se a incerteza padrão combinada do resultado de análise for calculada incluindo a incerteza ou o desvio-padrão de precisão de repetitividade (não incluindo a incerteza ou o desvio-padrão de reprodutibilidade intralaboratorial), então a incerteza padrão

combinada relativa não deve exceder em mais de um terço (1/3) os valores da incerteza (precisão) de repetitividade; logo, ela não deve ser maior que oito nonos (8/9) dos valores da Tabela 6:

$$\frac{u_c(c_{anal})}{c_{anal}} \leq \frac{8}{9} \times CV_{\text{Tabela 6}} \quad (22)$$

3. Se a incerteza padrão combinada do resultado de análise for calculada incluindo uma incerteza do Tipo B associada a uma faixa de recuperação permitida, quando essa recuperação não é usada para corrigir o resultado da medição, então a incerteza combinada padrão relativa não deve exceder em mais de dois terços (2/3) os valores da Tabela 6:

$$\frac{u_c(c_{anal})}{c_{anal}} \leq \frac{2}{3} \times CV_{\text{Tabela 6}} \quad (23)$$

4. Se a incerteza padrão combinada do resultado de análise for calculada incluindo a precisão de reprodutibilidade (incerteza ou desvio-padrão de reprodutibilidade ou incerteza de ensaios interlaboratoriais colaborativos), então a incerteza padrão combinada relativa não deve exceder mais de duas vezes os valores da Tabela 6:

$$\frac{u_c(c_{anal})}{c_{anal}} \leq 2 \times CV_{\text{Tabela 6}} \quad (24)$$

II.9 Estudo de Robustez, Escopo e Portabilidade

O estudo da robustez de um procedimento analítico procura avaliar o quão sensível o resultado analítico é a variações nas condições experimentais do procedimento analítico, os chamados fatores ou tratamentos ou grandezas de influência [22].

A robustez não é uma grandeza física ou química, assim não se pode atribuir-lhe um valor numérico. Para avaliar a robustez, verifica-se experimentalmente se a variação de cada fator estudado tem efeito significativo sobre a qualidade metrológica do resultado analítico. Se nenhum dos fatores estudados e plausíveis de afetar o resultado da medição tiver efeito significativo, o procedimento analítico é considerado robusto.

Um procedimento robusto produz resultados mais reprodutíveis ao longo do tempo e, principalmente, apresenta maior portabilidade para outro laboratório dentro da organização, no país ou até no exterior.

A portabilidade é a característica de um procedimento analítico que permite sua transferência para outro local, sem perda de suas características metrológicas e de desempenho analítico. Por isso, a implementação de um novo procedimento analítico reconhecidamente robusto se torna uma tarefa grandemente facilitada, e produzirá resultados tão confiáveis quanto no laboratório original onde foi desenvolvido e/ou validado. Assim, a robustez pode ser um dos fatores importantes a considerar, após a veracidade e a precisão, quando da escolha de um procedimento analítico novo para o laboratório.

Para o estudo de robustez é feita a análise de um MRC, ou um padrão, ou uma matriz branca fortificada, ou um extrato de matriz branca fortificada, ou uma Amostra de Controle de Qualidade (ACQ), em no mínimo dois níveis para cada fator que pode afetar o resultado da análise. É recomendável replicar os experimentos.

As diferenças entre os níveis estudados dos fatores devem representar a variabilidade com a qual esses fatores poderão variar durante a rotina de análises do laboratório.

Avalia-se a variação de uma função resposta, ou simplesmente resposta, do procedimento analítico em função das variações nos fatores que podem influenciar a resposta do procedimento analítico.

Como o objetivo da validação é demonstrar a adequação ao propósito de uso do resultado analítico, a função resposta a estudar deve contemplar as características metrológicas do resultado analítico, como a sua veracidade (erro sistemático ou tendência ou correção ou recuperação) ou a sua precisão intermediária ou, preferencialmente, uma combinação dessas duas características metrológicas, tal como a soma do erro sistemático com a precisão intermediária.

As informações do desempenho do procedimento analítico obtidas durante a fase de desenvolvimento, ou de otimização, ou de pré-validação, são de grande valia na escolha dos fatores a estudar durante essa fase.

Alguns dos fatores que podem afetar o resultado analítico são: condições de armazenamento, condições ambientais e/ou de preparação da amostra, origem e estabilidade dos reagentes, composição da amostra, tamanho (massa ou volume) da amostra, as condições de pH, temperatura, tempo, composição da mistura de solventes ou reagentes para a abertura/extração/digestão/limpeza/derivatização da amostra e regulagens (*set up*) do instrumento de medição analítica, entre outras.

As etapas do estudo de robustez são:

1. Identificar os possíveis fatores que possam influenciar os resultados.

2. Variar levemente cada fator em pelo menos dois níveis (tratamentos). Essas variações devem ser da mesma ordem daquelas que podem ocorrer durante o uso do procedimento analítico na rotina.
3. Realizar um teste de robustez utilizando a abordagem clássica, variando um fator de cada vez, ou utilizando a abordagem do planejamento fatorial completo ou fracionário (ver Anexo XII). Essa última abordagem é preferível, uma vez que exige menor número de experimentos, é mais rápida, eficiente e econômica.
4. Identificados na etapa anterior os fatores que têm efeitos mais significativos sobre o resultado da medição analítica, um novo estudo mais detalhado é realizado apenas com esses fatores mais significantes. O objetivo é estabelecer a faixa de variação aceitável desses fatores, de forma que não comprometa a veracidade e a precisão do resultado analítico.
5. Os fatores que afetam significativamente o resultado analítico e as faixas permitidas de suas variações devem ser explicitamente identificados no procedimento de análise, ressaltando-se os cuidados especiais com esses fatores.

Caso seja verificado através do estudo de robustez que a função resposta do procedimento analítico não é influenciada ou é fracamente influenciada por pequenas variações dos fatores, as condições experimentais, o procedimento analítico é classificado como: "Procedimento analítico robusto e adequado para as análises de rotina". Neste caso, relatar apenas as restrições de variabilidade das condições experimentais que mais influenciam o resultado analítico, estabelecendo as suas variações permitidas para uso do procedimento analítico na rotina.

Caso seja verificado pelo estudo de robustez que a função resposta do procedimento analítico é fortemente influenciada por pequenas variações dos fatores, as condições experimentais, o procedimento analítico poderá ser classificado em uma das seguintes classes:

1. *Procedimento analítico não robusto e inadequado para as análises de rotina.*
2. *Procedimento analítico de uso restrito* – neste caso deverão ser detalhadamente relatadas as restrições de variabilidade e de controle das condições experimentais que serão permitidas para uso do procedimento analítico.
3. *Procedimento analítico não robusto e inadequado para as análises de rotina* – na faixa de variação estudada dos fatores de influência.

O escopo do procedimento analítico consiste na relação dos fatores e nas faixas de variação autorizadas para cada fator, que estabelece as

condições dentro das quais o procedimento analítico pode ser usado de forma a produzir resultados metrologicamente corretos e confiáveis.

O escopo é em parte determinado pelo estudo de robustez, uma vez que este determina as condições de uso confiável do procedimento analítico.

Durante a validação do procedimento analítico, pode-se fazer um estudo de robustez simplificado, apenas identificando os fatores que mais influenciam o resultado analítico e determinando as faixas de variação desses fatores.

O estudo de robustez mais abrangente e detalhado dos fatores que mais influenciam o resultado analítico pode ser feito concomitantemente com o uso do procedimento analítico na rotina.

II.10 Expressão e Interpretação dos Resultados de Medições

Os resultados das concentrações de cada analito em cada amostra devem ser acompanhados de suas incertezas e da unidade de medição conforme o formato: *Nome ou símbolo do mensurando = (valor da concentração do analito ± incerteza) unidades.*

Os resultados devem também conter, conforme o caso, a seguinte expressão ou assemelhada: *O valor numérico após o sinal ± refere-se à incerteza padrão combinada.*

Exemplos de resultado de análise, conforme dados da Figura 10 e da Tabela 7:

1. Concentração de cádmio = $(0,0730 \pm 0,0057)$ mg/kg, não corrigida pela recuperação, em que o valor numérico após o sinal \pm refere-se à incerteza padrão combinada não considerando a incerteza de amostragem.
2. Concentração de cádmio = $(0,0730 \pm 0,012)$ mg/kg, não corrigida pela recuperação, na qual o valor numérico após o sinal \pm refere-se à incerteza expandida para uma probabilidade de abrangência de 95% e fator de abrangência $k = 2,1098$, não considerando a incerteza de amostragem.
3. Concentração de cádmio = $(0,0730 \pm 0,0076)$ mg/kg, não corrigida pela recuperação, em que o valor numérico após o sinal \pm refere-se à incerteza padrão combinada, considerando a incerteza de amostragem.

4. Concentração de cádmio = $(0,0695 \pm 0,012)$ mg/kg, corrigida pelo fator de recuperação $f_{rec} = 1,05$ (105%), em que o valor numérico após o sinal \pm refere-se à incerteza expandida para uma probabilidade de abrangência de 95% e fator de abrangência $k = 2$, não considerando a incerteza de amostragem.

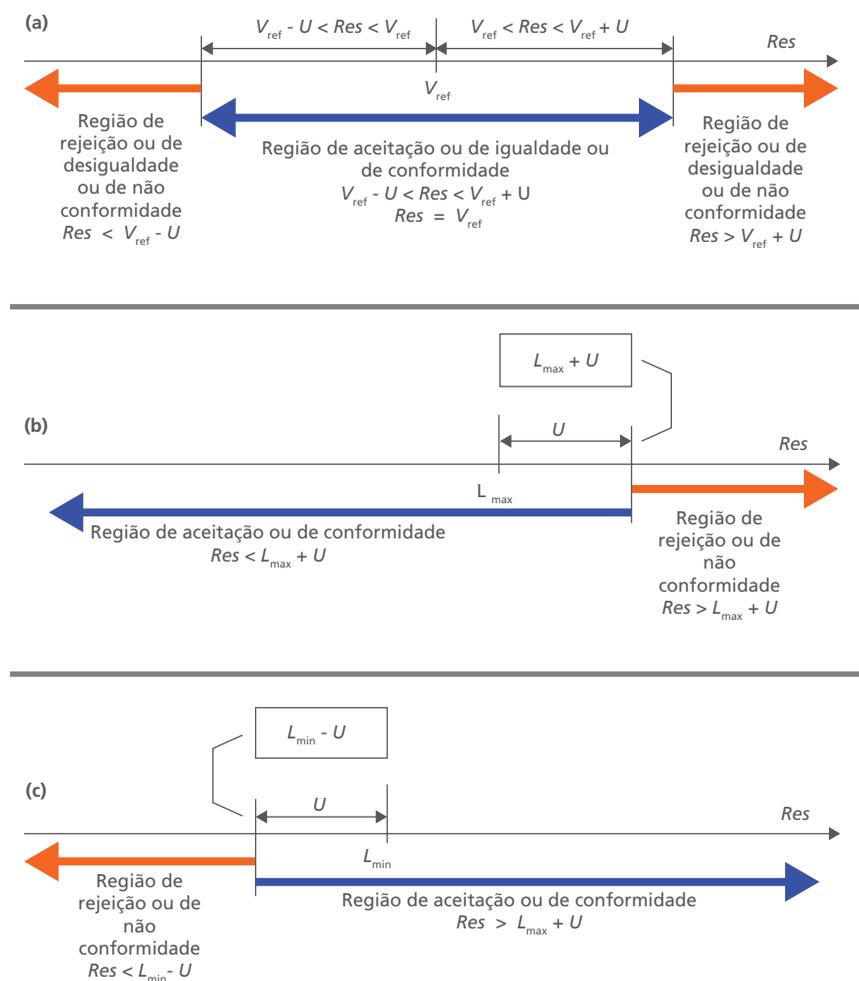
A interpretação de um resultado de medição, quando de sua comparação com um valor de referência ou com limites mínimos e/ou máximos estabelecidos e consequente, a tomada de decisão deve levar em consideração a sua incerteza de medição. Neste sentido, *Regras de decisão* devem ser previamente estabelecidas por lei, norma, contrato ou acordo entre as partes envolvidas.

O estabelecimento das *Regras de decisão* deve levar em consideração as especificações para o produto e a probabilidade de se tomar decisões erradas; a probabilidade de falsa rejeição (falsa não conformidade, falso não conforme, falso positivo) ou a probabilidade de falsa aceitação (falsa conformidade ou falso negativo). Isto é, essas regras dependem de o fornecedor ou o comprador correrem riscos.

Algumas possibilidades de *Regras de decisão* contemplando bandas de segurança ou de salvaguarda [18] são representadas na Figura 13. Outras possibilidades mais complexas de *Regras de decisão* podem ser estabelecidas, por exemplo, incluindo a necessidade de mais medições, ou a comparação com outra especificação alternativa, definindo valor máximo para a incerteza de medição etc.

Um órgão oficial fiscalizador pode adotar a posição de comprador ou de vendedor conforme a decisão a tomar. Por exemplo: em autuações, o órgão fiscalizador pode adotar a posição de um comprador, evitando punir injustamente o fiscalizado, se outros riscos mais importantes não precisam ser considerados. No entanto, quando a tomada de decisão visa reduzir os riscos dos consumidores, o órgão fiscalizador deve adotar a posição de vendedor, adotando a menor região de conformidade, como por exemplo, na Figura 13.2(d), na Figura 13.2(e) ou na Figura 13.3(g), conforme o caso.

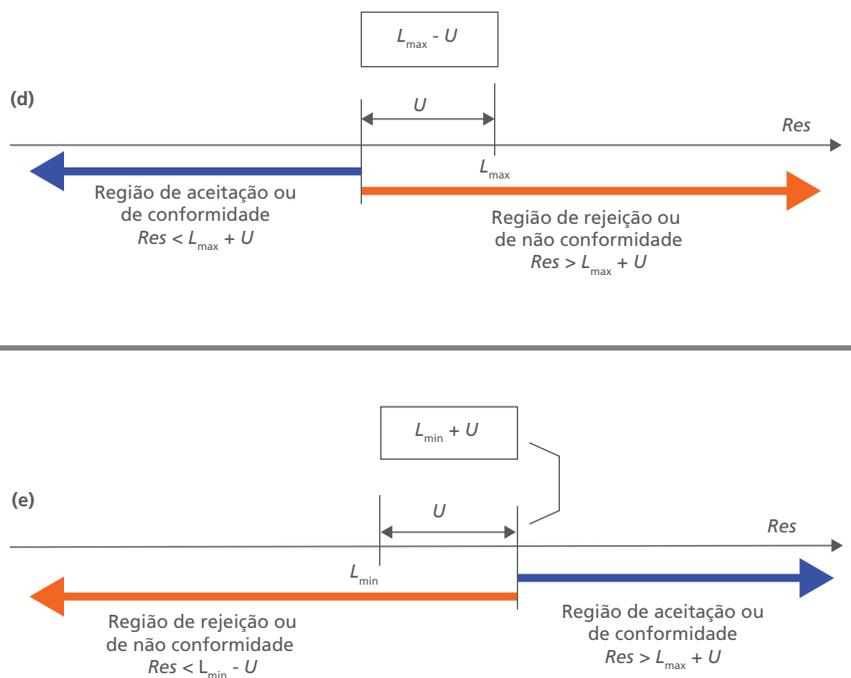
Figura 13.1 – Interpretação de um resultado de medição em diferentes possibilidades de comparações



Notas: A incerteza expandida U é igual a múltiplo k da incerteza padrão combinada u do resultado analítico: $U = ku$. Em geral, $k = 2$.

- (a) Igualdade entre o resultado Res e um valor de referência V_{ref} .
- (b) Comparação do resultado Res com um limite máximo L_{max} , minimizando o risco de falso conforme do comprador.
- (c) Comparação do resultado Res com um limite mínimo L_{min} , minimizando o risco de falso conforme do comprador.

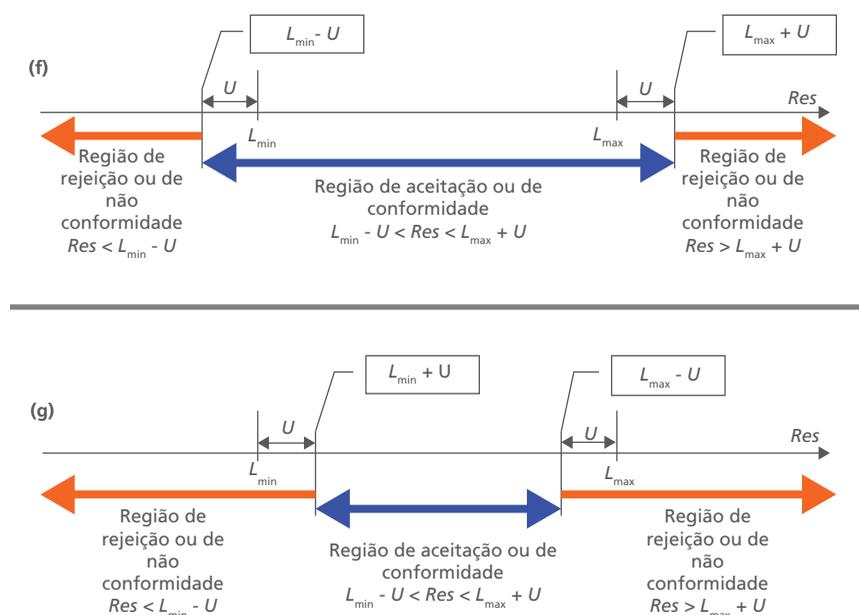
Figura 13.2 – Interpretação de um resultado de medição em diferentes possibilidades de comparações



Notas: A incerteza expandida U é igual ao múltiplo k da incerteza padrão combinada u do resultado analítico: $U = ku$. Em geral $k = 2$.

- (d) Comparação do resultado Res com um limite máximo L_{max} , minimizando o risco de falso conforme do vendedor.
- (e) Comparação do resultado Res com uma faixa, intervalo, com limite mínimo e máximo, minimizando o risco do vendedor.

Figura 13.3 – Interpretação de um resultado de medição em diferentes possibilidades de comparações



Notas: A incerteza expandida U é igual a múltiplo k da incerteza padrão combinada u do resultado analítico: $U = ku$. Em geral $k = 2$.

- (f) Comparação do resultado Res com uma faixa, intervalo, com limite mínimo e máximo, minimizando o risco de falso conforme do comprador.
- (g) Comparação do resultado Res com uma faixa, intervalo, com limite mínimo e máximo, minimizando o risco de falso não conforme do vendedor.

II.11 Relatório de Validação

Após a validação, um documento deve ser redigido no qual os desempenhos alcançados pelo procedimento validado são relatados. Esse documento deve conter o maior número possível de informações de forma a permitir uma forte evidência para demonstrar a qualidade do procedimento validado e sua adequação ao uso pretendido. Algumas das informações que devem constar deste relatório final de validação são:

1. Identificação do Laboratório, local, período de realização dos experimentos de validação, data de sua conclusão, incluindo a confecção do relatório final;
2. Nomes e assinaturas do gerente da qualidade, gerente técnico, aprovação do documento, relação dos técnicos que participaram da validação.

3. A identificação do(s) analito(s) validados e a sua forma de apresentação nas matrizes validadas – e.g., sólida/naturalmente contaminada/solúvel em/suspensão em/digerível em/inclusão em/resíduo de/contaminação de/metabólico de/subproduto de/degradação de etc. – e, quando apropriado, incluir a especificação, por exemplo: arsênico total, metil mercúrio, Cr(III), FeO.
4. Declaração do uso pretendido, estabelecendo requisitos de tendência e incertezas máximas aceitáveis. Por exemplo: “A análise de triagem de micotoxinas com teor entre 0,1 a 50 ng/g em sementes alimentícias com faixa de recuperação permitida entre 60% e 120% e incerteza expandida relativa máxima de 25%”.
5. Especificar a faixa de concentração validada de cada analito (e.g., “0–500 ng/g”) para cada matriz do conjunto de matrizes validadas e explicitamente especificadas.
6. Um protocolo descrevendo equipamentos, materiais, reagentes, calibração dos instrumentos de medição analítica qualificados para o procedimento analítico validado.
7. Recomendações de segurança necessárias para equipamentos e pessoas.
8. Procedimento analítico final e definitivo, no qual, além de todas as etapas detalhadamente descritas, devem estar relatadas todas as recomendações de cuidados especiais em relação ao controle e às faixas aceitáveis dos fatores que têm efeito significativo no resultado analítico, conforme detectado no estudo de robustez. Por exemplo: *i* - Extração temperatura à $(60 \pm 5)^\circ\text{C}$ por (50 ± 5) min sob agitação vigorosa; *ii* - Fluxo de gás carreador de (80 ± 10) mL/minuto etc.
9. Os registros, as análises estatísticas e o status do critério de aceitação para cada parâmetro de desempenho estudado.
10. Uma declaração relativa ao atendimento ou não do uso pretendido.

Evidentemente, outras informações podem estar presentes nesse relatório.

PARTE 3
Estudios de Estabilidad

Parte III

Estudos de Estabilidade

Os procedimentos apresentados objetivam determinar a estabilidade das soluções padrão, dos analitos nas matrizes de origem animal ou vegetal e dos padrões de trabalho.

A estabilidade do analito nas mais diversas situações deve ser determinada de modo a reproduzir as reais condições de armazenamento, manuseio e análise; levando-se em consideração a matriz específica na qual o analito deverá ser pesquisado.

Dados de publicações científicas podem ser utilizados para demonstrar a estabilidade do analito em solução e/ou na matriz, desde que haja similaridade entre as condições estabelecidas no estudo e no laboratório em questão.

Os estudos de estabilidade também podem ser realizados em parceria por laboratórios da Rede Brasileira de Laboratórios Agropecuários, e os dados decorrentes poderão ser utilizados para demonstrar a estabilidade do analito nas diversas situações. Para tanto, é necessário que haja similaridade entre as condições do analito nos laboratórios que realizam os estudos.

As estabilidades dos padrões de calibração e padrões internos, em solução, devem ser avaliadas.

Os dados podem ser apresentados graficamente, de forma a facilitar a avaliação.

Admite-se um padrão como estável quando for observada uma degradação máxima de até 5% em relação a uma referência recém-preparada.

III.1 Estabilidade do Analito na Matriz não Processada

O estudo visa a demonstrar a estabilidade dos analitos nas matrizes no período entre o recebimento da amostra e o início da análise.

O período de tempo estudado deve ser superior ao tempo máximo previsto de armazenamento para o início da análise da amostra.

Este estudo deve, preferencialmente, ser realizado com o uso de matrizes naturalmente contaminadas.

É sugerido que o estudo de estabilidade na matriz não processada seja realizado de forma exploratória, conforme demanda do Mapa.

Para tal, o laboratório deve reservar amostras naturalmente contaminadas, armazenando-as sob temperaturas de congelamento e analisá-las em no mínimo seis réplicas, periodicamente, em intervalos de tempo predeterminados.

O analito é considerado estável por um intervalo de tempo, enquanto os resultados dessas análises indicarem igualdade estatística com o primeiro resultado do início do estudo.

Pode-se usar o teste hipótese de t de Student, usando as equações eq. (1) a eq. (5), como mostrado no item 4.2 – *Procedimentos de Avaliação e Critérios de Aceitação do Efeito Matriz*, da Parte II, para se verificar essa igualdade de resultados.

Neste caso, os desvios-padrão (variâncias) no numerador e no denominador que aparecem nas equações (1), (3), (4) e (5) são aqueles obtidos das análises replicadas em dois momentos diferentes do estudo de estabilidade.

O estudo pode não ser realizado devido à sua impraticabilidade para algumas matrizes.

III.2 Estabilidade do Analito na Matriz Processada

O estudo visa a demonstrar a estabilidade dos analitos nas matrizes no período entre o processamento da amostra e o início da análise.

A estabilidade do analito na matriz processada deve ser realizada sempre que o laboratório adote a prática na qual a amostra não é analisada imediatamente após o processamento.

O período de tempo estudado deve ser superior ao tempo máximo previsto de armazenamento para o início da análise da matriz processada.

Devem-se tomar amostras de matriz branca homogeneizada. O material deve ser dividido em alíquotas, cada uma fortificada com a substância a ser avaliada.

Armazenar as alíquotas sob as condições nas quais o laboratório as armazena, no período entre o processamento da amostra e o início da análise.

Analisar seis réplicas das alíquotas armazenadas, periodicamente, em intervalos de tempo predeterminados, e definir o tempo máximo de estabilidade dos analitos estudados procedendo a testes *t* como na seção 1 – *Estabilidade do Analito na Matriz não Processada*, da Parte III.

Não é necessário provar a estabilidade dos analitos na matriz processada caso o laboratório inicie a análise da amostra imediatamente após seu processamento.

III.3 Estabilidade do Analito no Extrato ou na Solução de Abertura de Amostra

O estudo visa a demonstrar a estabilidade dos analitos nos extratos no período entre a extração/digestão da amostra e o início da análise instrumental.

A estabilidade do analito no extrato deve ser realizada sempre que o laboratório adote a prática na qual o extrato não é analisado imediatamente após a extração/digestão.

O período de tempo estudado deve ser superior à duração da corrida analítica ou ao tempo máximo previsto de armazenamento e corrida analítica.

Os resultados devem ser comparados com aqueles obtidos da análise dos extratos imediatamente após a extração/digestão ou abertura de amostra.

Devem-se tomar extratos de matriz branca. O extrato deve ser adicionado com a substância a ser avaliada em uma concentração que contemple a faixa de trabalho.

Armazenar os extratos sob as condições nas quais o laboratório os armazena, no período entre a extração/digestão da amostra e a análise instrumental.

Analisar no mínimo seis réplicas dos extratos armazenados periodicamente, em intervalos de tempo predeterminados, e definir o tempo máximo de estabilidade dos analitos estudados procedendo a testes *t* como na seção 1 – *Estabilidade do Analito na Matriz não Processada*, da Parte III.

Não é necessário provar a estabilidade dos analitos caso o laboratório inicie a análise da amostra imediatamente após a extração/digestão.

III.4 Estabilidade das Soluções Padrão

A estabilidade das soluções padrão deve ser demonstrada sempre que não houver alguma referência prévia para o seu prazo de validade.

A estabilidade da solução padrão deve ser estudada nas condições e no período de armazenamento nos quais a solução padrão é armazenada no laboratório.

Recomenda-se comparar a resposta instrumental gerada por uma solução padrão armazenada com a resposta instrumental gerada por uma solução padrão recém-preparada (a partir de um padrão dentro do prazo de validade).

O estudo deve ser realizado em todos os tipos de solução padrão, partindo da solução padrão estoque, passando pela solução padrão intermediária, até a solução padrão de trabalho.

Caso o estudo de estabilidade seja feito em uma solução diluída, essa estabilidade pode ser considerada para soluções mais concentradas, desde que ambas sejam armazenadas sob as mesmas condições.

O procedimento é o mesmo da seção anterior, comparando-se com testes t os sinais de sextuplicatas obtidos em diferentes períodos de armazenamento com o sinal da solução recém-preparada.

III.5 Estabilidade dos Padrões de Trabalho e dos Materiais de Referência não Certificados

Padrões de trabalho e materiais de referência não certificados poderão ter o prazo de validade expandido, desde que seja realizado o monitoramento contínuo de sua estabilidade, conforme recomendado a seguir.

Para monitoramento contínuo da estabilidade desses padrões deve-se elaborar uma planilha ou gráfico-controle para cada padrão, constando o registro da relação de áreas (ou alturas) dos picos obtidos cromatograficamente, entre o padrão em estudo e um padrão de referência. Dessa forma, os seguintes passos devem ser seguidos e registrados:

1. Injetar no cromatógrafo uma solução contendo um padrão de referência e o padrão de trabalho utilizado na rotina do laboratório, ambos dentro do prazo de validade indicado pelo fornecedor.
2. Registrar em um gráfico-controle a relação das áreas (ou alturas) entre os dois picos gerados.

3. Quando o padrão de trabalho utilizado na rotina expirar o prazo de validade, realizar o mesmo estudo descrito acima, utilizando sempre o padrão de referência dentro da validade.

Caso a diferença entre as áreas seja inferior a 5%, uma nova data de validade poderá ser estabelecida para o padrão em estudo. Sugere-se expandir a validade por mais três meses, repetir os procedimentos descritos acima e, caso a relação das áreas continue inferior a 5%, expandir a validade por mais três meses. E assim proceder, sucessivamente.

O padrão de referência pode ser o mesmo utilizado como padrão interno (*surrogate*) ou como controlador do equipamento. Por exemplo, quinifos ou propoxur para cromatografia líquida e bromofós ou clorpirifos metílico para cromatografia gasosa.

O padrão de referência utilizado no estudo deve sempre estar dentro do seu prazo de validade.

PARTE 4
**A Rotina Analítica e o Controle
de Qualidade Analítica (CQA)**

Parte IV

A Rotina Analítica e o Controle de Qualidade Analítica (CQA)

Como a validação não garante que o desempenho do método na rotina analítica do laboratório permanecerá o mesmo perpetuamente, faz-se necessário monitorar as corridas analíticas para garantir que os resultados continuem válidos no decorrer do tempo, de acordo com o que foi estabelecido durante a validação.

Todos os procedimentos adotados na rotina analítica deverão ser respaldados pelos estudos de validação do procedimento analítico.

A curva de calibração utilizada na rotina deve conter pelo menos cinco níveis (incluindo, quando necessário, o zero), devendo esta ter a mesma faixa de trabalho estudada na validação do método.

No mínimo uma Amostra Controle de Qualidade (ACQ) Branca de Matriz deve estar presente por batelada de amostras.

As ACQ de Matriz Branca Fortificada devem simular níveis de concentração de interesse. Para tal, fortificações devem ser feitas em nível baixo, médio e alto, sendo que o LMR/TMC deve estar representado em um desses níveis ou próximo a eles.

No mínimo uma ACQ de Matriz Branca Fortificada deve estar presente por batelada de amostra. Os níveis de fortificação devem ser periodicamente alternados para que o estudo contemple os três níveis em um curto intervalo de tempo.

Com esse objetivo, as ACQs devem ser intercaladas entre as amostras. Cada corrida analítica deve ter a seguinte composição:

1. Branco de reagente;
2. Curva de calibração;
3. Amostras;
4. ACQs (matriz branca fortificada e matriz branca), intercalados às amostras.

Os resultados das ACQ servirão de base para aceitação ou rejeição da batelada analítica.

Para tanto:

1. As ACQ devem ser incorporadas em intervalos regulares, dependendo do número total de amostras da batelada.
2. Os dados devem, preferencialmente, ser registrados graficamente para uma melhor visualização dos resultados.

Os resultados obtidos nas ACQs **correto** podem ser utilizados para estimar continuamente a precisão intermediária ou reprodutibilidade intralaboratorial e a incerteza do procedimento analítico, bem como os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$.

Os critérios de aceitabilidade dos resultados das ACQs são os mesmos de quando da validação e estão estabelecidos nas seções específicas.

Adicionalmente, a cada quatro meses, os laboratórios deverão realizar uma verificação de desempenho (*internal check samples*) por intermédio de amostras rigorosamente elaboradas e distribuídas para serem analisadas junto com as amostras da rotina analítica. O objetivo é estabelecer um controle interno e independente, ou seja, sem o conhecimento prévio dos analistas diretamente envolvidos nas análises.

Os resultados das medições de amostras de ensaio de rotina oriundos de curvas analíticas obtidas a partir de padrões de calibração em solução, ou a partir de extrato de matriz branca fortificado com os padrões de calibração, podem ser corrigidos com a média das correções de recuperação ou a média dos fatores de recuperação obtidos naquela batelada de análises no nível de concentração mais próximo do resultado da amostra de ensaio de rotina.

A correção de recuperação ou o fator de recuperação médios da batelada de análises no nível de concentração mais próximo do resultado da amostra de ensaio deverá sempre ser relatado juntamente com o resultado da medição.

O laboratório deve fazer uso, o mais abundantemente possível, de cartas de controle para mostrar de forma visual e rápida que o sistema de medição analítica está sob controle estatístico. Recomenda-se que no mínimo sejam feitas cartas de controle do intercepto e da inclinação das curvas de calibração da rotina, cartas de controle das recuperações obtidas nas ACQ e da precisão de repetitividade e/ou precisão intermediária (reprodutibilidade intralaboratorial).

A critério do laboratório, outras cartas de controle podem ser elaboradas, por exemplo, com os valores de LD, LQ, $CC\alpha$ $CC\beta$, da resposta instrumental do instrumento analítico em algum controle, da área, da intensidade ou largura a meia altura de um dado pico cromatográfico de controle, entre outros.

PARTE 5
Ampliação do Escopo do
Procedimento Analítico Validado

Parte V

Ampliação do Escopo do Procedimento Analítico Validado: Inclusão de Nova Matriz ou Novo Analito em Procedimento Analítico Validado

No caso de procedimento analítico já credenciado, o laboratório poderá solicitar ao Mapa a extensão de escopo incluindo novo analito ou matriz.

Entende-se aqui como nova matriz, por exemplo, tecidos diferentes de uma mesma espécie (e.g., fígado e rim bovino) ou o mesmo tecido de espécies diferentes (e.g., rim bovino e rim suíno) ou até tecidos diferentes de espécies diferentes (e.g., rim bovino e fígado suíno).

No contexto deste Manual, chamaremos de “novo analito” ou de “nova matriz” aquele(a) que se deseja incluir no escopo do procedimento analítico originalmente validado, e de velho “analito” ou de “velha matriz” aquele(a) que foi usado(a) na validação original do procedimento analítico.

Para incluir novos analitos, em procedimento analítico mono ou multirresíduo validado, os parâmetros de validação devem ser definidos para os novos analitos e o desempenho do procedimento analítico, em relação aos demais analitos, necessita ser reavaliado de forma a demonstrar que a inclusão do novo analito não altera o desempenho geral do procedimento analítico para os velhos analitos.

Para a inclusão de nova matriz ou novos analitos, os seguintes estudos devem ser apresentados: Linearidade; Seletividade/Efeito Matriz; Veracidade/Recuperação e Precisão, de forma a comprovar que a inclusão de nova matriz não altera o desempenho do método.

A determinação de $CC\alpha$ e $CC\beta$ e da incerteza de medição deve ser refeita para a nova combinação matriz-analito.

As curvas de calibração envolvidas nesses estudos devem contemplar uma faixa de calibração que inclua os níveis de interesse (LMR ou TMC ou LMDR ou LQ) de ambas as matrizes ou, alternativamente, os níveis de concentração do analito na nova matriz podem ser diluídos ou pré-concentrados até atingirem a faixa de calibração na velha matriz.

Para a inclusão da nova matriz, o estudo comparativo do efeito de matriz entre as duas curvas de calibração envolvendo a nova matriz e a velha matriz é semelhante ao estudo apresentado na seção 4 – *Seletividade e Efeito Matriz*, da Parte II.

Para tanto, aplica-se o teste t para os parâmetros a e b das duas curvas analíticas para cada analito do escopo do método validado.

V.1 Procedimento de Determinação do Efeito de Matriz para a Inclusão de Nova Matriz ou Novo Analito Comparando-se Duas Curvas de Calibração

Duas matrizes brancas ou extratos de matrizes brancas devem ser fortificadas em pelo menos cinco níveis de concentração, obtendo-se cinco ou mais níveis de calibração. Os níveis de concentração devem contemplar os respectivos níveis de interesse do analito estabelecidos para cada matriz.

A injeção (leitura) no instrumento de medição analítica deve ser feita em pelo menos seis réplicas por nível de concentração em ordem aleatória.

Após a realização das duas curvas de calibração, aplicar o teste t de Student para verificar a igualdade estatística dos interceptos a_1 e a_2 e das inclinações b_1 e b_2 das curvas de calibração com a velha e a nova matriz da seguinte forma:

Aplicar o teste F (Fischer-Snedecor), homogeneidade de variâncias, para verificar se as variâncias dos interceptos da curva de calibração (de calibração) da velha e da nova matriz são estatisticamente iguais, calculando-se:

$$F_{a,\text{calc}} = \frac{s_{a1}^2}{s_{a2}^2} \quad (25)$$

Onde:

- s_{a1}^2 e s_{a2}^2 são as variâncias dos interceptos da curva de calibração (de calibração) da velha e da nova matriz com a maior variância no numerador.

Ao mesmo tempo obtém-se o valor tabelado de $F_{a,\text{crit},\alpha,v_1,v_2}$ com $v_1 = N_{x1} - 1$ graus de liberdade no numerador e $v_2 = N_{x2} - 1$ graus de liberdade no denominador. Adotar um nível de confiança de 95%.

Se $F_{a,\text{calc}}$ for menor que o $F_{a,\text{crit},\alpha,v_1,v_2}$ as variâncias podem ser consideradas iguais. Neste caso, os desvios-padrão dos dois interceptos são agrupados para formar o desvio-padrão agrupado s_{ap} , e a igualdade dos dois interceptos é testada com a distribuição t de Student, comparação de médias.

Desse modo, calculam-se:

$$t_{a,\text{calc}} = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{s_{a,p}^2 \left(\frac{1}{N_{x1}} + \frac{1}{N_{x2}} \right)}} \quad (26)$$

Onde:

$$s_{a,p}^2 = \frac{(N_{x1} - 1)s_{a1}^2 + (N_{x2} - 1)s_{a2}^2}{(N_{x1} + N_{x2} - 2)} \quad (27)$$

- e N_{x1} e N_{x2} são os números de níveis de concentração independentemente replicados das curvas analíticas (de calibração) na velha e na nova matriz.

O valor tabelado de $t_{a,\alpha,v}$ é obtido a partir da tabela da distribuição de t de Student para $v = N_{x1} + N_{x2} - 2$ graus de liberdade e o nível de significância desejada $\alpha = 0,05$ (5%) ou nível de confiança $1 - \alpha = 0,95$ (95%).

Se $F_{a,\text{calc}}$ for maior que o $F_{a,\text{crit},\alpha,v1,v2}$ tabelado as variâncias não podem ser consideradas estatisticamente iguais. Verifica-se então o efeito de matriz com a distribuição t de Student, usando a seguinte equação:

$$t_{a,\text{calc}} = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{\frac{s_{a1}^2}{N_{x1}} + \frac{s_{a2}^2}{N_{x2}}}} \quad (28)$$

Neste caso, para a obtenção do valor crítico tabelado $t_{a,\text{crit},\alpha,v}$ o número de graus de liberdade é igual a:

$$v = \frac{\left(\frac{s_{a1}^2}{N_{x1}} + \frac{s_{a2}^2}{N_{x2}} \right)^2}{\frac{\left(\frac{s_{a1}^2}{N_{x1}} \right)^2}{N_{x1} + 1} + \frac{\left(\frac{s_{a2}^2}{N_{x2}} \right)^2}{N_{x2} + 1}} - 2 \quad (29)$$

Se o valor de $t_{a,\text{calc}}$ for menor que o $t_{a,\text{crit},\alpha,v}$ pode-se concluir que as curvas analíticas com as duas matrizes têm o mesmo intercepto.

Se o valor de $t_{a,\text{calc}}$ for maior que o $t_{a,\text{crit},\alpha,v}$ pode-se concluir que as curvas analíticas com as duas matrizes têm interceptos diferentes.

Repetir os testes F e t para as inclinações b_1 e b_2 , usando-se as mesmas equações eq. (25) a eq. (29) anteriormente citadas, apenas trocando as letras a por letras b .

Se os interceptos a_1 e a_2 das curvas analíticas (de calibração) da velha e da nova matriz forem iguais entre si e o mesmo ocorrer com as inclinações b_1 e b_2 , então pode-se incluir a nova matriz no escopo do método validado e até mesmo usar a curva de calibração na velha matriz para quantificar o analito na nova matriz. Isto é, não há um efeito de matriz significativo diferenciando a nova matriz da velha matriz.

O estudo do efeito de matriz para a inclusão de novos analitos é semelhante ao descrito nos parágrafos anteriores dessa seção para a inclusão de nova matriz, mas agora comparando a curva de calibração contendo os novos analitos juntamente aos velhos analitos com a curva de calibração contendo apenas os velhos analitos. Sendo as duas curvas de calibração na mesma matriz da validação original para os velhos analitos.

Procede-se então aos testes F e t das equações eq. (25) a eq. (29). Se não houver diferença significativa entre os interceptos a_1 e a_2 , assim como entre as inclinações b_1 e b_2 entre as curvas de calibração contendo apenas os velhos analitos e a curva de calibração contendo simultaneamente os novos e os velhos analitos, então não há efeito de matriz devido à inclusão dos novos analitos.

V.2 Estudo de Veracidade e Precisão para a Inclusão de Nova Matriz ou Novo Analito

Tendo sido aprovada a inclusão da nova matriz ou dos novos analitos através da comparação de suas curvas de calibração, procede-se então aos estudos da veracidade e da precisão para cada analito novo e velho na nova e na velha matriz, conforme mostrado nas seções 5 – *Veracidade/Recuperação* e 6 – *Precisão*, da Parte II.

Esses novos estudos de veracidade e precisão deverão ser feitos em pelo menos três níveis de concentrações diferentes (baixa, média alta) da faixa de trabalho, e no LMR/TMC, ou nos LMR/TMC, se forem distintos nas diferentes matizes.

Se os critérios de veracidade e precisão estabelecidos nas seções 5 – *Veracidade/Recuperação* e 6 – *Precisão*, da Parte II, forem atendidos para a nova matriz ou para os novos analitos em todos os níveis estudados, as inclusões desejadas ao escopo do procedimento analítico poderão ser solicitadas ao Mapa.

Se a veracidade e a precisão dos analitos na nova matriz forem iguais ao da velha matriz, então a análise de rotina dos analitos na nova matriz poderá ser feita com a curva de calibração da velha matriz.

PARTE 6
**Aspectos Específicos da Validação
de Procedimentos Analíticos para as
Diferentes Categorias de Analitos**

Parte VI

Aspectos Específicos da Validação de Procedimentos Analíticos para as Diferentes Categorias de Analitos

Nesta parte, trataremos das especificidades que devem ser prioritariamente observadas na validação dos procedimentos analíticos e durante as determinações de rotina dos resíduos de Medicamentos Veterinários, Praguicidas e Contaminantes Orgânicos e Inorgânicos.

Todos os critérios descritos nesta seção devem ser estimados levando-se em consideração as Partes de II a V deste Manual.

VI.1 Resíduos de Medicamentos Veterinários

VI.1.1 Validações (Requisitos Mínimos e Critérios de Aceitação)

A validação de procedimentos analíticos para determinação de medicamentos veterinários e contaminantes orgânicos em matrizes de origem animal deverá ser conduzida observando-se os seguintes parâmetros de desempenho e os seus respectivos critérios de aceitação:

1. Seletividade;
2. Efeito Matriz;
3. Linearidade;
4. Recuperação/Veracidade;
5. Precisão (Repetitividade);
6. Precisão (Reprodutibilidade Intralaboratorial);
7. Limite de Decisão ($CC\alpha$) e Capacidade de Detecção ($CC\beta$);
8. Robustez.

VI.1.2 Seletividade

Analisar um número apropriado de amostras brancas e averiguar a presença de qualquer interferente (pico cromatográfico, sinal, traço de íon) na região de interesse que se espera a eluição do analito.

Fortificar amostras em branco representativas em uma concentração relevante com substâncias que possam interferir na identificação e/ou na quantificação da substância a analisar.

VI.1.2.1 Critérios de Aceitabilidade da Seletividade

O sinal interferente deve ser $\leq 30\%$ do sinal na concentração do Menor Nível Calibrado.

VI.1.3 Efeito de Matriz

Aplicar os procedimentos de avaliação e os critérios de aceitação da seção 4 – *Seletividade e Efeito Matriz*, da Parte II deste Manual.

Curvas de calibração em solução de analito em solvente puro (CCAS) só poderão ser utilizadas se for demonstrada a não existência de efeito de matriz.

VI.1.4 Linearidade

Construir uma curva de calibração com no mínimo cinco níveis de concentração, compreendendo 1, 1,5 e 2,0 vezes o LMDR ou 0,5, 1,0 e 1,5 vez o LMR, em cinco ou mais replicatas.

A linearidade deve ser avaliada pela inspeção visual do gráfico gerado pela regressão linear e pela avaliação estatística dos resíduos, desde que o coeficiente de correlação ou determinação esteja dentro de critérios aceitáveis.

A curva de calibração não deve ser forçada a passar pela origem.

Calcular o coeficiente de correlação ou determinação.

VI.1.4.1 Critérios de Aceitabilidade

O modelo matemático utilizado para descrever a curva de calibração deve ser adequado.

VI.1.5 Precisão (Repetitividade e Reprodutibilidade Intralaboratorial)

Aplicar os procedimentos de avaliação e critérios de aceitação da seção 6 – *Precisão*, da Parte II deste Manual.

VI.1.6 Veracidade/Recuperação

Com os dados obtidos no ensaio de reprodutibilidade intralaboratorial, calcular a recuperação média, por nível de fortificação.

VI.1.6.1 Critérios de Aceitabilidade

A recuperação média deve estar compreendida nos intervalos especificados na Tabela 5 ao redor de 100%, de acordo com as respectivas concentrações.

VI.1.7 Robustez

Um estudo de robustez deve ser realizado demonstrando a estabilidade do método sob diferentes condições, diferentes fabricantes de insumos e colunas cromatográficas, dentre outras variações.

VI.1.8 Limite de Decisão ($CC\alpha$) e Capacidade de Detecção ($CC\beta$)

Calcular os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ com os dados obtidos durante a validação do método.

Os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ devem incluir a incerteza do método no LMR/LMDR.

O cálculo dos valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ deve ser realizado a partir da análise de amostras fortificadas sob condições de reprodutibilidade.

O laboratório deve garantir que a incerteza do procedimento analítico (desvio-padrão) seja considerada nos cálculos de $CC\alpha$ e $CC\beta$.

Três abordagens podem ser utilizadas para calcular os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$:

1. Resultados obtidos nos ensaios de repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial;
2. Resultados obtidos nas CCMBF em dias diferentes;
3. Resultados obtidos a partir de 20 amostras brancas fortificadas no LMR.

É recomendado que periodicamente os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ sejam atualizados ou confirmados com dados da rotina.

VI.1.8.1 Critérios de Aceitação do $CC\alpha$ e $CC\beta$

$CC\alpha$ e $CC\beta$ devem ser inferiores ao Limite Mínimo de Desempenho Requerido (LMDR), no caso de substâncias banidas.

VI.1.9 Estudos de Estabilidade

A estabilidade dos analitos utilizados nas análises deve ser demonstrada, simulando as condições às quais o laboratório submete as amostras/padrões.

Os estudos de estabilidade podem ser realizados ao longo dos ensaios de rotina.

VI.1.9.1 Critério de Aceitação

Os analitos serão considerados estáveis quando for observada uma degradação máxima de até 5%, em relação a uma referência recém-preparada.

VI.1.10 Extensões de Escopo: Inclusão de Novos Analitos ou de Novas Matrizes

Novos analitos ou matrizes que serão incluídos num método previamente validado necessitam ser validados usando os mesmos parâmetros e critérios definidos anteriormente.

De maneira alternativa, a validação de um novo analito ou matriz pode ser realizada de forma concorrente durante as análises de rotina.

Para a avaliação da linearidade do novo analito ou matriz devem ser adotados os mesmos parâmetros utilizados na validação do método.

Amostras de Controle de Qualidade (ACQ) podem ser utilizadas para avaliação da precisão e da veracidade/recuperação do método na validação concorrente. Para tal, fortificar ACQs em 0,5, 1 e 1,5 vez o LMR ou 1, 1,5 e 2 vezes o LMDR com o analito de interesse.

Repetir o processo em dias diferentes, sob condições de reprodutibilidade intralaboratorial, até que se obtenham seis análises por nível.

Calcular a recuperação média e o coeficiente de variação por nível fortificado.

Calcular os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ com os dados obtidos.

Os valores de recuperação média e de coeficiente de variação obtidos devem estar dentro dos intervalos aceitáveis utilizados na validação do método para o analito ou a matriz original.

VI.1.11 Curvas de Calibração e Amostras de Controle de Qualidade (ACQs) na Rotina Analítica

Todos os procedimentos adotados na rotina analítica deverão ser respaldados pelos estudos de validação do método.

A curva de calibração utilizada na rotina deve conter pelo menos cinco níveis (incluindo o zero), devendo esta ter a mesma faixa de trabalho estudada na validação do método.

Os valores de recuperação obtidos pelos ACQs devem estar dentro dos limites estabelecidos na Tabela 5 ao redor de 100%, de acordo com as respectivas concentrações.

VI.2 Resíduos de Praguicidas (Agrotóxicos)

Devido à grande diversidade de agrotóxicos empregados na agricultura, os procedimentos analíticos multiresíduos são especialmente recomendáveis quando se trata de identificação e quantificação de resíduos em matrizes vegetais.

Quando o método for aplicável a mais de uma matriz, de um mesmo grupo ou de grupos distintos de produtos, seu credenciamento poderá ser solicitado apenas com os dados da validação obtidos com a matriz representativa. Entretanto, durante a rotina analítica, uma validação simultânea ou concorrente deve ser conduzida objetivando avaliar o comportamento do método para as demais matrizes do grupo componente do escopo, de forma a garantir que o método é aplicável de maneira integral a todas as matrizes que fazem parte do escopo.

De maneira sistemática, os parâmetros que impactam na qualidade analítica precisam ser monitorados, conforme descrito na Parte IV – *A Rotina Analítica e o Controle de Qualidade Analítica*, de modo a garantir durante a rotina analítica que o método continua operando dentro dos parâmetros preconizados. Caso seja observada uma tendência significativa ou sistemática de desvio dos parâmetros, procedimentos devem ser adotados no intuito de se identificar e corrigir as causas prováveis do desvio.

VI.2.1 Matrizes Representativas

Para utilização de matriz representativa, os seguintes critérios devem ser observados:

1. No mínimo uma matriz representativa por grupo de produtos deve ser avaliada durante a validação, fato indispensável ao credenciamento de determinado procedimento analítico.
2. Quando um método for implementado na rotina para uma variedade de matrizes de um mesmo grupo, dados complementares deverão ser coletados de forma a consolidar a validação concorrente para todas as matrizes do grupo credenciado/autorizado por intermédio da matriz representativa.
3. Na seleção da matriz representativa, devem ser utilizados os critérios estabelecidos na Tabela A.XI.1 (CAC/GL 40-1993, Rev.1-2003), anexa.
4. Matrizes representativas podem ser utilizadas na validação de métodos mono e multirresíduos.

VI.2.2 Analitos Representativos

1. Todos os analitos contemplados pelo escopo do método necessitam ser validados.
2. Preferencialmente, cada batelada de amostras a ser analisada deve ter uma curva de calibração contemplando todos os analitos do escopo do método. Na impossibilidade desse procedimento, a curva de calibração deve ser construída utilizando pelo menos o número mínimo determinado de analitos representativos.
3. A escolha desses analitos representativos deve ser feita muito cuidadosamente, de modo a prover evidência de que representa o escopo do ensaio. Dessa forma, a escolha deve ser feita de acordo com a probabilidade de se encontrar determinados resíduos na amostra e com as características físico-químicas dos analitos, optando-se pelos analitos mais críticos (e.g., com resposta mais crítica e variável).
4. O número mínimo de curvas de calibração dos analitos a serem determinados deve ser 15 analitos mais 25% do total envolvido no escopo do método. Por exemplo, para um método que possui em seu escopo 100 analitos, a curva de calibração deve ser feita com pelo menos 40 analitos representativos.

5. Se o escopo do método for igual ou inferior a 20 analitos, então todos os analitos devem ser calibrados.
6. Sempre que uma substância ultrapassar seu LMR (não conformidade) e não fizer parte dos analitos representativos calibrados e dos estudos de recuperação da batelada, o resultado deverá ser considerado uma tentativa até a sua calibração. Assim, uma nova calibração deve ser feita, contemplando os analitos não conformes, além de um estudo de recuperação do analito na matriz da respectiva amostra.

VI.2.3 Validações (Requisitos Mínimos e Critérios de Aceitação)

A validação de procedimentos analíticos para determinação de agrotóxicos em matrizes de origem vegetal e animal deverá ser conduzida atendendo aos critérios mínimos dos seguintes parâmetros de desempenho:

1. Seletividade (interferentes);
2. Efeito Matriz;
3. Linearidade;
4. Recuperação/Veracidade;
5. Precisão (Repetitividade e Reprodutibilidade intralaboratorial);
6. Limite de Quantificação;
7. Limite de Detecção;
8. Robustez;
9. Incerteza de Medição.

VI.2.4 Seletividade (Interferentes)

Analisar no mínimo seis amostras "brancas", preferencialmente de seis fontes distintas, e verificar as possíveis interferências (sinais e picos no tempo de retenção em que se prevê a eluição do analito).

VI.2.4.1 Critérios de Aceitabilidade

O sinal do interferente deve ser $\leq 30\%$ do sinal na concentração do Menor Nível Calibrado.

VI.2.5 Efeito Matriz

Aplicar os procedimentos de avaliação e critérios de aceitação da seção 4 – *Seletividade e Efeito Matriz*, na Parte II deste Manual.

Curvas de calibração em solução só poderão ser utilizadas se demonstrada a ausência de efeito matriz.

VI.2.6 Linearidade

Construir uma curva de calibração com no mínimo cinco níveis de concentração, compreendendo os valores de LQ e preferencialmente o LMR, em cinco ou mais replicatas.

Calcular o coeficiente de correlação ou determinação e as porcentagens dos resíduos individuais da curva.

VI.2.6.1 Critérios de Aceitabilidade

Os resíduos de regressão individuais não devem ser maiores que $\pm 20\%$ em relação à resposta obtida na curva de calibração.

Quando esses pontos se aproximam ou excedem o LMR (Limite Máximo de Resíduo), esse valor não deve ser maior que $\pm 10\%$.

Um valor de resíduo, em cada nível, acima de tais limites pode ser rejeitado por um teste de *outlier*, desde que o coeficiente de correlação ou determinação permaneça dentro dos critérios de aceitabilidade do laboratório.

VI.2.7 Veracidade/Recuperação e Precisão (Repetitividade e Reprodutibilidade Intralaboratorial)

Realizar a fortificação de, no mínimo, cinco replicatas de amostras em dois níveis de concentração: em um nível baixo que corresponda ao Limite de Quantificação (LQ) e em um nível mais alto, preferencialmente no LMR.

Para a determinação da reprodutibilidade intralaboratorial (precisão intermediária), repetir os procedimentos acima, no mínimo em mais duas ocasiões (em condições de reprodutibilidade).

Calcular as porcentagens de recuperação e coeficientes de variação (CV) das replicatas por nível de concentração.

VI.2.7.1 Critérios de Aceitabilidade

O procedimento analítico deve ser capaz de recuperar, em cada nível de fortificação e para cada matriz representativa, de 70% a 120% em média para todos os analitos, com uma precisão de $CV \leq 20\%$.

Excepcionalmente, quando a recuperação é baixa, porém consistente (i.e., demonstra boa precisão) e a razão para isso é bem estabelecida (e.g. devido à distribuição do agrotóxico no processo de partição), uma recuperação abaixo de 70% pode ser aceitável. Entretanto, um método mais exato deve ser usado, se praticável.

A reprodutibilidade intralaboratorial deve ser $\leq 20\%$, excluindo qualquer contribuição devida à heterogeneidade da amostra.

VI.2.8 Limites de Quantificação

O limite de quantificação do procedimento analítico é definido como o nível mais baixo no qual foi demonstrado que os critérios de veracidade e precisão foram atendidos, desde que a relação sinal/ruído seja superior a seis ($S/R \geq 6$).

VI.2.9 Limites de Detecção

Limite de detecção do equipamento é definido como a concentração do analito que produz um sinal de três vezes a razão sinal/ruído do equipamento.

Para determinar o limite de detecção, diluir o padrão, a critério do analista, até um nível de concentração detectável.

Injetar em triplicata e utilizar o valor médio.

Estimar a concentração correspondente a um sinal equivalente a três vezes o ruído.

VI.2.10 Robustez

A robustez do método deve ser demonstrada por intermédio de:

1. Estudos de pré-validação e otimização do método;
2. Monitoramento por intermédio dos resultados das amostras controle e verificações de desempenho do sistema.

Outros estudos podem ser realizados, desde que devidamente embasados.

VI.2.11 Incerteza de Medição

A incerteza de medição deve ser estimada segundo procedimento estabelecido na seção 8 – *Incerteza de Medição Analítica (IMA)*, da Parte II, deste Manual.

VI.2.11.1 Critérios de Aceitabilidade

A incerteza de medição expandida (U) relativa deverá ser inferior ou igual a 50% (nível de confiança de 95%).

VI.2.12 Estudos de Estabilidade (Orientação Geral)

O estudo de estabilidade deve simular as condições nas quais o laboratório submete as amostras/padrões (e.g. se o laboratório armazena as amostras congeladas por 24 horas, ele deve provar a estabilidade dos analitos nas amostras nesse período, nas mesmas condições).

Os estudos de estabilidade podem ser realizados de forma concorrente aos ensaios de rotina.

VI.2.13 Extensões de Escopo (Novos Analitos)

Quando se desejar incluir novos analitos a um método previamente validado, o laboratório deve utilizar os mesmos parâmetros e critérios definidos anteriormente para garantir sua adequação (validação) após a inclusão.

De maneira alternativa, a validação de novo analito pode ser realizada de forma concorrente, por intermédio do uso de amostras de controle de qualidade durante as análises de rotina (e.g. com cada lote de amostras da rotina, um ou mais produtos da categoria são fortificados na concentração do LQ e em um nível maior – preferencialmente próximo ao Limite Máximo de resíduo).

Determinar a recuperação e ocorrência de alguma interferência no branco de amostra correspondente.

Após a coleta de cinco dados por nível de fortificação, calcular a recuperação média e a reprodutibilidade intralaboratorial (CV), sendo que estes valores devem atender aos critérios descritos na validação.

VI.2.14 Calibrações Analíticas e Recuperação (Rotina Analítica)

Todos os procedimentos adotados na rotina analítica deverão ser respaldados pelos estudos de validação do método.

Todo resultado acima do LQ deve ser quantificado com o uso de curva de calibração e recuperação obtidas de uma matriz do mesmo grupo, preferencialmente da mesma matriz da amostra quantificada.

VI.2.14.1 Calibração Utilizando um Único Nível de Concentração

A resposta da amostra necessita estar dentro de $\pm 20\%$ da resposta do padrão de calibração, nos casos em que o LMR é ultrapassado.

Se o LMR não for excedido, a resposta da amostra deve estar dentro de $\pm 50\%$ da resposta do padrão de calibração.

VI.2.14.2 Calibração por Interpolação de Dois Níveis de Concentração

Calibração deve ser feita em triplicata.

A diferença entre os dois níveis não pode ser maior que um fator 4.

As respostas médias, obtidas de determinações em replicatas para cada nível, devem indicar linearidade aceitável de resposta, com o maior fator não representando mais de 120% do mais baixo fator de resposta (110%, nos casos em que o LMR é alcançado ou excedido).

VI.2.14.3 Calibração Utilizando Três ou Mais Níveis de Concentração

Neste caso uma função de calibração pode ser utilizada para o cálculo da concentração, dentro da faixa contemplada pelo maior e menor valor da curva de calibração.

A curva não deve ser forçada a passar pela origem.

A linearidade deve ser definida pela inspeção visual do gráfico gerado pela regressão linear simples e/ou pela avaliação estatística dos resíduos de regressão, desde que o coeficiente de correlação ou determinação esteja dentro dos critérios de aceitabilidade preconizados.

Se algum resíduo de regressão, de cada nível de concentração, exceder $\pm 20\%$ ($\pm 10\%$ no LMR ou acima dele), uma calibração alternativa deve ser utilizada. Geralmente, o uso de uma regressão linear ponderada é recomendado.

VI.2.14.4 Frequência Mínima de Calibração na Rotina Analítica

Frequência Mínima de Calibração	Analitos Representativos	Todos os Outros Analitos do Escopo do Método
	A cada batelada de análise	Dentro de um Programa Contínuo de Análise a cada três meses
	Pelo menos um ponto de calibração deve contemplar o LQ	Pelo menos um ponto de calibração deve contemplar o LQ

VI.2.14.5 Determinação da Recuperação na Rotina Analítica

Os níveis de fortificação para determinação das recuperações dos analitos deverão estar na faixa de calibração (e.g. no LMR), ou dentro de um nível de relevância para as amostras analisadas. Esse nível de fortificação deve ser alternado ao longo do tempo.

Sempre que possível, a recuperação dos analitos do escopo deve ser determinada em cada batelada de análise.

Entretanto, a frequência mínima aceitável é:

Frequência Mínima de Determinação da Recuperação	Analitos Representativos	Todos os Outros Analitos do Escopo
	10% dos Analitos representativos (pelo menos cinco em cada batelada de análises).	Dentro de um programa contínuo, para incluir todos os outros analitos, no mínimo a cada 12 meses, mas preferencialmente a cada seis meses.

VI.2.14.5.1 Critérios de Aceitação do Desempenho de Recuperação na Rotina Analítica

A recuperação média é calculada a partir de um grupo de produtos (diferentes matrizes).

Limites aceitáveis para uma única recuperação devem normalmente estar na faixa da recuperação média $\pm 2 \times \% \text{DPR}$ e podem ser ajustados usando dados de reprodutibilidade intralaboratorial (recuperação de rotina) ou repetitividade (validação inicial).

Entretanto, uma faixa generalizada de 60 a 140% pode ser usada na análise de rotina de multirresíduos. Recuperação fora dessa faixa usualmente requer reanálise do grupo, mas pode ser admitida em certos casos justificados. Todavia, recuperações consistentemente elevadas devem ser investigadas.

Se uma tendência significativa ocorrer na recuperação ou se resultados potencialmente inaceitáveis (DPRs maiores que $\pm 20\%$) forem obtidos, as causas devem ser investigadas.

VI.3 Contaminantes Inorgânicos

VI.3.1 Validação (Requisitos Mínimos e Critérios de Aceitação)

Os parâmetros a serem calculados durante o processo de validação de métodos para a determinação de contaminantes inorgânicos em atendimento às demandas do PNCRC são:

1. Linearidade;
2. Seletividade e Efeito Matriz;
3. Limite de detecção;
4. Limite de quantificação;
5. Precisão (repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial);
6. Recuperação/veracidade;
7. Robustez;
8. Incerteza de Medição.

Antes do processamento dos dados obtidos durante a validação, recomenda-se avaliar os desvios-padrão relativos entre as leituras de cada replicata e a existência de valores dispersos (*outliers*).

VI.3.2 Linearidade

A maioria dos equipamentos de medição existentes estabelece a sua faixa dinâmica linear. É necessário, entretanto, verificar até que ponto a faixa de concentração do analito coincide com a faixa dinâmica linear e assegurar que nenhum outro fenômeno tenha impacto indesejável na resposta.

A faixa de trabalho e a curva de calibração devem ser estabelecidas a partir das concentrações nas quais a linearidade é constatada.

A linearidade é obtida por padronização interna e externa, formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real.

A equação da reta que relaciona a resposta instrumental medida com a concentração do analito é:

$$Y = a + BC \quad (30)$$

Onde:

- A = Absorvância;
- b = Inclinação da curva de calibração (sensibilidade);
- c = Concentração / massa;
- a = Interseção com o eixo y , quando $c = 0$.

Os padrões utilizados na construção da curva de calibração em espectrometria atômica devem ser preparados numa solução que corresponda tanto quanto possível à da solução da matriz a analisar (por exemplo, relativo à concentração de ácido ou à composição).

O trabalho em condições de atomização isotérmica (por exemplo, tubo de grafite aquecido transversalmente com plataforma de L'vov integrada) reduz a influência da matriz na atomização do analito quando combinada com o uso de modificador químico e com corretor de fundo Zeeman.

A ausência de interferências deve ser demonstrada para a adoção da padronização externa.

VI.3.2.1 Procedimento de Estimação da Linearidade

Na construção da curva de calibração devem-se usar seis replicatas de cada nível e, pelo menos, cinco níveis de concentração. Cada uma das replicatas deve ser lida três vezes.

Sempre que possível, empregar os níveis equivalentes ao TMC na construção da curva de calibração. Nos casos em que a faixa de concentração do analito não coincidir com a faixa linear do equipamento, deve-se adequar a faixa à capacidade de medição do equipamento.

O primeiro ponto da curva de calibração deve corresponder ao valor do limite de quantificação. O limite superior da curva é geralmente restringido pela resposta do equipamento. Quando possível, o nível de 2,0 TMC deverá ser incluído.

As soluções padrão devem ser preparadas e a curva de calibração deve ser construída da mesma forma como serão empregadas na rotina.

Verificar a ausência de valores discrepantes para cada nível de concentração, utilizando testes estatísticos apropriados. Recomenda-se o emprego do teste de Dixon. Para tanto, os seguintes passos devem ser observados:

1. Ordenar os valores em ordem crescente, isto é: $x_1 < x_2 < x_3 < \dots < x_{n-1} < x_n$;
2. Supor a hipótese de que o menor valor, x_1 , e o maior valor, x_n , são possíveis valores dispersos (*outliers*);
3. Selecionar o risco desejado de falsa rejeição (5%) ou o nível de confiança (95%) ϵ ;
4. Empregar as seguintes equações, de acordo com o tamanho da amostra:

n	Razão	x_n suspeito	x_1 suspeito
$3 \leq n \leq 7$	τ_{10}	$(x_n - x_{n-1}) / (x_n - x_1)$	$(x_2 - x_1) / (x_n - x_1)$
$8 \leq n \leq 10$	τ_{11}	$(x_n - x_{n-1}) / (x_n - x_2)$	$(x_n - x_1) / (x_{n-1} - x_1)$
$11 \leq n \leq 13$	τ_{21}	$(x_n - x_{n-2}) / (x_n - x_2)$	$(x_3 - x_1) / (x_{n-1} - x_1)$
$14 \leq n \leq 25$	τ_{22}	$(x_n - x_{n-2}) / (x_n - x_3)$	$(x_3 - x_1) / (x_{n-2} - x_1)$

5. Comparar as razões calculadas com os valores da tabela de Dixon.

Verificar a homoscedasticidade, a independência e a normalidade da distribuição dos resíduos. Recomenda-se o emprego dos testes: Levene, Durbin-Watson e Anderson-Darling, respectivamente.

Os testes de Dixon, Levene e Durbin-Watson são aplicáveis apenas quando os dados são normais.

Alternativamente, quando possível, a avaliação dos resíduos pode ser realizada a partir dos dados obtidos de, no mínimo, quatro curvas de calibração construídas em dias diferentes. Dessa forma, a avaliação da linearidade refletirá de maneira mais fidedigna a rotina analítica. Nesse caso, o número de replicatas e leituras poderão ser os mesmos utilizados na rotina.

Verificar a homoscedasticidade (homogeneidade das variâncias dos resíduos) dos dados, empregando o teste de Levene.

Dada a variável Y, com m níveis, dividida em j subgrupos, onde n_j é o número de replicatas do nível u , calcular o valor de F:

$$F_c = \frac{\sum_{j=1}^m n_j (\bar{z}_j - \bar{z})^2}{m-1} \cdot \frac{\sum_{j=1}^m \sum_{u=1}^{n_j} (z_{ju} - \bar{z}_j)^2}{\sum_{j=1}^m (n_j - 1)} \quad (31)$$

Onde:

$$z_{ju} = |e_{ju} - \text{mediana}(e_j)|$$

$$e_i = y_i - \hat{y}_i (\text{resíduo})$$

$$\bar{z}_j = \frac{\sum_{u=1}^{n_j} z_{ju}}{n_j}$$

$$\bar{z} = \frac{\sum_{j=1}^m \sum_{u=1}^{n_j} z_{ju}}{\sum_{j=1}^m n_j}$$

Verificar se os resíduos são independentes (aleatórios) pelo emprego do teste de Durbin-Watson. Calcular o valor de D:

$$D = \frac{\sum_{i=2}^N (e_i - e_{i-1})^2}{\sum_{i=1}^N e_i^2} \quad (32)$$

Verificar se os resíduos possuem distribuição normal pelo emprego do teste de Anderson-Darling:

$$e_{(1)} < e_{(2)} < \dots < e_{(N)}$$

1. Ordenar os resíduos.
2. Calcular a probabilidade acumulada do resíduo padronizado:

$$P_{(i)} = P \left\{ \frac{e_{(i)} - \bar{e}}{\sigma_e} \right\}$$

Onde:

P : função de probabilidade acumulada da distribuição Normal Padrão

\bar{e} : média dos resíduos

σ_e : desvio-padrão dos resíduos

3. Calcular as quantidades:

$$h_i = (2i - 1) \left(\ln(p_{(i)}) + \ln(1 - p_{N+1-(i)}) \right)$$

4. Calcular o valor de A:

$$A = -N - \bar{h}$$

Onde:

\bar{h} : média dos valores h_i

5. Calcular a estatística AA:

$$AA = \left(1 + \frac{0.75}{N} + \frac{2.25}{N^2} \right) A$$

6. Calcular o valor do p -teste:

$$p - \text{valor} = \begin{cases} 1 - \exp \left[-13.436 + 101.14(AA) - 223.73(AA)^2 \right]; & \text{se } AA < 0.2 \\ 1 - \exp \left[-8.318 + 42.796(AA) - 59.938(AA)^2 \right]; & \text{se } 0.2 \leq AA < 0.34 \\ \exp \left[0.9177 - 4.279(AA) - 1.38(AA)^2 \right]; & \text{se } 0.34 \leq AA < 0.6 \\ \exp \left[1.2937 - 5.709(AA) + 0.0186(AA)^2 \right]; & \text{se } AA \geq 0.6 \end{cases} \quad (33)$$

VI.3.2.2 Critérios de Aceitação da Linearidade

O desvio-padrão relativo máximo entre as replicatas deve ser estabelecido a partir de dados históricos, dados fornecidos pelo fabricante do equipamento ou em consonância com a técnica utilizada.

A partir do teste de Dixon, se o valor encontrado para a razão for maior que o valor tabelado, então a suposição de *outlier* existe e o valor discrepante deve ser descartado.

Para a avaliação da variância dos resíduos usando o teste de Levene, se:

$F_c \leq F_v$, os resíduos são homocedásticos

$F_c > F_v$, os resíduos são heterocedásticos

Dado o teste de Durbin-Watson, os resíduos serão independentes se $D \geq 1,5$.

Dado o teste de Anderson-Darling os resíduos possuem distribuição Normal, se:

$p\text{-valor} < 0,05$ os resíduos são normais

$p\text{-valor} \geq 0,05$ os resíduos não são normais

Descartados os valores discrepantes e, em se tratando da variância homogênea dos resíduos e distribuição normal dos dados (resíduos aleatórios).

Definir a equação da regressão linear e o coeficiente de determinação, R^2 , a partir do método dos mínimos quadrados ordinários.

O valor mínimo de R^2 deve ser $\geq 0,995$. Caso esse valor não seja obtido, aplicar o teste t para R^2 descrito no Anexo III deste Manual.

VI.3.3 Seletividade e Efeito Matriz

Realizar os procedimentos descritos na seção 4 – *Seletividade e Efeito Matriz*, da Parte II deste Manual, para a estimação do efeito matriz.

Os experimentos para avaliação da seletividade devem ser conduzidos, no mínimo, para os níveis: 0,2 e 1,0 TMC. Recomenda-se o uso do analito em solvente puro e do analito em matriz branca. Dessa forma, parte do experimento poderá ser utilizada para a extensão de escopo.

VI.3.3.1 Critérios de Aceitação da Seletividade e Efeito Matriz

A variação máxima permitida entre a média do valor obtido para cada nível das amostras fortificadas e as soluções padrão não deve ser superior a 10%.

Caso os critérios de aceitação não sejam alcançados, a linearidade, a veracidade e a precisão estarão seriamente comprometidas, sendo neste caso necessário que a curva de calibração seja construída a partir de amostras brancas fortificadas após a digestão.

VI.3.4 Limite de Detecção

Limite de detecção é o teor mínimo a partir do qual é possível deduzir a presença do analito com certeza analítica razoável (95% de confiança).

VI.3.4.1 Procedimento de Avaliação do Limite de Detecção

Realizar a análise de, no mínimo, 21 replicatas da matriz branca e utilizar os valores obtidos para calcular:

$$LD = 3 \times s \quad (34)$$

Onde:

- s = desvio-padrão da média dos ensaios com matriz branca ($n > 20$).

Neste caso, matriz branca é aquela que apresenta concentração que não interfere nos resultados das determinações, podendo considerar, mas não se limitar a:

1. Concentração de um composto na matriz que resulte em um sinal do equipamento muito abaixo ao sinal no LQ;
2. Ausência do sinal.

VI.3.4.2 Critérios de Aceitação do Limite de Detecção

O LD deve ser menor que um décimo do TMC, exceto se o TMC de chumbo for inferior a $100 \mu\text{g kg}^{-1}$. Neste caso, o LD deve ser menor que um quinto do TMC.

VI.3.5 Limite de Quantificação

Teor mínimo medido a partir do qual é possível medir o analito com certeza estatística razoável (95% de confiança).

Se a veracidade e a precisão são constantes em uma gama de concentrações centrada no limite de detecção, o limite de quantificação é numericamente igual a seis ou dez vezes o desvio-padrão da média de ensaios em branco ($n > 20$).

VI.3.5.1 Procedimento para avaliação do Limite de Quantificação

Utilizar os resultados obtidos no ensaio de LD e calcular:

$$LQ = 10 \times s \quad (35)$$

Onde:

- s = desvio-padrão da média dos ensaios com matriz branca ($n > 20$).

VI.3.5.2 Critérios de Aceitação do Limite de Quantificação

O LQ deve ser menos de um quinto do TMC, exceto se o TMC de chumbo for inferior a $100 \mu\text{g kg}^{-1}$. Neste caso, o LQ deve ser igual a menos de dois quintos do TMC.

A confirmação do valor do LQ deve ser realizada, no mínimo com seis replicatas, a partir da matriz branca fortificada no respectivo nível do LQ. Os resultados devem alcançar valores de recuperação de acordo com a Tabela:

c ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Intervalo
≤ 1	- 50% a + 20%
> 1 a 10	- 30% a + 10%
≥ 10	- 20% a + 10%

(CE 657/2002)

VI.3.6 Precisão

A precisão do método é avaliada por meio da repetitividade e da reprodutibilidade intralaboratorial (ou precisão intermediária).

VI.3.6.1 Procedimentos para Avaliação da Repetitividade

Preparar, no mínimo, seis replicatas de matrizes brancas fortificadas em dois níveis de concentração: 0,2 – 1,0 TMC. Realizar o experimento, no mínimo, por duas vezes em condições de repetitividade.

Calcular, a partir dos resultados obtidos, a concentração de cada amostra, a concentração média para cada nível de adição, o desvio-padrão (s_r) e o desvio-padrão relativo em condições de repetitividade (RSD_r).

Calcular o desvio-padrão relativo teórico para cada nível de concentração utilizando a equação de Horwitz:

$$RSD_{Horwitz} = 2^{(1 - 0,5 \log C)} \quad (36)$$

Onde:

- C: é a fração mássica expressa sob a forma de uma potência de dez.
- C: Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) $\times 10^{-9}$

Calcular o valor de HORRAT em condições de repetitividade, $HORRAT_r$, segundo a equação:

$$HORRAT_r = \frac{DPR_r}{PDPR_R} \quad (37)$$

Onde:

- $PDPR_R$: (desvio-padrão relativo predito) = $2 C^{-0,15}$
- C = Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) $\times 10^{-9}$

Calcular o limite de repetitividade r , segundo a equação:

$$r = 2,8 \times S_r \quad (38)$$

VI.3.6.1.1 Critérios de Aceitação da Repetitividade

No caso de análises de amostras em condições de repetitividade, o desvio-padrão relativo (DPR_r) da média deve ser menor que dois terços do valor do DPR_{Horwitz} .

Os valores $HORRAT_r$ devem ser inferiores a 1.

VI.3.6.2 Procedimentos para Avaliação da Reprodutibilidade Intralaboratorial ou Precisão Intermediária

Preparar, no mínimo, seis replicatas de amostras em dois níveis de concentração: 0,2 – 1,0 TMC.

Repetir o experimento por pelo menos duas vezes, em dias diferentes, em condições de reprodutibilidade.

Calcular a concentração obtida para cada replicata e a concentração média, o desvio-padrão, o desvio-padrão relativo de cada dia e o desvio-padrão relativo global para cada nível.

Calcular o valor de $HORRAT$ em condições de reprodutibilidade intralaboratorial, $HORRAT_R$, segundo a equação:

$$HORRAT_R = \frac{DPR_R}{PDPR_R} \quad (39)$$

Onde:

- $PRSD_R$ (desvio-padrão relativo predito) = $2 C^{-0,15}$
- C = Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) $\times 10^{-9}$

Calcular o limite de reprodutibilidade R, segundo a equação:

$$R = 2,8 \times sR \quad (40)$$

VI.3.6.2.1 Critérios de Aceitação para Reprodutibilidade Intralaboratorial

No caso de análises de matrizes brancas fortificadas em condições de reprodutibilidade intralaboratorial, o desvio-padrão relativo (DPR) intralaboratorial dos resultados não deve exceder o valor de $DPR_{Horwitz}$.

Os valores $HORRAT_R$ devem ser inferiores a 1.

VI.3.7 Procedimentos para Estimação da Veracidade/Recuperação utilizando Material de Referência (MR) ou o Material de Referência Certificado (MRC)

O MRC ideal deve apresentar concentrações similares ao TMC na matriz de interesse.

Quando um MRC apropriado não está disponível, podem ser utilizados materiais de referência (MR) obtidos a partir de ensaios de proficiência. No caso do emprego do MR, utilizar a incerteza do valor estimado por consenso.

Analisar, no mínimo, seis replicatas das amostras de MR/MRC em conformidade com as instruções para o método.

Calcular a média, o desvio-padrão e o desvio-padrão relativo.

Calcular a veracidade pela:

$$\%Veracidade = \frac{\text{Concentração média encontrada}}{\text{valor certificado}} \times 100 \quad (41)$$

A veracidade é verificada comparando-se a média \bar{x} dos resultados obtidos para o MR/MRC, com o valor aceito como verdadeiro, μ , conforme procedimento a seguir:

Calcular a incerteza do processo de medição (expressa pelo seu desvio-padrão), σ_D , pela equação:

$$\sigma_D = \sqrt{\sigma_L^2 + \frac{s^2}{n}} \quad (42)$$

Onde:

- σ_L é a incerteza do MR/MRC informada e s é o desvio-padrão das medidas.

VI.3.7.1 Critérios de Aceitação da Veracidade Empregando MRC/MR

Se $|\bar{x} - \mu| \leq 2\sigma_D$, o processo de medição apresenta a veracidade adequada.

Se $|\bar{x} - \mu| > 2\sigma_D$, o processo de medição não apresenta a veracidade adequada.

VI.3.8 Procedimentos para Estimação da Precisão (Repetitividade) utilizando Material de Referência (MR) ou o Material de Referência Certificado (MRC)

A repetitividade de um processo de medição obtida a partir de um MR ou MRC é avaliada comparando-se o desvio-padrão das medidas (s) com o valor requerido do desvio-padrão intralaboratório (σ_{wo}).

O σ_{wo} pode ser calculado a partir da fórmula:

$$\sigma_{wo} = \mu \times RSD \quad (43)$$

Onde:

- μ é o valor de concentração estabelecido para o MR/MRC e RSD é o desvio-padrão relativo aceitável para a faixa de fração mássica que compreende μ , de acordo com a Tabela:

c ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	DPR (%)
≥ 10 a 100	20
> 100 a 1000	15
≥ 1000	10

(CE 657/2002)

Calcular a seguinte razão:

$$\chi_c^2 = \left(\frac{s}{\sigma_{wo}} \right)^2 \quad (44)$$

E comparar com o respectivo valor tabelado, de acordo com a equação:

$$\chi^2_{decisão} = \left(\frac{\chi^2_{(n-1);0,95}}{n-1} \right) \quad (45)$$

Observação: Na tabela, usar o valor da área de probabilidade de 1 - 0,95, ou seja, 0,05 (ou 0,95 quantil da distribuição χ^2).

VI.3.8.1 Critérios de Aceitação da Precisão (Repetitividade) Calculada com o Uso de MR e MRC

Se $\chi_C^2 \leq \chi^2_{decisão}$, o processo de medição apresenta a precisão intralaboratorial requerida.

Se $\chi_C^2 > \chi^2_{decisão}$, o processo de medição não apresenta a precisão intralaboratorial requerida.

Quando os MRCs não estiverem disponíveis, aceita-se que a veracidade das medições seja avaliada por meio da recuperação de quantidades conhecidas do analito adicionadas às matrizes brancas. Chama-se atenção para o fato de que quando, ao contrário da contaminação natural, o analito adicionado não se encontra ligado quimicamente à matriz real, os resultados obtidos com esse método são menos fiáveis.

VI.3.9 Procedimentos para a Avaliação da Recuperação/Veracidade

Utilizar os dados obtidos no ensaio de repetitividade.

Calcular a recuperação média em cada nível, segundo estabelecido na seção 5 – *Veracidade/Recuperação*, da Parte II deste Manual.

VI.3.9.1 Critérios de Aceitação da Recuperação

Os critérios de aceitação estão estabelecidos na seção 5 – *Veracidade/Recuperação*, da Parte II deste Manual.

VI.3.10 Procedimentos para a Avaliação da Robustez

Para avaliação da robustez do método, recomenda-se o teste de Youden. Planejamentos fatoriais fracionários alternativos são descritos no Anexo XII, deste Manual.

Selecionar os fatores a serem avaliados, seus valores nominais (descritos no método) e os respectivos valores de variação, preenchendo uma tabela de acordo com o exemplo:

Fator	Nominal	Variação
Massa de amostra (g)	5,00	7,50
Volume de HNO ₃ (concentrado) (mL)	15,0	12,0
Volume de HCl (concentrado) (mL)	5,0	4,0
Temperatura de aquecimento (°C)	100	120
Tempo de aquecimento (h)	1,0	1,5
Contêiner	Cadinho	Béquer
Agitação	Sim	Não

Executar o ensaio com as combinações da Tabela a seguir em duplicata e aleatoriamente, inclusive entre as replicatas de cada combinação.

Valor do fator	Combinação para os ensaios							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado Observado	S	T	U	V	W	X	Y	Z

Calcular a média e a variância (s^2) para cada combinação de ensaio.

Para determinar o efeito da variação de um fator, encontrar os quatro valores correspondentes às letras maiúsculas e subtrair dos quatro os valores correspondentes às letras minúsculas, segundo a equação:

$$\text{Efeito} \cdot C/c = \left(\frac{S+U+W+Y}{4} \right) - \left(\frac{T+V+X+Z}{4} \right) \quad (46)$$

Calcular o efeito para todos os fatores e construir um gráfico de barras horizontais com os resultados, usando o módulo dos valores.

Estimar a variância de todos os efeitos empregando a equação:

$$s^2 = \frac{(v_1 s_1^2 + v_2 s_2^2 + \dots + v_8 s_8^2)}{v_1 + v_2 + \dots + v_8} \quad (47)$$

Onde:

- $v_i = n_i - 1$ é o número de graus de liberdade de s_i^2 ; a estimativa da variância do i -ésimo ensaio.

Calcular o erro padrão do efeito aplicando a equação:

$$Erro = \frac{\sqrt{s^2}}{2} \quad (48)$$

Multiplicar o valor do erro puro por 2,306 (valor do *t de Student* para oito graus de liberdade, com 95% de confiança, realizados em duplicata) para traçar a linha de significância dos efeitos no gráfico de barras.

Calcular se há diferença estatística significativa (95%) entre os valores dos resultados obtidos para maiúsculas e minúsculas, empregando o teste F.

Calcular o desvio-padrão dos efeitos (s_{D_i}) pela fórmula:

$$S_{D_i} = \sqrt{2 \times \sum \left(\frac{D_i^2}{7} \right)} \quad (49)$$

Onde:

- D_i é valor do efeito (ou diferença).

VI.3.10.1 Critérios de Aceitação da Robustez

Se o valor de algum efeito ultrapassar a linha de significância do gráfico de barras, pode-se considerá-lo significativo e recomenda-se implantar um controle nesta etapa do processo. Caso seja necessário, recomenda-se aprofundar o estudo sobre a influência dos fatores significativos, realizando-se um planejamento fatorial completo para eles.

O método será robusto se F_{tabelado} for maior que $F_{\text{calculado}}$;

O S_{D_i} deve ser menor que o desvio-padrão obtido em condições de reprodutibilidade intralaboratorial.

Sempre que o S_{D_i} for significativamente maior que o desvio-padrão do método, em condições de reprodutibilidade intralaboratorial, pode deduzir-se que o conjunto dos fatores tem influência no resultado, mesmo que cada fator isoladamente não influencie significativamente, e que o método não é suficientemente robusto face às alterações ensaiadas;

Observação: A avaliação entre o S_{D_i} e o desvio-padrão do método em condições de reprodutibilidade pode ser realizada pelo teste F.

VI.3.11 Procedimentos para a Avaliação da Incerteza de Medição

Recomenda-se estimar a incerteza de medição segundo procedimento estabelecido na seção 8 – *Incerteza de Medição Analítica*, da Parte II deste Manual.

VI.3.11.1 Critérios de Aceitação da Incerteza de Medição

Os procedimentos analíticos aplicados ao controle oficial devem produzir resultados cujas incertezas de medição padrão sejam inferiores à incerteza de medição padrão máxima calculada por meio da seguinte fórmula:

$$U_f = \sqrt{\left(\frac{LD}{2}\right)^2 + (\alpha c)^2} \quad (50)$$

Onde:

- U_f = incerteza de medição padrão máxima ($\mu\text{g kg}^{-1}$).
- LD = limite de detecção do método ($\mu\text{g kg}^{-1}$).
- c = corresponde à concentração em causa ($\mu\text{g kg}^{-1}$).
- α = é um fator numérico cuja utilização depende de c .

Os valores de α a serem utilizados se encontram na tabela a seguir:

c ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	α
≤ 50	0,2
51 a 500	0,18
501 a 1.000	0,15
1.001 a 10.000	0,12
> 10.000	0,1

VI.3.12 Procedimentos para Extensão de Escopo (Novas Matrizes)

Para a inclusão de novas matrizes em procedimentos analíticos validados devem ser avaliados, no mínimo, os parâmetros: Seletividade/Efeito Matriz, Veracidade/Recuperação e Repetitividade.

Os estudos devem ser conduzidos nos níveis de 0,2 e 1,0 TMC referentes à matriz nova.

Para a avaliação da Seletividade/Efeito Matriz, realizar os procedimentos descritos na seção 4 – *Seletividade e Efeito Matriz*, da Parte II deste Manual. Neste caso, as comparações devem ser realizadas entre analito na matriz branca nova e analito na matriz branca velha. Recomenda-se que os experimentos conduzidos na extensão de escopo sejam efetuados na matriz velha e nova simultaneamente, ou seja, no mesmo dia.

Com os dados obtidos a partir do procedimento de Seletividade/Efeito Matriz, avaliar os parâmetros Veracidade/Recuperação e Repetitividade.

Para fins da extensão de escopo, a avaliação da Repetitividade poderá ser realizada em apenas um dia.

Observação: Em alguns casos, mesmo os experimentos sendo conduzidos em sua totalidade como proposto acima, recomenda-se a avaliação da exatidão com o uso de MRC/MR referente à matriz nova. Tal recomendação visa garantir que a aplicação do procedimento analítico não é influenciada pelas espécies químicas (orgânicas e inorgânicas) presentes em amostras naturalmente contaminadas, ou mesmo possíveis interações entre o analito e a matriz. Um exemplo de procedimento analítico que apresenta forte influência das espécies químicas é a determinação de arsênio total em pescados.

VI.3.12.1 Critérios de Aceitação da Extensão de Escopo (Novas Matrizes)

Utilizar o critério de aceitação para o parâmetro Seletividade/Efeito Matriz descrito na seção 4 – *Seletividade e Efeito Matriz*, da Parte II deste Manual.

Para os demais parâmetros, utilizar os critérios estabelecidos nesta seção.

VI.4 Micotoxinas

Devido à ocorrência natural de diferentes micotoxinas em um mesmo produto de origem vegetal ou animal, os procedimentos analíticos multitoxinas são preferencialmente recomendáveis.

Quando o procedimento analítico for destinado à aplicação a mais de uma matriz, de uma mesma classe ou de classes distintas de produtos, seu credenciamento poderá ser solicitado apenas com os dados da validação obtidos para a matriz representativa. Entretanto, validações curtas devem ser conduzidas objetivando avaliar o comportamento do procedimento analítico para as demais matrizes do grupo componente do escopo, de forma a garantir que o procedimento analítico seja aplicável integral-

mente a todas as matrizes integrantes do escopo, conforme procedimentos descritos neste item.

De maneira sistemática, os parâmetros que impactam na qualidade analítica precisam ser monitorados, conforme descrito na Parte IV – *A Rotina Analítica e o Controle de Qualidade Analítica*, de modo a garantir durante a rotina analítica que o procedimento analítico continua operando dentro dos parâmetros preconizados.

VI. 4.1 Matrizes Representativas

Para utilização de matriz representativa, os seguintes critérios devem ser observados:

1. No mínimo uma matriz representativa por grupo de produtos deve ser avaliada durante a validação. Tal fato é indispensável ao credenciamento para determinado procedimento analítico.
2. Quando um procedimento analítico for implementado na rotina para uma variedade de matrizes de um mesmo grupo, dados complementares deverão ser coletados de forma a consolidar a validação concorrente para todas as matrizes daquele grupo.
3. Na seleção da matriz representativa, devem ser utilizados os critérios estabelecidos na Tabela A.XI.2.
4. Matrizes representativas podem ser utilizadas na validação de procedimentos analíticos mono e multitoxinas.
5. A Tabela A.XI.2 deste item apresenta as classes de matrizes representativas para cada grupo de micotoxinas de interesse, que podem ser avaliadas como uma combinação de matriz x micotoxina durante a validação de procedimentos analíticos. Essa tabela é baseada nas informações acumuladas pelo Lacqsa/Lanagro-MG, ao longo dos últimos 15 anos de atividades de preparo e análises de micotoxinas em produtos diversos. A evidência é dada pelos dados de estudos de validação e revalidação dos mesmos.
6. Todas as micotoxinas contempladas pelo escopo do procedimento analítico necessitam ser validadas.
7. Preferencialmente, cada batelada de amostras a serem analisadas deve ter uma curva de calibração contemplando todas as micotoxinas do escopo do procedimento analítico.
8. Se o escopo do procedimento analítico for igual ou inferior a 20 micotoxinas, então todas as micotoxinas devem ser contempladas na curva de calibração.

9. Sempre que uma substância ultrapassar o nível máximo requerido (não conformidade) a amostra deve ser reanalisada, de forma a atender aos requisitos estabelecidos na Parte IV deste Manual.

VI. 4.2 Validação (Requisitos Mínimos e Critérios de Aceitação)

A validação de procedimentos analíticos para determinação de micotoxinas em matrizes de origem vegetal ou animal deverá ser conduzida atendendo aos critérios mínimos dos seguintes parâmetros de desempenho:

1. Seletividade;
2. Efeito Matriz;
3. Linearidade (Curva de Calibração);
4. Veracidade e Precisão;
5. Limite de Detecção (LD); Limite de Quantificação (LQ); $CC\alpha$ e $CC\beta$;
6. Robustez;
7. Estudo de Estabilidade;
8. Incerteza de Medição;
9. Valores de HORRAT.

VI.4.2.1 Seletividade

Para se avaliar a presença de possíveis interferentes, analisar no mínimo seis amostras “brancas”, preferencialmente de seis fontes distintas e verificar a ocorrência de interferências (sinais e picos no tempo de retenção em que se prevê a eluição da micotoxina).

VI. 4.2.1.1 Critérios de Aceitabilidade

O sinal do interferente deve ser $\leq 30\%$ do sinal apresentado para a menor concentração da micotoxina na curva de calibração. Esse critério deve ser utilizado desde que não afete valores de Veracidade e Precisão, conforme Tabela 8.

VI.4.2.2 Efeito Matriz

Aplicar os procedimentos de avaliação e critérios de aceitação da seção 4 – *Seletividade e Efeito Matriz*, da Parte II deste Manual.

Curvas de calibração em solução só poderão ser utilizadas se for comprovada a ausência de efeito matriz.

Os procedimentos analíticos que utilizam colunas de imunoafinidade na etapa de purificação são considerados, a princípio, sem efeito matriz, tendo em vista a especificidade de separação das micotoxinas em um gel (coluna de fase sólida de imunosorbente contendo anticorpos específicos para as micotoxinas pesquisadas para as matrizes pertencentes ao mesmo grupo da Tabela A.XI.2. Entretanto, é preciso avaliar a capacidade de ligação da coluna de imunoafinidade empregada (ng de toxinas) e as condições analíticas do método para classes de matrizes e grupos de micotoxinas.

Quando o procedimento analítico em validação estiver destinado à análise de diferentes matrizes para quantificação das mesmas micotoxinas pode-se, na etapa de avaliação do efeito matriz, fazer uma composição das diferentes matrizes do mesmo grupo conforme Tabela A.XI.2.

Se o efeito matriz for comprovadamente positivo na matriz composta, deve-se avaliar cada matriz individualmente. Caso contrário, a matriz composta pode ser utilizada nos testes de validação e inclusive como amostra branco nos controles de qualidade de resultados analíticos. Valida-se, então, o procedimento analítico para uma matriz composta e insere-se, nos trabalhos de rotina, amostras de controle de qualidade em três replicatas para cada matriz do grupo contaminadas (MR, MRC) ou fortificadas no nível requerido. Faz-se necessária a confirmação do LQ para todas as matrizes.

VI. 4.2.3 Linearidade

Os procedimentos relacionados à curva de calibração devem ser realizados conforme descrito na seção 3 – *Curvas de Calibração, Linearidade, Sensibilidade e Faixa de Trabalho*, da Parte II, anexos III e VIII.

Os laboratórios devem estabelecer internamente critérios de aceitabilidade dos parâmetros da curva de calibração: $S(a)$, $S(b)$, dispersão dos resíduos individuais da curva, coeficiente de correlação.

VI. 4.2.4 Veracidade e Precisão (Repetitividade e Precisão Intermediária)

Os procedimentos relacionados à Veracidade e Precisão devem ser realizados conforme as seções 5 – *Veracidade/Recuperação* e 6 – *Precisão*, da Parte II deste Manual.

A veracidade poderá também ser realizada por comparação dos resultados obtidos com outro procedimento analítico de ensaio previamente validado ou a partir dos resultados da participação em ensaios de proficiência.

Os resultados devem ser considerados em termos de recuperação do valor certificado ou atribuído.

VI.4.2.4.1 Critérios de Aceitabilidade

O procedimento analítico deve apresentar desempenho conforme os critérios descritos na Tabela 8.

Tabela 8 – Critérios de desempenho dos procedimentos analíticos para determinação de micotoxinas em produtos de origem vegetal e leite (aflatoxina M₁)

Micotoxina	Nível (µg/kg)	Recuperação (%)	DPR _r	DPR _R
Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ *	<1	50 a 120	0,66 x DPR _R	Recomendado: valor derivado da equação de Horwitz Máximo: 2 vezes o valor derivado da equação de Horwitz
	1 – 10	70 a 110		
	>10	80 a 110		
Aflatoxina M ₁	0,01 – 0,05	60 a 120%		
	> 0,05	70 a 110%		
Citreoviridina**	< 5	60 a 130	< 40	< 50
	>5	65 a 110	< 25	< 40
Desoxinivalenol	>100 - <500	60 a 110	< 20	< 40
	>500	70 a 120	< 20	< 40
Fumonisinias B ₁ e B ₂	<500	60 a 120	< 30	< 60
	>500	70 a 110	< 20	< 30
Ocratoxina A	<1	50 a 120	< 40	< 60
	1 – 10	70 a 110	< 20	< 30
Patulina	<20	50 a 120	< 30	< 40
	20 – 50	70 a 105	< 20	< 30
	>50	75 a 105	< 15	< 25
Toxinas T-2	50 – 250	60 a 130	< 40	< 60
	> 250	60 a 130	< 30	< 50
Toxina HT-2	100 – 200	60 a 130	< 40	< 60
	> 200	60 a 130	< 30	< 50
Zearalenona	<50	60 a 120	< 40	< 50
	>50	70 a 120	< 25	< 40

Fonte: Diretiva CE 401/2006.

Notas: * Estes critérios aplicam-se para B₁ e para a soma de B₁, B₂, G₁ e G₂.

** Critérios estabelecidos com base na EU 401/2006 para zearalenona (DPR) e em procedimentos de validação obtidos pelo Lacqsa/Lanagro-MG.

Para as micotoxinas para as quais não existam critérios de aceitabilidade estabelecidos recomenda-se que eles sejam determinados levando-se

em consideração a similaridade do procedimento analítico e faixa de contaminação, podendo ainda esses critérios serem determinados durante os procedimentos de validação.

Para análise de micotoxinas em produtos de origem animal (exceto leite) deve-se atender aos critérios de validação conforme requisitos e critérios descritos nas seções 2 – *Critérios de Desempenho Aplicáveis à Detecção por EM* e 5 – *Veracidade/Recuperação*, da Parte II deste Manual.

Excepcionalmente, quando a recuperação for menor que a estabelecida, porém consistente com os dados de precisão, e a causa para tal desempenho estiver bem estabelecida, a recuperação abaixo do requisito estabelecido poderá ser aceitável desde que devidamente justificada. Entretanto, um procedimento analítico mais exato deve ser usado, se praticável.

VI.4.2.5 Limites de Detecção (LD), Limite de Quantificação (LQ), Limite de Decisão ($CC\alpha$) e Capacidade de Detecção ($CC\beta$)

Os procedimentos relacionados à determinação de Limites de Detecção (LD), Limite de Quantificação (LQ), Limite de Decisão ($CC\alpha$) e Capacidade de Detecção ($CC\beta$) devem ser realizados em consonância com o disposto na seção 7 – *Limites de Detecção, Limite de Quantificação, Limite de Decisão e Capacidade de Detecção*, da Parte II deste Manual.

Os Limites de Decisão ($CC\alpha$) e Capacidade de Detecção ($CC\beta$) são necessários quando se tratar de validação de matrizes de origem animal, exceto leite.

Após a estimativa matemática do Limite de Quantificação (LQ), segundo a ISO11843, este deve ser confirmado em termos de precisão, veracidade (Tabela 8) e incerteza, conforme requisito específico para o nível em que o LQ se encontra, utilizando materiais de referência ou matrizes brancas fortificadas com padrão.

Analisar no mínimo seis amostras da matriz branca fortificada, de preferência de origens diferentes. A relação sinal/ruído deve ser superior a seis ($S/R \geq 6$). Sugere-se que na estimativa do LQ pelo modelo proposto pela ISO 11843, o valor da menor concentração de padrão da curva de calibração seja utilizado como zero (0).

VI.4.2.6 Estudo de Robustez, Escopo e Portabilidade

Os procedimentos relacionados à determinação de Robustez, Escopo e Portabilidade devem ser realizados em consonância com o disposto na seção 9 – *Estudo de Robustez, Escopo e Portabilidade*, da Parte II deste Manual.

A robustez do procedimento analítico deve ser demonstrada minimamente por intermédio de:

1. Monitoramento do procedimento analítico por intermédio dos resultados das Amostras Controle e verificações de desempenho do sistema.
2. Dados de série histórica de controle intralaboratorial, participação em programas interlaboratoriais. Dados de precisão intermediária, obtidos ao longo de um determinado período de tempo, podem ser utilizados para evidenciar robustez.

A portabilidade é a capacidade de o procedimento analítico ser transportado/transferido para outro local de execução ou outro equipamento sem, no entanto, perder suas características metrológicas e seu desempenho. Os parâmetros a serem avaliados para demonstrar portabilidade são: linearidade, veracidade, precisão, LQ.

VI.4.2.7 Estudos de Estabilidade (Orientação Geral)

Os procedimentos relacionados a estudos de estabilidade devem ser realizados em consonância com o disposto na Parte III – *Estudos de Estabilidade* deste Manual.

O estudo de estabilidade deve ser realizado, preferencialmente, em materiais considerados homogêneos. Deve simular as condições nas quais o laboratório submete as amostras e padrões. Por exemplo, se o laboratório armazena as amostras congeladas por 24 horas ele deve provar a estabilidade da micotoxina nas amostras nesse período nas mesmas condições. Se o extrato após purificação é armazenado deve-se evidenciar a estabilidade da micotoxina nele após o armazenamento.

Os estudos de estabilidade podem ser realizados ao longo dos ensaios de rotina a partir da avaliação de solução padrão, de amostras já analisadas pelo laboratório e de material de referência, dentre outros.

VI.4.2.8 Incerteza de Medição

A incerteza para os procedimentos analíticos que determinam micotoxinas em alimentos de origem vegetal ou animal deve ser estimada seguindo os procedimentos citados na seção 8 – *Incerteza de Medição Analítica*, da Parte II deste Manual.

Ambas as metodologias aqui citadas são usadas na estimação da incerteza dos procedimentos analíticos: metodologias denominadas de *Bottom-Up* e *Top-Down*.

Minimamente, deve-se levar em conta as contribuições dos componentes de incerteza, precisão intermediária e curva de calibração.

VI.4.2.9 Valores de HORRAT

Os valores de HORRAT devem ser calculados para os procedimentos analíticos de análise de micotoxinas em alimentos de origem vegetal e animal seguindo os procedimentos citados no item 3.6 - *Precisão*, da Parte VI deste Manual.

VI.4.2.9.1 Critérios de Aceitabilidade dos Valores HORRAT

Os valores de HORRAT devem ser ≤ 1 .

Valores de HORRAT ≥ 1 e < 2 poderão ser aceitos se a causa do desempenho da precisão estiver claramente identificada e os valores de veracidade estiverem de acordo com o requisito na faixa validada (Tabela 8).

VI.4.3 Extensões de Escopo (Novos Analitos)

Quando se desejar incluir novas micotoxinas a um procedimento analítico previamente validado, o laboratório deve utilizar os mesmos parâmetros e critérios definidos anteriormente para garantir sua adequação (validação) após a inclusão.

Na introdução de uma nova micotoxina, a seletividade deve ser avaliada. Caso não ocorram mudanças nas condições analíticas, repetir também as etapas de determinação de Limite de Decisão ($CC\alpha$), Capacidade de Detecção ($CC\beta$), LQ, veracidade e precisão. Caso seja necessária alguma modificação analítica, repetir o procedimento de validação integralmente.

Alternativamente, a validação de nova micotoxina pode ser realizada de forma concorrente, por intermédio do uso de amostras de controle de qualidade durante as análises de rotina, isto é, com cada lote de amostras da rotina um ou mais produtos da categoria são fortificados ($n=3$) na concentração do LQ um nível maior – preferencialmente o nível requerido e um limite correspondente ao ponto da curva de calibração mais concentrado.

VI.4.4 Extensões de Escopo (Novas Matrizes)

Quando a matriz a ser introduzida não pertencer a um grupo representativo de amostras (Tabela A.XI.2) uma validação completa deve ser conduzida.

Quando a matriz pertencer a um determinado grupo representativo, a ampliação do escopo deverá ser feita a partir da avaliação de estudos de seletividade, precisão e veracidade e LQ; com no mínimo um dia de experimento, conforme descrito neste Manual, e deverá atender aos critérios de desempenho estabelecidos para a validação.

VI. 4.5 Alteração do Nível de Concentração Requerido

Caso seja necessário mudar o limite de referência (nível de interesse ou nível requerido) utilizado no processo de validação, e este estiver fora da faixa de trabalho da curva de calibração, deve-se repetir os experimentos de Limite de Decisão ($CC\alpha$), Capacidade de Detecção ($CC\beta$) e LQ, conforme o item 4.2.5 – *Limites de Detecção, Limite de Quantificação, Limite de Decisão e Capacidade de Detecção*, desta Parte. Caso o novo limite esteja dentro da curva de calibração, avaliar o Limite de Decisão ($CC\alpha$), Capacidade de Detecção ($CC\beta$), LD e LQ pelo menos uma vez.

VI. 4.6 Revalidação

Revalidação é o procedimento que deve ser adotado quando houver alteração nas condições originais da validação que possam afetar os resultados de medição ou para avaliar o desempenho do procedimento analítico ao longo de um período, conforme previsto pela Norma NBR/ISO/IEC 17025, item 5.4.5.2.

Dados de série histórica de controle intralaboratorial, participação em ensaios de proficiência e testes de homogeneidade de materiais também podem ser utilizados para revalidar os procedimentos analíticos, desde que atendam aos parâmetros exatidão e precisão.

Os parâmetros mínimos que devem ser avaliados na revalidação são: veracidade, precisão intermediária, HORRAT, LD, LQ e incerteza de medição do procedimento analítico.

VI.4.7 Calibração Analítica e Recuperação (Rotina Analítica)

Todos os procedimentos adotados na rotina analítica deverão ser respaldados pelos estudos de validação do procedimento analítico.

VI.4.7.1 Frequência Mínima para Utilização da Curva de Calibração na Rotina Analítica

Para as micotoxinas, cada batelada de amostras deve ser acompanhada de não menos que uma curva de calibração com, no mínimo, cinco concentrações, e que pelo menos um ponto da curva de calibração contemple o LQ.

VI.4.7.2 Determinação da Recuperação na Rotina Analítica

Os níveis de fortificação das amostras para determinação das recuperações das micotoxinas deverão estar na faixa da curva de calibração (e.g. no LR), ou dentro de um nível de relevância para as amostras analisadas. Esse nível de fortificação deve ser alternado ao longo do tempo. Na rotina, amostras com contaminação fora da faixa da curva de calibração deverão ser diluídas e reinjetadas.

É obrigatório um monitoramento contínuo dos procedimentos analíticos e dos resultados das medições obtidos na rotina laboratorial, realizado com o objetivo de decidir se os resultados analíticos estão em conformidade com os requisitos estabelecidos, devendo ser empregado para todos os procedimentos analíticos utilizados na rotina. Assim, sempre que possível, em uma batelada contendo diferentes matrizes deve-se avaliar a recuperação de todas as micotoxinas analisadas em pelo menos uma matriz de cada grupo.

Recomenda-se plotar as recuperações obtidas em gráficos de controle (cartas de controle) preferencialmente por micotoxinas e grupo de matriz, considerando as faixas de contaminação. Caso seja observada uma tendência significativa ou sistemática de desvio de recuperação, procedimentos devem ser adotados no intuito de identificar e corrigir as causas prováveis do desvio.

VI.4.7.2.1 Critérios de Aceitação do Desempenho de Recuperação na Rotina Analítica

Os critérios de aceitabilidade, em termos de recuperação para os resultados dos controles, devem ser de acordo com aqueles definidos na Tabela 8 e são baseados na normativa EU 401/2006 e em casos especiais nos parâmetros obtidos durante a validação dos procedimentos analíticos.

Se uma tendência significativa ocorrer na recuperação ou se resultados potencialmente inaceitáveis (desvio-padrão relativo) maiores que $\pm 20\%$ forem obtidos, as causas devem ser investigadas.

VI.4.8 Preparo de Amostras para Validação de Procedimento Analítico e Análise de Rotina

Para análise de micotoxinas, o preparo das amostras é considerado aspecto crítico do procedimento, pois impacta significativamente nos níveis de contaminação de micotoxinas na amostra, uma vez que a distribuição de micotoxinas nos produtos ocorre de forma heterogênea. Portanto, a granulometria e a homogeneidade devem ser observadas, e a totalidade da massa da amostra recebida pelo laboratório deve ser preparada.

A granulometria deve estar entre 20 mesh (0,841mm) e 16 mesh (1,19mm). O laboratório deve ter procedimentos validados para garantir a homogeneidade e a granulometria apropriada, assegurando dessa forma resultados representativos para a amostra analisada.

Se por questões de ajuste das condições de preparo for necessário descascar a amostra recebida, deve-se garantir que todas as frações da amostra, incluindo podres, chochos e mofados, sejam mantidas na amostra.

As matrizes podem ser classificadas conforme sugestões apresentadas na Tabela 9, sendo este agrupamento feito considerando as características das amostras, o tipo dos equipamentos que podem ser utilizados e os procedimentos de preparo.

A seleção do moinho deve levar em conta a massa a ser preparada, além das características físicas das amostras, tais como: dureza e teor de gordura.

Tabela 9 – Condições de preparo de amostras considerando grupos característicos, sugestões quanto ao tipo de equipamento de moagem e formas de preparo

Classe	Tipo de amostras	Tipo de equipamentos sugeridos (considerar o tamanho da amostra)	Tipos de preparo
I	Grãos, cereais e leguminosas em geral (inteiros, partidos ou esmagados)	Moinhos de rotor e martelo fixos, moedor de café com funcionamento helicoidal	Seco
	Grãos, cereais e leguminosas em geral (inteiros, partidos ou esmagados)	Moinho tipo faca	Pasta
II	Pastas, manteigas, frutas secas, desidratadas (figo, tâmara, uva passa e banana, dentre outras), nozes, amêndoas, amendoim, avelãs, pistache, castanhas em geral e similares	Moinho com rotor tipo moedor de carne, moinho de faca ou lâmina com agitação com hélice, mixer ou processador, liquidificador e homogeneizadores	Pasta ou seco Recomenda-se pasta

continua

III	Farelos, farinhas, coco ralado, café solúvel, café torrado moído, ração, ingredientes de ração e similares	Homogeneizador mecânico ou manual	Seco
IV	Amostras com casca – castanha-do-brasil, avelãs, pistache, nozes e amêndoas e amendoins	Moinhos tipo: moedor de café com funcionamento helicoidal e lâmina com agitação com hélice, moinho de rotor e martelo fixos	Seco ou pasta Recomenda-se pasta
V	Leite em pó	Homogeneizador mecânico ou manual	Seco

Obs.: Alguns moinhos disponíveis no mercado que podem ser utilizados para o preparo de amostras para análise de micotoxinas: CAF (Modelo: B.22 inox, série: 12587; 1¼ CV, 220V), Geiger (Modelo GUM – 12; Série: 3994; motor: 10019 ou Modelo: UM-25E, série: 9927), Turrax (modelo Marconi, MA -1700/SGS), Retsch (Retsch, Modelo: SM 2000, série: 1271007041), Marconi (Modelo: MA 090/CF, Moinho de rotor e de martelo fixos, série: 001438; 1500W, 220V) e Arbel (Modelo: moedor de café potência: 1/3 HP, 110/220V, 50/60Hz; 2.75", 220V, série: 3359).

VI.4.9 Preparo de Soluções Padrão de Micotoxinas

As soluções padrão de micotoxinas devem ser preparadas e padronizadas de acordo com os procedimentos descritos na AOAC internacional (2005). As soluções padrão utilizadas na rotina deve ser periodicamente monitoradas por repadronização, cabendo ao laboratório definir o período para repadronização das soluções padrão de micotoxinas.

As soluções padrão devem ser preparadas por injeção de solventes apropriados nos frascos (utilizando-se seringa com agulha) para cada micotoxina, seguindo-se de retirada de frações das soluções concentradas para preparo das soluções estoque, evitando dessa forma a abertura dos frascos contendo padrão sólido e conseqüente dispersão das partículas.

As concentrações das soluções estoque devem ser calculadas após determinação das absorvâncias das soluções por espectrofotometria UV. Antes disso, o espectrofotômetro deve ser avaliado quanto ao seu desempenho por meio de soluções do padrão primário de dicromato de potássio, segundo AOAC Internacional, ou pelo uso de padrão certificado por organismo nacional de metrologia (*National Institute of Standards and Technology* – NIST; LGC; Instituto Nacional de Metrologia – Inmetro ou outros).

Para algumas micotoxinas não estão disponíveis valores de absorvidade. Dessa forma, devem ser preparadas por medição exata das massas seguida de transferências quantitativas para frascos volumétricos calibrados e aferição criteriosa do volume, utilizando micropipetas ou pipetas calibradas.

Na Tabela 10 estão apresentados os solventes apropriados para o preparo das soluções, assim como os parâmetros a serem utilizados na sua padronização.

Tabela 10 – Parâmetros para Padronização de Soluções de Micotoxinas

Micotoxina	Faixa de comp. de onda (nm)	Massa Molecular (g/mol)	Faixa de conc. ideal (µg/mL)	Solvente Indicado	Absortiv. Molar (ε)
Aflatoxina B ₁ AFLAB ₁	330-370	312	8-10	Benzeno: Acetonitrila (98:2, v/v)	19800 (350 nm)
				Tolueno: Acetonitrila (9:1, v/v)	19300 (350 nm)
				Metanol	21500 (350 nm)
				Acetonitrila	20700 (350 nm)
Aflatoxina B ₂ AFLAB ₂	330-370	314	8-10	Benzeno: Acetonitrila (98:2, v/v)	20900 (350 nm)
				Tolueno: Acetonitrila (9:1, v/v)	21000 (350 nm)
				Metanol	21400 (350 nm)
				Acetonitrila	22500 (350 nm)
Aflatoxina G ₁ AFLAG ₁	330-370	328	8-10	Benzeno: Acetonitrila (98:2, v/v)	17100 (350 nm)
				Tolueno: Acetonitrila (9:1, v/v)	16400 (350 nm)
				Metanol	17700 (350 nm)
				Acetonitrila	17600 (350 nm)
Aflatoxina G ₂ AFLAG ₂	330-370	330	8-10	Benzeno: Acetonitrila (98:2, v/v)	18200 (350nm)
				Tolueno: Acetonitrila (9:1, v/v)	18300 (350 nm)
				Metanol	19200 (350 nm)
				Acetonitrila	18900 (350 nm)
Aflatoxina M ₁ AFLA M ₁	330-370	328	8-10	Benzeno: Acetonitrila (9:1, v/v)	18000 (350 nm)
				Acetonitrila	19000 (350 nm)
				Clorofórmio	1995 (350 nm)
Ocratoxina A OCRA ou OTA	300-400	403	40	Benzeno:ácido Acético (99:1, v/v)	5550 (330nm)
				Tolueno: Ácido Acético (99:1, v/v)	5440 (333nm)
Zearalenona ZON	280-380	318	50	Benzeno	6060 (317nm)
				Metanol	6000 (314 nm) 13900 (274 nm) 30000 (236 nm)
Desoxinivalenol DON	200-400	296,3	50	Metanol	7040 (219 nm)
				Acetonitrila	6400 (208 nm)
Citreoividina CTV	200-400	402	5	Metanol	44925 (383 nm)
				Etanol	48000 (388 nm)

Obs.: O preparo das soluções na faixa ideal é desejado, mas não podendo ser atendido, deverá ser observado no espectro obtido se a altura do pico está aceitável.

Soluções de DON em metanol podem sofrer degradação após 30 dias de preparo (AOAC, 2000; Shepherd e Gilbert, 1988).

Solução padrão de AFLA M₁ é estável em acetonitrila por aproximadamente um mês (DRAGACCI *et al.*, 2001).

VI.4.10 Armazenamento de Padrões

Armazenar os padrões sólidos e suas soluções separadamente das amostras ou extratos de amostras, em frascos para padrão âmbar ou frascos protegidos da luz por papel alumínio, vedados com parafilme, sob temperatura de congelamento ($\leq -15^{\circ}\text{C}$).

VI.4.11 Critérios de Aceitabilidade das Soluções Padrão de Micotoxinas

Recomenda-se que a diferença entre as concentrações determinadas na padronização anterior e a atual seja $\leq 3\%$

As soluções padrão de micotoxinas devem ser descartadas quando observadas alterações indicativas de deterioração como: turbidez, separação entre as fases e alteração de cor, entre outras.

A avaliação da pureza ou possível degradação das soluções padrão pode ser realizada por técnicas de cromatografia em camada delgada e/ou cromatografia líquida.

ANEXOS

ANEXO I

Cálculos da Estimativa dos Parâmetros da Regressão pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO)

Construir a curva de calibração (de calibração) fazendo o gráfico de todas as N_y leituras versus os I níveis de concentração. Dessa forma haverá no mínimo seis valores de respostas instrumentais (pontos) para cada nível de concentração.

Estimar os parâmetros de regressão: o coeficiente angular (b) e o coeficiente linear (a), pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO), conforme mostrado a seguir.

Modelo da Reta de Calibração:

$$Y_{ijl} = \alpha + \beta X_i + \varepsilon_{ijl} \quad (\text{A.I.1})$$

Onde:

- Y_{ijl} = variável dependente: a resposta instrumental da l -ésima leitura da j -ésima preparação do i -ésimo nível de concentração das soluções de calibração. É a variável resposta na terminologia da ISO 11843;
- α = intercepto ou interseção;
- β = inclinação;
- X_i = variável independente: a concentração do analito, do i -ésimo nível de concentração. É a variável líquida de estado na terminologia da ISO 11843;
- ε_{ijl} = resíduos aleatórios da regressão da l -ésima leitura da j -ésima preparação do i -ésimo nível de concentração das soluções de calibração.

Equação de Regressão Linear de Primeiro Grau, Reta:

$$\hat{y}_i = a + bx_i \quad (\text{A.I.2})$$

Onde:

- \hat{y}_i = (variável dependente) é a resposta instrumental estimada (calculada) pela equação de regressão no i -ésimo nível de concentração;

- a = estimativa de MMQO da interseção α ;
- b = estimativa e MMQO da inclinação β ;
- x_i = (variável independente) são as concentrações conhecidas do analito nas soluções padrão de calibração em cada nível de concentração.

Procede-se à estimação da inclinação (b) ou coeficiente angular, da interseção (a) ou intercepto ou coeficiente linear e das somas quadráticas (S):

$$b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} \quad (\text{A.I.3})$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (\text{A.I.4})$$

Onde:

$$S_{xy} = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (x_i - \bar{x})(\bar{y}_{ij} - \bar{y}) = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J x_i \bar{y}_{ij} - \sum_{i=1}^I x_i \sum_{j=1}^J \bar{y}_{ij} / I \quad (\text{A.I.5})$$

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (x_i - \bar{x})^2 = J \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2 = J \left[\sum_{i=1}^I x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^I x_i \right)^2 / I \right] \quad (\text{A.I.6})$$

$$\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{l=1}^L y_{ijl}}{I \times J \times L} \quad (\text{A.I.7})$$

$$\bar{y}_{ij} = \frac{\sum_{l=1}^L y_{ijl}}{L} \quad (\text{A.I.8})$$

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^I x_i}{I} = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{l=1}^L x_i}{I \times J \times L} \quad (\text{A.I.9})$$

Sendo:

- x_i = concentração conhecida do analito em cada i -ésimo nível de concentração da solução padrão de calibração;
- y_{ijl} = resposta instrumental medida da l -ésima replicata de reinjeção da j -ésima preparação da i -ésima concentração;
- I = número de níveis de concentração da curva de calibração;
- J = número de repetições de preparo independentes de cada nível de concentração;

- L = número de replicatas de reinjeção ou de leituras ou indicações de respostas instrumentais de cada j -ésima preparação da i -ésima concentração;
- N_x = número total de níveis independentes de concentração da curva de calibração dado por $N_x = I \times J$, para um planejamento balanceado, quando todos os níveis de concentração são preparados com igual número J de réplicas. Porém, se cada nível de concentração tiver um número J_i diferente de replicatas de preparação, o que não é desejável, então
$$N_x = \sum_{i=1}^I J_i$$
- \bar{x} = Valor médio dos I níveis de concentração da curva de calibração.
- \bar{y} = Valor médio de todas as $N_x \times L$ respostas instrumentais.
- \bar{y}_{ij} = Valor médio das respostas instrumentais das L replicatas de leituras da j -ésima preparação da i -ésima concentração da curva de calibração.

As variâncias, ou os quadrados dos desvios padrão s^2 do intercepto e da inclinação, assim como a covariância, $cov(a, b)$ entre eles são dadas por:

$$s_b^2 = \text{var}(b) = \frac{s_{res}^2}{S_{xx}} \quad (\text{A.I.10})$$

$$s_a^2 = \text{var}(a) = s_{res}^2 \frac{J \sum_{i=1}^I x_i^2}{N_x S_{xx}} = s_{res}^2 \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J x_i^2}{N_x S_{xx}} \quad (\text{A.I.11})$$

$$s_{ab}^2 = \text{cov}(a, b) = -s_{res}^2 \frac{J \sum_{i=1}^I x_i}{N_x S_{xx}} = -s_{res}^2 \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J x_i}{N_x S_{xx}} \quad (\text{A.I.12})$$

O resíduo de regressão (e_{ijl}) para cada uma das N_y respostas instrumentais é:

$$e_{ijl} = y_{ijl} - \hat{y}_i = y_{ijl} - (a + bx_i) \quad (\text{A.I.13})$$

Variância residual do ajuste (s_{res}^2) é:

$$s_{res,y}^2 = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (\bar{y}_{ij} - \hat{y}_i)^2}{N_x - 2} \quad (\text{A.I.14})$$

ANEXO II

Qualidade do Ajuste e Verificação da Homoscedasticidade ou Heterocedasticidade da Resposta Instrumental na Regressão pelo MMQO

Calcular os N_y resíduos e_{yij} a partir da equação de regressão, usando a eq. (A.I.13).

Construir o gráfico de dispersão dos resíduos da regressão em função da concentração para avaliar a qualidade do ajuste, i.e.: a linearidade e a homogeneidade das variâncias (homoscedasticidade).

Se a distribuição dos resíduos for aleatória, segundo a Figura A.II.1 (a) a seguir, apresentando envoltório retangular (retas paralelas), considerar que há homogeneidade das variâncias e o Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO) pode ser de fato aplicado.

Se a distribuição dos resíduos apresentar envoltórias na forma de um cone crescente, como na Figura A.II.1 (b) (retas oblíquas), ou decrescente (outras formas de envoltórias que não retangular são possíveis), considerar que **não** há homogeneidade das variância, i.e., heterocedasticidade das variâncias e, neste caso, o Método dos Mínimos Quadrados Ponderados (MMQP) deve ser aplicado.

Para testar a homoscedasticidade, um simples teste F pode ser feito [33]. Trata-se de um teste F comparando a maior variância (quadrado do desvio-padrão) das respostas instrumentais ou dos resíduos dos níveis de calibração com a menor delas. Esse teste é mais exigente que o teste de Cochran e o Hartley, ao qual se assemelha.

Teste F para a homoscedasticidade. Calcula-se os desvios padrão s_{yi} das respostas instrumentais independentes em cada i -ésimo nível de calibração pela equação:

$$s_{yi}^2 = \frac{\sum_{j=1}^J (\bar{y}_{ij} - \bar{y}_i)^2}{J - 1} \quad (\text{A.II.1})$$

Onde: Os valores médios que aparecem na equação citada são calculados de acordo com as equações eq. (A.I.8) e eq. (A.VI.7). Se o gráfico dos desvios-padrão s_{yi} em função das concentrações dos padrões de calibração

indicar algum comportamento sistemático (crescimento ou decrescimento), então os dados são heterocedáticos. A Figura A.II.2 apresenta esse gráfico para os dados da Tabela A.II.1.

Usando a maior variância e a menor variância, calcular a estatística discriminante:

$$F_{h,calc} = \frac{s_{y_i,max}^2}{s_{y_i,min}^2} \quad (A.II.2)$$

Ao mesmo tempo obtém-se, de uma tabela de teste F , o valor tabelado de $F_{h,crit,\alpha,v_1,v_2}$ com $v_1 = J_{i,max} - 1$ graus de liberdade no numerador e $v_2 = J_{i,min} - 1$ graus de liberdade no denominador, $J_{i,max}$ e $J_{i,min}$ são, respectivamente, o número de reinjeções do nível de calibração com a maior e menor variâncias. Adotar um nível de confiança de 95%.

Se $F_{h,calc}$ for menor que $F_{h,crit,\alpha,v_1,v_2}$, as variâncias podem ser consideradas iguais. Nesse caso, considera-se que as respostas instrumentais são homoscedásticas e que o MMQO pode ser usado para obter os parâmetros de regressão da curva de calibração.

Nota: O teste F aplicado aqui não é um teste múltiplo para a homoscedasticidade de variâncias, por isso é mais rigoroso. Ele foi preferido em detrimento aos testes múltiplos de Hartley [7,29,34], de Cochran [7,25,34] e Leven-Brown-Forsythe [34], por ser de mais fácil execução e usar a tabela de pontos percentuais da função densidade de probabilidade de Fisher-Snedecor, que é facilmente encontrada em qualquer livro de estatística e no Excel. O teste de Cochran é recomendado pela ISO 5725-2 [26].

Exemplo: A Tabela A.II.1 mostra os dados de absorvância para a análise de Cd por espectroscopia de absorção atômica, encontrados no exemplo A.5 do Guia Eurachem de cálculo de incerteza [16].

Estatística discriminante $F_{h,calc} = F$ do teste F :

$$F_{h,calc} = \frac{s_{y_i,max}^2}{s_{y_i,min}^2} = \frac{7,0333 \times 10^{-5}}{3,3333 \times 10^{-7}} = 211$$

$F_{h,crit,0,05,2,2} = 19,00$ [7,19, 29, 30,31,32]. Como o valor da estatística discriminante é maior que seu valor crítico no nível de significância de 5% (nível de confiança de 95%), conclui-se por rejeitar a hipótese nula da homoscedasticidade. Logo, os dados de calibração são heterocedásticos.

Estatística discriminante $F_{H,calc} = r$ do teste de Hartley ou teste de F máximo:

$$F_{H,calc} = \frac{s_{y_i,max}^2}{s_{y_i,min}^2} = \frac{7,0333 \times 10^{-5}}{3,3333 \times 10^{-7}} = 211 \quad (\text{A.II.3})$$

$F_{H,crit,0,05,2,5} = 202$ [7]. Como o valor da estatística discriminante é maior que seu valor crítico no nível de significância de 5% (nível de confiança de 95%), conclui-se por rejeitar a hipótese nula da homoscedasticidade. Logo, os dados de calibração são heterocedásticos.

Estatística discriminante $F_{C,calc} = C$ do teste de Cochran ou teste de F máximo:

$$F_{C,calc} = \frac{s_{y_i,max}^2}{\sum_{i=1}^p s_{y_i}^2} = \frac{7,0333 \times 10^{-5}}{3,3333 \times 10^{-7} + 2,3333 \times 10^{-6} + 4,0000 \times 10^{-6} + 2,3333 \times 10^{-6} + 7,0333 \times 10^{-5}} = 0,8866 \quad (\text{A.II.4})$$

$F_{C,crit,0,05,2,5} = 0,684$ [7,26,29,31]. Como o valor da estatística discriminante é maior que seu valor crítico no nível de significância de 5% (nível de confiança de 95%), conclui-se por rejeitar a hipótese nula da homoscedasticidade. Logo, os dados de calibração são heterocedásticos.

Para se calcular a estatística discriminante $F_{L,calc} = t_{L,calc}$ do teste de Levene-Brown-Forsythe ou teste de Levene modificado [34], os dados dos resíduos $e_{i,j}$ de regressão pelo MMQO de cada resposta experimental replicada são calculados e divididos em dois grupos (Grupo 1 e Grupo2), com aproximadamente o mesmo número de dados cada um, $n_{G1} \cong n_{G2}$. As réplicas de um mesmo nível de concentração não podem ser separadas em grupos diferentes. Quando o número de níveis de concentração é ímpar, exclui-se dos cálculos o nível de concentração i -ésimo nível central ($i = I/2+1$), são obtidas as medianas Med1 e Med2 de cada grupo de resíduos. Calcula-se então o valor absoluto dos desvios $d_{i,j,1}$ e $d_{i,j,2}$ de cada resíduo $e_{i,j}$ em relação à mediana de seu grupo. Obtém-se as médias $d_{m,1}$ e $d_{m,2}$ e as somas de quadrados dos desvios $SQd1$ e $SQd2$ de cada um dos dois grupos. Finalmente, calcula-se a variância agrupada s_p^2 e a estatística t de Levene $t_{L,calc}$:

$$t_{L,calc} = \frac{|d_{m1} - d_{m2}|}{\sqrt{s_p^2 \left(\frac{1}{n_{G1}} + \frac{1}{n_{G2}} \right)}} \quad (\text{A.II.5})$$

Onde:

$$\bullet \quad d_{i,j,1} = |e_{i,j} - \text{Med1}| \quad e \quad d_{i,j,2} = |e_{i,j} - \text{Med2}| \quad (\text{A.II.6})$$

$$d_{m1} = \frac{\sum_{i,j=1}^{n_{G1}} d_{i,j,1}}{n_{G1}} = \frac{\sum_{i,j=1}^{n_{G1}} |e_{i,j} - \text{Med1}|}{n_{G1}} \quad e \quad (\text{A.II.7})$$

$$d_{m2} = \frac{\sum_{i,j=1}^{n_{G2}} d_{i,j,2}}{n_{G1}} = \frac{\sum_{i,j=1}^{n_{G2}} |e_{i,j} - \text{Med2}|}{n_{G1}} \quad (\text{A.II.7})$$

$$SQd1 = \sum_{i,j=1}^{n_{G1}} (d_{i,j,1})^2 = \sum_{i,j=1}^{n_{G1}} (e_{i,j} - \text{Med1})^2 \quad e$$

$$SQd2 = \sum_{i,j=1}^{n_{G2}} (d_{i,j,2})^2 = \sum_{i,j=1}^{n_{G2}} (e_{i,j} - \text{Med2})^2 \quad (\text{A.II.8})$$

$$s_p^2 = \frac{SQd1 + SQd2}{n_{G1} + n_{G2} - 2} \quad (\text{A.II.9})$$

Os cálculos para o teste t de homoscedasticidade de Levene-Brown-Forsythe dos dados de calibração da Tabela A.II.1 são mostrados na Tabela A.II.2. O valor de t_L é maior que o valor de $t_{\text{crit},\alpha,n_{G1}+n_{G2}-2} = t_{\text{crit},0,05;10} = 2,2281$ para o nível de confiança de 95% e grau de liberdade 10, indicando, surpreendentemente e ao contrário dos três testes anteriores, em que os desvios-padrão das respostas instrumentais são homocedásticos.

O teste t de Levene-Brown-Forsythe é pouco exigente quanto à heterocedasticidade dos dados, tendendo a indicar, como no exemplo supracitado, homoscedasticidade, mesmo quando várias outras evidências indicam o contrário. Por esse motivo, preferimos o uso de um dos três testes: $F_h - eq. (A.II.2)$ ou $F_H - eq. (A.II.3)$ ou $F_C - eq. (A.II.4)$, acima ao teste t de Levene-Brown-Forsythe - $eq. (A.II.5)$. Recomendamos que quando ocorrer uma divergência de conclusões, como a desse exemplo entre o teste t de Levene-Brown-Forsythe e algum dos outros três testes, que se dê preferência à conclusão desses últimos e se proceda a um ajuste pelo MMQP, visto que ele é mais geral e inclui o MMQO.

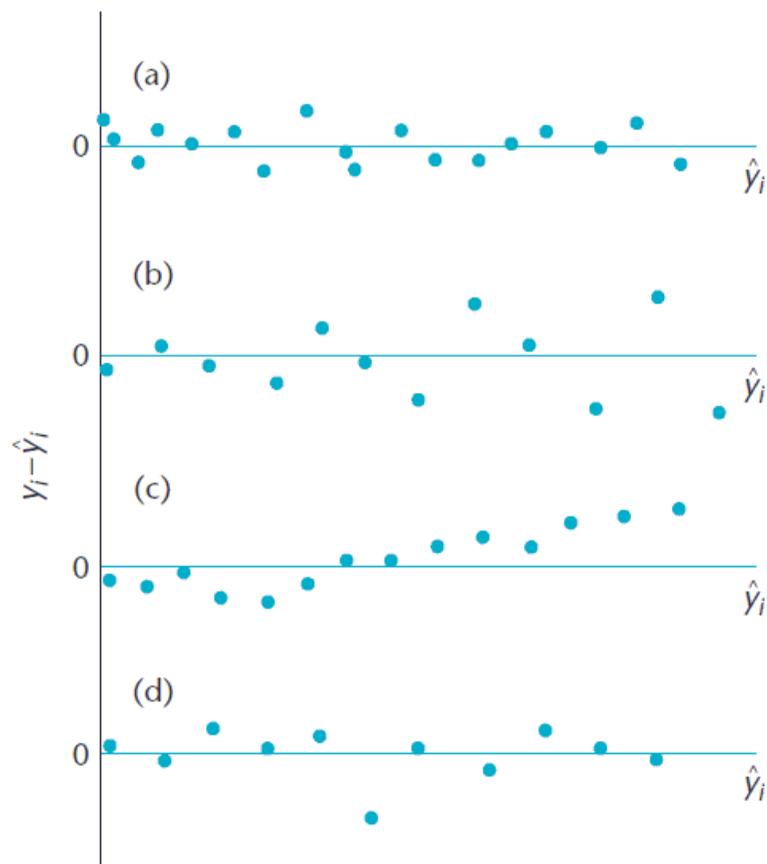
Tabela A.II.1 – Dados da Calibração de um EAA para análise de Cd obtidos do Guia Eurachem de cálculo de Incerteza [16]

i	j	$x_i = c_i$	$y_i =$ resp inst	$s(y_i)$	$s^2(y_i)$
1	1	0,1	0,028	0,00057735	3,3333E-07
	2	0,1	0,029		
	3	0,1	0,029		

continua

i	j	$x_i = c_i$	$y_i =$ resp inst	$s(y_i)$	$s^2(y_i)$
2	1	0,3	0,084	0,001527525	2,3333E-06
	2	0,3	0,083		
	3	0,3	0,081		
3	1	0,5	0,135	0,002	4,0000E-06
	2	0,5	0,131		
	3	0,5	0,133		
4	1	0,7	0,18	0,001527525	2,3333E-06
	2	0,7	0,181		
	3	0,7	0,183		
5	1	0,9	0,215	0,008386497	7,0333E-05
	2	0,9	0,23		
	3	0,9	0,216		
i	j	$x_i = c_i$	$y_i =$ resp inst	$s(y_i)$	$s^2(y_i)$

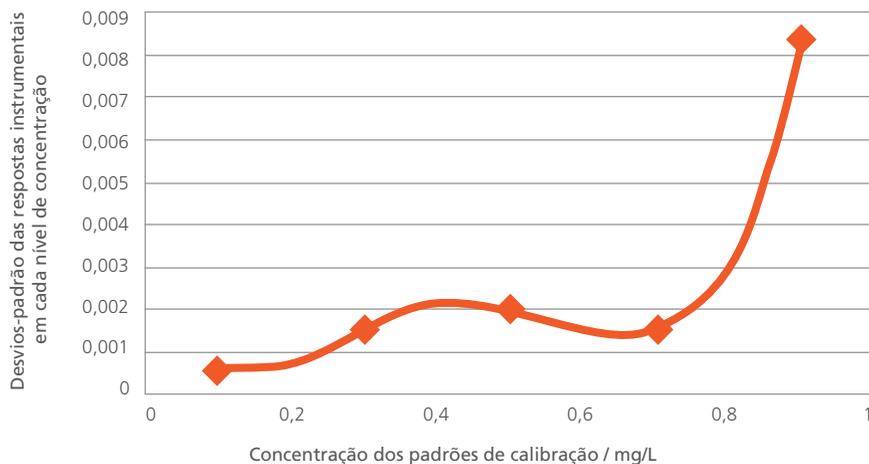
Figura A.II.1 – Gráfico de dispersão dos resíduos de ajuste $e_{y_{ij}}$ das respostas instrumentais y_{ij} calculados pela eq.(A13) em função da concentração (ou em função do valor calculado da resposta instrumental como mostrado no eixo x dos gráficos anteriores)



Fonte: Adaptado da Figura 5.15 de Miller e Miller (2005) [30].

- Notas: (a) resíduos aleatoriamente dispersos ao redor de zero, indicando um ajuste satisfatório e a homoscedasticidade das respostas instrumentais.
- (b) resíduos crescentes (ou decrescentes) com a concentração, forma de cone, indicando heterocedasticidade da resposta instrumental e exigindo o ajuste pelo MMQP.
- (c) Resíduos apresentando uma tendência decrescente (crescente) e em seguida crescente (decrescente), forma de U ou de U invertido, indicando falta de ajuste ou de linearidade (i.e. curva de calibração não retilínea) na faixa de calibração. Nesses casos, a curva de calibração pode ser ajustada por um polinômio de ordem superior a um, ou alternativamente reduz-se a faixa de concentração da calibração.
- (d) Dispersão aleatória satisfatória dos pontos, exceto pelo sexto ponto, que deve ser um valor aberrante, duvidoso (*outlier*).

Figura A.II.2 – Gráfico dos desvios-padrão das respostas replicadas em cada nível de concentração em função da concentração das soluções padrão de calibração



O comportamento funcional, em geral crescente, dos desvios-padrão indica a existência de heterocedasticidade.

Particularmente, o último ponto de calibração apresenta um desvio-padrão surpreendentemente alto em relação aos demais pontos de calibração.

Tabela A.II.2 – Cálculos envolvidos no teste *t* de homoscedasticidade de Levene-Brown-Forsythe para os dados da curva de calibração apresentada na Tabela A.II.1.

x_i	y_{ij}	$y_{i,j,calc}$	e_{ij}	Med	$d_{i,j}$	dm	SQd
0,1	0,028	0,0328	-0,0048	-0,0019	0,0029	0,0029	5,846E-05
0,1	0,029	0,0328	-0,0038		0,0019		
0,1	0,029	0,0328	-0,0038		0,0019		
0,3	0,084	0,081	0,003		0,0049		
0,3	0,083	0,081	0,002		0,0039		
0,3	0,081	0,081	0		0,0019		
0,5	0,135	0,1292	0,0058				
0,5	0,131	0,1292	0,0018				
0,5	0,133	0,1292	0,0038				

continua

0,7	0,18	0,1774	0,0026	0,0031	0,0005	0,0052	0,00035742
0,7	0,181	0,1774	0,0036		0,0005		
0,7	0,183	0,1774	0,0056		0,0025		
0,9	0,215	0,2256	-0,0106		0,0137		
0,9	0,23	0,2256	0,0044		0,0013		
0,9	0,216	0,2256	-0,0096		0,0127		

Os dois grupos de resíduos usados para calcular a estatística discriminante do teste- t de homoscedasticidade de Levene-Brown-Forsythe são marcados pelos sombreados superiores e inferiores.

Os dados do nível de concentração 0,5 foram excluídos dos cálculos.

A variância agrupada é:

$$(s_p)^2 = (5,846 \times 10^{-5} + 3,5742 \times 10^{-5}) = 4,1588 \times 10^{-4}.$$

A estatística t de Levene-Brown-Forsythe:

$$t_{L,calc} = |0,0029 - 0,0052| / [4,1588 \times 10^{-4} \times (1/6 + 1/6)]^{1/2} = 0,0023 / 1,1774 \times 10^{-4} = 0,1953.$$

ANEXO III

Avaliação dos Pontos Duvidosos, Aberrantes, Extremos (outliers) e Critérios de Aceitação para a Linearidade no MMQO

Avaliar os pontos duvidosos, aberrantes, extremos (*outliers*) da curva de calibração (de calibração) calculando-se a estatística $t_{y_{ijl},calc}$:

$$t_{y_{ijl},calc} = \frac{|e_{y_{ijl}}|}{S_{res,yi}} \quad (A.III.1)$$

Onde:

- $e_{y_{ijl}}$ = resíduo $_{ijl} = y_{ijl}$ medido - y_i calculado dado pela eq. (A.I.13);
- $s_{res,yi}$ = desvio-padrão amostral dos resíduos das respostas instrumentais do i -ésimo nível de concentração calculado pela eq. (A.III.2), usando os valores de \hat{y}_i calculados pela eq. (A.I.2) do ajuste de MMQO. Seu valor é diferente, mas próximo daquele calculado na eq. (A.I.14):

$$s_{res,yi} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^J \sum_{l=1}^L (y_{ijl} - \hat{y}_i)^2}{J \times L - 1}} \quad (A.III.2)$$

Se o valor de $t_{y_{ijl},calc}$ para um ponto duvidoso de uma curva de calibração for menor ou igual ao valor de t crítico tabelado, t_{crit} , bilateral, para nível de confiança igual a 95% e $(J \times L - 1)$ graus de liberdade, considera-se que o ponto pertence à curva e a faixa até ele é linear.

Calcular o coeficiente de correlação linear (r) pelo método dos mínimos quadrados ordinários:

$$r = \frac{S_{xy}}{\sqrt{S_{xx} S_{yy}}} \quad (A.III.3)$$

$$\begin{aligned}
S_{yy} &= \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (\bar{y}_{ij} - \bar{y})^2 = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \bar{y}_{ij}^2 - I \times J \times \bar{y}^2 = \\
&= \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \bar{y}_{ij}^2 - \left(\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{l=1}^L y_{ijl} \right)^2 / (L \times N_y)
\end{aligned} \tag{A.III.4}$$

Critério de aceitação para linearidade (caso das variâncias homogêneas ou homoscedasticidade). Calcular a estatística t_r :

$$t_r = \frac{|r| \sqrt{N_x - 2}}{\sqrt{1 - r^2}} = |r| \sqrt{\frac{N_x - 2}{1 - r^2}} \tag{A.III.5}$$

Se o valor de t_r para a regressão da curva de calibração (de calibração) for maior ou igual ao valor de t crítico (tabelado) bilateral, para nível de confiança igual a 95% e $(N_x - 2)$ graus de liberdade, considera-se que a faixa é linear, i.e. rejeita-se a hipótese nula $H_0: r = 0$ de que não há correlação entre x e y .

ANEXO IV

Avaliação da Incerteza de Previsão da Concentração do Analito na Curva de Calibração Cálculo de Incerteza de Calibração no MMQO

A incerteza padrão da concentração do analito obtida da interpolação na curva de calibração $u(x^*)$ é dada pelas equações eq. (A.IV.1a) ou eq. (A.IV.1b) ou eq. (A.IV.1c), que são equivalentes entre si.

A incerteza $u(x^*)$ não é a incerteza da concentração do analito na amostra de ensaio, pois ela não leva em consideração as demais fontes de incerteza do procedimento analítico.

A incerteza $u(x^*)$ dada pelas equações eq. (A.IV.1a) ou eq. (A.IV.1b) ou eq. (A.IV.1c) é apenas a incerteza devido à curva de calibração, e é um dos componentes da incerteza padrão da concentração do analito na amostra.

$$u_{Calib}(x^*) = \sqrt{\frac{s^2(y^*)/K + s^2(a) + (x^*)^2 s^2(b) + 2x^* \text{cov}(a,b)}{b^2}} \quad (\text{A.IV.1a})$$

$$u_{Calib}(x^*) = \frac{s(y^*)}{b} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{N_x} + \frac{(x^* - \bar{x})^2}{S_{xx}}} \quad (\text{A.IV.1b})$$

$$u_{Calib}(x^*) = \frac{s(y^*)}{b} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{N_x} + \frac{(y^* - \bar{y})^2}{b^2 S_{xx}}} \quad (\text{A.IV.1c})$$

Onde:

- $x^* = C^*$ = concentração do analito na solução injetada no instrumento de medição analítica, obtida por interpolação ou extrapolação na curva de calibração.
- K = número de replicatas verdadeiras de reanálise de alíquotas de análise da mesma amostra de ensaio. Cada alíquota de análise passa por todas as etapas do procedimento analítico, desde a etapa inicial de abertura ou extração ou digestão etc. até produzir a solução que será injetada uma ou mais vezes no instrumento de medição analítica.
- L = número de reinjeções das soluções de cada alíquota de análise no instrumento de medição analítica.

- $y^* = RI^*$ = resposta instrumental média das K reinjeções no instrumento de medição analítica das soluções obtidas das reanálises das K alíquotas de análise da mesma amostra de análise.
- $s^2(y^*) = s^2_{res,y}$ = desvio-padrão da resposta instrumental para a solução da amostra injetada no instrumento de medição analítica. No caso do MMQO, como a repetitividade das respostas instrumentais são homoscedásticas, usa-se a variância residual $s^2_{res,y'}$ calculada pela eq. (A.I.14) para estimar $s^2(y^*)$, i.e. $s^2(y^*) = s^2_{res,y}$.

ANEXO V

Planilhas de Cálculos no Excel validado

Para se fazer os cálculos do MMQO utilizando as equações eq. (A.I.3) a eq. (A.III.5) é recomendável a construção de uma planilha de cálculo eletrônica com a estrutura mostrada na planilha Excel do arquivo MMQO e MMQPR do Manual de Validação CGAL – Mapa.

Para facilitar a construção da planilha de cálculo vale salientar as seguintes identidades:

$$\sum_{i=1}^I x_i = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{l=1}^L x_{ijl}}{J \times L} \quad \text{onde } x_{ijl} = x_i \quad \forall j \text{ e } \forall l \quad (\text{A.V.1})$$

$$\sum_{i=1}^I x_i^2 = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{l=1}^L x_{ijl}^2}{J \times L} \quad \text{onde } x_{ijl} = x_i \quad \forall j \text{ e } \forall l \quad (\text{A.V.2})$$

$$\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \bar{y}_{ij} = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{l=1}^L y_{ijl}}{L} \quad (\text{A.V.3})$$

$$\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J x_i \bar{y}_{ij} = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{l=1}^L x_{ijl} y_{ijl}}{L} \quad \text{onde } x_{ijl} = x_i \quad \forall j \text{ e } \forall l \quad (\text{A.V.4})$$

$$\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \bar{y}_{ij}^2 = \frac{1}{L^2} \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \left(\sum_{l=1}^L y_{ijl} \right)^2 \quad (\text{A.V.5})$$

ANEXO VI

Cálculo da Estimativa dos Parâmetros da Regressão pelo Método dos Mínimos Quadrados Ponderados (MMQP)

O ajuste da reta de calibração pelo Método dos Mínimos Quadrados Ponderados (MMQP) deve ser feito nos casos em que a resposta instrumental é heterocedástica na faixa de calibração, i.e., repetitividades diferentes, desvios-padrão estatisticamente diferentes, nos diversos níveis de concentração das soluções de calibração.

Existem duas abordagens de MMQP: a absoluta, MMQPA, e a relativa, MMQPR. Usaremos neste Manual o MMQPR para evitar problemas com a representação numérica computacional de números grandes, como pode ocorrer em métodos analíticos cromatográficos.

O modelo linear dado pela eq. (A.I.1) assim como as definições associadas a essa equação continuam valendo no MMQP.

Para enfatizar a diferença entre os parâmetros ajustados pelo MMQP daqueles obtidos pelo MMQP, a equação regressão dada pela eq. (A.I.2) é reescrita como:

$$\hat{y}_i = a_w + b_w x_i \quad (\text{A.VI.1})$$

Onde:

- \hat{y}_i = variável dependente: é a resposta instrumental estimada (calculada) pela equação de regressão do MMQP no i -ésimo nível concentração.
- a_w = estimativa de MMQP da interseção a .
- b_w = estimativa da inclinação b .
- x_i = variável independente: são as concentrações conhecidas do analito nas soluções padrão de calibração em cada nível de concentração.

Procede-se à estimação da inclinação (b_w) ou coeficiente angular, da interseção (a_w) ou intercepto ou coeficiente linear e das somas quadráticas (S_w) para o caso do MMQP:

$$b_w = \frac{S_{xyw}}{S_{xxw}} = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i \bar{y}_{ij} - \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \bar{y}_{ij}}{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i \right)^2} \quad (\text{A.VI.2})$$

$$a_w = \bar{y}_w - b_w \bar{x}_w = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i^2 \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \bar{y}_{ij} - \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i \bar{y}_{ij}}{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i \right)^2} \quad (\text{A.VI.3})$$

Onde:

$$w_i = \frac{k_{norm}}{s_{yi}^2} \quad (\text{A.VI.4})$$

Todas as respostas instrumentais médias \bar{y}_{ij} de um dado nível de concentração têm o mesmo peso w_i , que é usado para as J respostas instrumentais médias \bar{y}_{ij} de cada nível.

A constante k_{norm} de normalização da eq. (A.VI.4) no MMQPA é $k_{norm} = 1$.

No MMQPR podemos usar qualquer outro valor k_{norm} constante para normalizar os pesos.

Usaremos como valor de k_{norm} a média das variâncias das respostas instrumentais dos I níveis de concentração da curva de calibração, conforme definido na eq. (A.VI.5):

$$k_{norm} = \bar{s}_{yi}^2 = \frac{\sum_{i=1}^I s_{yi}^2}{I} \quad (\text{A.VI.5})$$

$$s_{yi}^2 = \frac{\sum_{j=1}^J (\bar{y}_{ij} - \bar{y}_i)^2}{J - 1} \quad (\text{A.VI.6})$$

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^J \sum_{l=1}^L y_{ijl}}{J \times L} \quad (\text{A.VI.7})$$

$$\bar{y}_{ij} = \frac{\sum_{l=1}^L y_{ijl}}{L} \quad (\text{A.VI.8})$$

$$\begin{aligned} S_{xyw} &= \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i (x_i - \bar{x}_w) (\bar{y}_{ij} - \bar{y}_w) = \\ &= \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \sum_{l=1}^L \sum_{m=1}^L w_l x_i \bar{y}_{ij} - \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i \sum_{l=1}^L \sum_{m=1}^L w_l \bar{y}_{ij} \end{aligned} \quad (\text{A.VI.9})$$

$$\begin{aligned} S_{xxw} &= \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i (x_i - \bar{x}_w)^2 = \\ &= \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \sum_{l=1}^L \sum_{m=1}^L w_l x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i \right)^2 \end{aligned} \quad (\text{A.VI.10})$$

O denominador na eq. (A.VI.2) e na eq. (A.VI.3) é o S_{xxw} definido na eq. (A.VI.10).

$$\bar{y}_w = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \bar{y}_{ij}}{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i} = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{l=1}^L w_i y_{ijl}}{L \times \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i} \quad (\text{A.VI.11})$$

$$\bar{x}_w = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i}{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i} = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{l=1}^L x_i}{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{l=1}^L w_i} \quad (\text{A.VI.12})$$

As variâncias ou os quadrados dos desvios-padrão s^2 , do intercepto e da inclinação, assim como a covariância, $cov(a_w, b_w)$ entre eles são dadas por :

$$s^2(a_w) = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i^2}{S_{xxw}} \times k_{norm} \quad (\text{A.VI.13})$$

$$s^2(b_w) = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i}{S_{xxw}} \times k_{norm} \quad (\text{A.VI.14})$$

$$s_{a_w b_w}^2 = \text{cov}(a_w, b_w) = -\frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i}{S_{xxw}} \times k_{norm} \quad (\text{A.VI.15})$$

O resíduo de regressão ($e_{y_{ijl}}$) para cada uma das N_y respostas instrumentais é:

$$e_{y_{ijl}} = y_{ijl} - \hat{y}_i = y_{ijl} - (a_w + b_w x_i) \quad (\text{A.VI.16})$$

A variância residual do ajuste obtida dos resíduos dados pela eq. (A.VI.16) não tem nenhum significado no MMQP. Define-se também o resíduo ponderado $e_{y_{ijlw}}$ como:

$$e_{y_{ijlw}} = w_i (y_{ijl} - \hat{y}_i) = w_i [y_{ijl} - (a_w + b_w x_i)] \quad (\text{A.VI.17})$$

A variância residual do ajuste obtida dos resíduos dados pela eq. (A.VI.17) representa a variância do ponto de peso unitário, que raramente faz parte dos valores experimentais.

ANEXO VII

Qualidade do Ajuste e Verificação da Heterocedasticidade da Resposta Instrumental na Regressão pelo MMQP

Calcular os N_y *resíduos normalizados* (ou padronizados ou reduzidos) $e_{yijl, norm}$ a partir da regressão ponderada, usando a eq. (A.VII.1). Esses *resíduos normalizados* são na verdade estatísticas t de Student.

$$e_{yijl, norm} = \frac{e_{yijl}}{s_{res, yi}} \quad (\text{A.VII.1})$$

Construir o gráfico de dispersão dos *resíduos normalizados* da regressão em função da concentração para comprovar a não homogeneidade das variâncias (heterocedasticidade).

Se a distribuição dos *resíduos normalizados* for aleatória, segundo a Figura A.II.1 (a), apresentando envoltório retangular – retas paralelas na Figura A.II.1 (a) – comprova-se que não há homogeneidade das variâncias, i.e., heterocedasticidade, e o Método dos Mínimos Quadrados Ponderados (MMQP) deve ser, de fato, aplicado.

Se a distribuição dos *resíduos normalizados* apresentar envoltórias na forma de um cone crescente, como na Figura A.II.1 (b) (retas oblíquas) ou decrescente (outras formas de envoltórias que não a retangular são possíveis), conclui-se que a heterocedasticidade (os desvios-padrão s_i de cada nível de concentração) não foi adequadamente estimada a partir dos dados de calibração disponíveis. Nesse caso devemos aumentar o número J de replicatas de reparo das soluções de calibração.

Se o problema persistir, refazer toda a curva de calibração.

Formas em U ou em U invertido indicam falta de ajuste ou de linearidade (i.e., curva de calibração não retilínea) na faixa de calibração. Nesses casos, a curva de calibração pode ser ajustada por um polinômio de ordem superior a um, usando o MMQP, ou alternativamente reduz-se a faixa de concentração da calibração.

ANEXO VIII

Avaliação dos Pontos Duvidosos, Aberrantes, Extremos (*outliers*) e Critérios de Aceitação para a Linearidade no MMQP

Avaliar os pontos duvidosos, aberrantes, extremos (*outliers*) da curva de calibração (de calibração) por meio da estatística:

$$t_{y_{ijl},\text{calc}} = \frac{|e_{y_{ijl}}|}{S_{res,yi}} = |e_{y_{ijl},\text{norm}}| \quad (\text{A.VIII.1})$$

Onde:

- $e_{ijl} = y_{ijl} \text{ medido} - y_i \text{ calculado}$. Notar que não é o resíduo ponderado definido na eq. (A.VI.17) e sim o da eq. (A.VI.16).
- $S_{res,yi}$ = desvio-padrão amostral das respostas instrumentais do i -ésimo nível de concentração calculado pela eq. (A.III.2), mas agora usando os valores de \hat{y}_i calculados pela eq. (A.VI.1) do ajuste de MMQP. Seu valor é diferente, mas próximo daquele calculado pela eq. (A.VI.6):

$$S_{res,yi} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^J \sum_{l=1}^L (y_{ijl} - \hat{y}_i)^2}{J \times L - 1}} \quad (\text{A.VIII.2})$$

Se o valor de $t_{y_{ijl},\text{calc}}$ para um ponto duvidoso de uma curva de calibração for menor ou igual ao valor de t crítico tabelado, t_{crit} , bilateral, para nível de confiança igual a 95% e $(J \times L - 1)$ graus de liberdade, considera-se que o ponto pertence à curva e a faixa até ele é linear.

Calcular o coeficiente de correlação linear (r_w) pelo método dos mínimos quadrados ponderado:

$$\begin{aligned}
r_w &= \frac{S_{xyw}}{\sqrt{S_{xxw}S_{yyw}}} = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i (x_i - \bar{x})(\bar{y}_{ij} - \bar{y})}{\left[\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i (x_i - \bar{x})^2 \times \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i (\bar{y}_{ij} - \bar{y})^2 \right]^{1/2}} = \\
&= \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \bar{y}_{ij} (x_i - \bar{x})}{\left[\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i (x_i - \bar{x})^2 \times \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i (\bar{y}_{ij} - \bar{y})^2 \right]^{1/2}} = \\
&= \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i \bar{y}_{ij} - \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \bar{y}_{ij}}{\left[\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i \right)^2 \right]^{1/2} \times \left[\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \bar{y}_{ij}^2 - \left(\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \bar{y}_{ij} \right)^2 \right]^{1/2}}
\end{aligned}$$

(A.VIII.3)

Onde:

$$\begin{aligned}
S_{yyw} &= \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i (\bar{y}_{ij} - \bar{y}_w)^2 = \\
&= \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \bar{y}_{ij}^2 - \left(\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \bar{y}_{ij} \right)^2 = \\
&= \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \bar{y}_{ij}^2 - \left(\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{l=1}^L w_i y_{ijl} \right)^2 / L^2
\end{aligned}$$

(A.VIII.4)

Critério de aceitação para linearidade (caso das variâncias heterogêneas ou heterocedasticidade). Calcular a estatística t_{rw} :

$$t_{rw} = \frac{|r_w| \sqrt{N_x - 2}}{\sqrt{1 - r_w^2}} = |r_w| \sqrt{\frac{N_x - 2}{1 - r_w^2}}$$

(A.VIII.5)

Se o valor de t_{rw} para a regressão da curva de calibração for maior ou igual ao valor de t crítico (tabelado) bilateral, para nível de confiança igual a 95% e $(N_x - 2)$ graus de liberdade, considera-se que a faixa é linear, i.e., rejeita-se a hipótese nula $H_0: r_w = 0$ de que não há correlação entre x e y .

ANEXO IX

Avaliação da Incerteza de Previsão da Concentração do Analito na Curva de Calibração, Cálculo de Incerteza de Calibração no MMQP

A incerteza padrão da concentração do analito obtida da interpolação na curva de calibração $u(x^*)$ é dada pelas equações eq. (A.IX.1a) ou eq. (A.IX.1b) ou eq. (A.IX.1c), que são equivalentes entre elas.

A incerteza $u(x^*)$ não é a incerteza da concentração do analito na amostra de ensaio, pois ela não leva em consideração as demais fontes de incerteza do procedimento analítico.

A incerteza $u(x^*)$ dada pelas equações eq. (A.IX.1a) ou eq. (A.IX.1b) ou eq. (A.IX.1c) é apenas a incerteza devido à curva de calibração e é um dos componentes da incerteza padrão da concentração do analito na amostra.

$$u_{Calib}(x^*) = \sqrt{\frac{s^2(y^*)/K + s^2(a_w) + (x^*)^2 s^2(b_w) + 2x^* \text{cov}(a_w, b_w)}{b_w^2}} \quad (\text{A.IX.1a})$$

$$u_{Calib}(x^*) = \sqrt{k_{norm}} \times \sqrt{\frac{1}{K \times w^*} + \frac{1}{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i} + \frac{(x^* - \bar{x}_w)^2 \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i}{S_{xxw}}} \quad (\text{A.IX.1b})$$

$$u_{Calib}(x^*) = \sqrt{k_{norm}} \times \sqrt{\frac{1}{K \times w^*} + \frac{1}{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i} + \frac{(y^* - \bar{y}_w)^2 \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i}{b_w^2 S_{xxw}}} \quad (\text{A.IX.1c})$$

Onde:

$$w^* = \frac{k_{norm}}{S_{y^*}^2} \quad (\text{A.IX.2})$$

É o peso da resposta instrumental obtida para a solução da amostra de ensaio cujo desvio-padrão amostral é $s_{y^*} = s(y^*)$.

A constante de normalização k_{norm} definida pela eq. (A.VI.5) e que aparece nas equações eq. (A.VI.13), eq. (A.VI.14), eq. (A.VI.15), eq. (A.IX.1b) e eq. (A.IX.1c) deve ser substituída pelo valor unitário (1) quando se usar as equações, apresentadas anteriormente, no MMQPA. A não observância dessa nota é causa de erro em alguns *softwares* comerciais e em bibliografias de estatística para a química.

A título de exemplo, a equação (2.18) em Meier e Zund (2000, p. 98); a equação (5.17) em Miller e Miller (2005, p. 151); e a equação (8.28) em Massart et al. (1997, p. 200) são diferentes entre si e não resultam em valor igual ao dado pela eq. (A.IX.1a). As equações dessas referências também são diferentes da eq. (A.IX.1b) e da eq. (A.IX.1c) citadas anteriormente, que com $k_{norm} = 1$ são idênticas à equação (21) em Cetama (1986, p. 361).

ANEXO X

Glossário: Definições, Vocábulos, Termos, Siglas e Abreviações

Neste documento são adotadas preferencialmente as definições dos termos e vocábulos empregadas no Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM) [22,28]. São também adotadas as definições do Codex Alimentarius [9] presentes no documento “Guidelines on Analytical Terminology” CAC/GL 72-2009, que por sua vez adota as definições do VIM. Finalmente, são relatadas definições do livro “Analytical Chemistry, Theoretical and Metrological Fundamentals” de Kaus Danzer 2007 [47], do Guia Eurachem 1998 “The Fitness for Purpose of the Analytical Measurement” [15], do Orange Book da IUPAC [45] e de algumas normas ISO.

Acurácia ou exatidão: Grau de concordância entre um valor medido e um valor verdadeiro de um mensurando [21].

Grau de concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito.

A acurácia é determinada pela veracidade (*trueness*) e precisão.

Adequado ao propósito (*fit for purpose*), ou adequação ao propósito (*fitness for purpose*), ou adequado ao propósito de uso, ou adequado ao uso pretendido: Grau com o qual o resultado de um procedimento de medição permite ao usuário tomar uma decisão tecnicamente e administrativamente correta para um dado propósito (seção 18.6.1 do IUPAC Orange Book [45] e [36].

Um processo formal de avaliar que um procedimento é adequado para dada aplicação [33].

Alíquota de ensaio ou alíquota analítica: A quantidade de material (usualmente homogeneizado) tomada da amostra de ensaio ou amostra analítica e sobre a qual a análise é realizada. Uma subamostra representativa da amostra de ensaio, ou seja, a alíquota que será analisada.

Amostras de Controle de Qualidade (ACQ): São amostras de matrizes brancas adicionadas com o analito, em três concentrações: baixa (0,5 vezes o LMR), média (1,0 vezes o LMR) e alta (1,5 vezes o LMR). No caso de substância proibida com o LMDR estabelecido, ou seu equivalente, os controles de baixa devem ter concentração igual à zero, os controles de média devem ter concentração igual ao limite de detecção do método e os controles de alta devem ter concentração igual ao Limite Mínimo de Desempenho Requerido. As ACQ são usadas para monitorar o desempenho de análises químicas e para avaliar integridade, validade e confiabilidade dos resultados.

Amostra de laboratório ou amostra laboratorial: Amostra enviada para e recebida pelo laboratório.

Amostra de ensaio ou amostra analítica: Amostra preparada a partir da amostra de laboratório, da qual são retiradas as “alíquotas ou porções de ensaio” ou as “alíquotas ou porções analíticas”. Amostra laboratorial depois da remoção de quaisquer partes que não serão analisadas, e.g. ossos, solo aderido. Pode ser ou não cominuída e misturada antes de se retirar as alíquotas de ensaio, de acordo com a necessidade ou o propósito do ensaio.

Analito: A espécie química, substância, que será identificada e/ou cuja concentração (ou massa) será determinada em uma amostra de ensaio.

Analito representativo: Analito escolhido, de acordo com as suas características e propriedades físico-químicas, para representar um grupo de analitos susceptíveis de serem semelhantes quanto ao seu comportamento analítico, sob determinado procedimento analítico multiresíduos.

Calibração: Operação que estabelece, numa primeira etapa e sob condições especificadas, uma relação entre os valores e as incertezas de medição fornecidas por padrões e as indicações correspondentes com as incertezas associadas; numa segunda etapa, utiliza esta informação para estabelecer uma relação visando à obtenção de um resultado de medição a partir de uma indicação [22,28].

Nota 1: Uma calibração pode ser expressa por meio de uma declaração, uma função de calibração, um diagrama de calibração, uma curva de calibração ou uma tabela de calibração. Em alguns casos, pode consistir de uma correção aditiva ou multiplicativa da indicação com uma incerteza de medição associada.

Nota 2: Convém não confundir a calibração com o ajuste de um sistema de medição, frequentemente denominado de maneira imprópria de “autocalibração”, nem com a verificação da calibração.

Nota 3: Frequentemente, apenas a primeira etapa na definição acima é entendida como sendo calibração.

Capacidade de Detecção (CC β): É o teor mais baixo que pode ser detectado, identificado e/ou quantificado numa amostra com uma probabilidade de erro β .

Chemical Abstracts Service (CAS): Serviço de Resumos Químicos.

Comparação Interlaboratorial (CI) ou Ensaio Interlaboratoriais (EI): Organização, realização e avaliação de ensaios ou medições de um mesmo item ou itens similares por dois ou mais laboratórios de acordo com condições predeterminadas [ISO 13528:2005].

Condição de precisão intermediária: Condição de medição num conjunto de condições, as quais compreendem o mesmo procedimento de medição, o mesmo local e medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares, ao longo de um período extenso de tempo, mas pode incluir outras condições que envolvam mudanças.

Nota 1: As condições que podem variar compreendem novas calibrações, padrões, operadores e sistemas de medição.

Nota 2: É conveniente que uma especificação referente às condições contenha, na medida do possível, as condições que mudaram e as que não.

Nota 3: Em química, o termo “condição de precisão interserial (intercorrida, interbatelada)” é, algumas vezes, utilizado para designar este conceito.

Condição de repetitividade: Condição de medição num conjunto de condições, as quais compreendem o mesmo procedimento de medição, os mesmos operadores, o mesmo sistema de medição, as mesmas condições de operação e o mesmo local, assim como medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares durante um curto período de tempo.

Nota 1: Uma condição de medição é uma condição de repetitividade apenas com respeito a um conjunto especificado de condições de repetitividade.

Nota 2: Em química, o termo “condição de precisão intrasserial” (intracorrida, intrabatelada) é, algumas vezes, utilizado para designar este conceito.

Condição de reprodutibilidade: Condição de medição num conjunto de condições, as quais compreendem diferentes locais, diferentes operadores, diferentes sistemas de medição e medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares.

Nota 1: Os diferentes sistemas de medição podem utilizar procedimentos de medição diferentes.

Nota 2: Na medida do possível, é conveniente que sejam especificadas as condições que mudaram e as que não mudaram.

Controle de Qualidade (CQ): Conjunto de atividades do sistema de gestão da qualidade focado em demonstrar que os requisitos de qualidade são atendidos. É constituído do conjunto de atividades planejadas para monitorar, verificar e controlar a qualidade dos resultados analíticos, tais como: a análise de amostra branca, ou de amostra de controle, ou de material de referência certificado, a elaboração de cartas de controle e a participação em avaliações externas de qualidade, como os ensaios interlaboratoriais colaborativos e de proficiência.

Controle de Qualidade Interno (CQI): Conjunto de ações que um laboratório de química analítica pode utilizar para assegurar que os resultados produzidos estão adequados à finalidade proposta. Na prática, a adequação ao propósito é determinada por uma comparação entre a exatidão obtida

no laboratório, em tempo determinado, com o nível de exatidão requerido. O CQI, portanto, inclui procedimentos práticos de rotina que possibilitam ao analista aceitar um resultado ou grupos de resultados como adequados ao propósito ou rejeitar os resultados e repetir as análises.

Curva de calibração: Expressão da relação entre uma indicação e o valor medido correspondente [22,28].

Nota 1: Uma curva de calibração expressa uma relação biunívoca que não fornece um resultado de medição, pois ela não contém informação a respeito da incerteza de medição.

Nota 2: O termo “curva analítica” é muitas vezes usado como sinônimo de curva de calibração.

Curva de Calibração de Analito em Solvente (CCAS): Curva de calibração, sem ajuste de matriz ou não matrizada, de um instrumento de medição obtida a partir de soluções padrão de calibração, preparadas pela dissolução do analito puro em um solvente puro.

Curva de Calibração de Extrato de Matriz Branca Fortificado com o Analito (CCEMBF): Curva de calibração, com ajuste de matriz ou matrizada, de um instrumento de medição obtida a partir de soluções padrão de calibração, preparadas por meio da fortificação do extrato/digerido/solução de abertura de uma matriz branca da amostra a analisar com o analito puro. A obtenção do extrato (não fortificado) de matriz branca deve ser feita com uma massa de matriz branca igual à massa de amostra a analisar e para volume igual ao obtido na extração de amostras a analisar. Diluições de uma solução de calibração obtida dessa forma devem ser feitas com o extrato não fortificado de matriz branca.

Curva de Calibração de Matriz Branca Fortificada com o Analito (CCMBF): Curva de calibração, com ajuste de matriz ou matrizada, de um instrumento de medição obtida a partir de soluções padrão de calibração preparadas por meio da fortificação da matriz branca da amostra a analisar com o analito puro, seguida da extração/digestão/abertura, de forma a obter um volume fixo de solução. Diluições de uma solução de calibração obtida dessa forma devem ser feitas com o extrato não fortificado de matriz branca.

Curva de Calibração Matrizada (CCM) ou Curva de Calibração com Ajuste de Matriz: É a curva de calibração ou característica de resposta construída a partir da matriz branca fortificada, do extrato de matriz branca fortificado, ou do material de referência certificado, ou do extrato do material de referência certificado.

DCB: Denominação Comum Brasileira

DCI: Denominação Comum Internacional

Desvio-Padrão Relativo de Repetitividade (DPR_r), *Repeatability Relative Standard Deviation (RSD_r)*, ou Coeficiente de Variação de Repetitividade (CV_r): Desvio-padrão relativo calculado de resultados gerados sob condições de repetitividade:

$$RSD_r = DPR_r = CV_r = 100 \times s_r / \bar{x}$$

Desvio-Padrão Relativo de Reprodutibilidade (DPR_R), *Reproducibility Relative Standard Deviation (RSD_R)* ou Coeficiente de Variação de Reprodutibilidade (CV_R): Desvio-padrão relativo calculado de resultados gerados sob condições de reprodutibilidade:

$$DPR_R = RSD_R = CV_R = 100 \times s_R / \bar{x}$$

Desvio-Padrão de Repetitividade (s_r): Desvio-padrão amostral (experimental) calculado de resultados gerados sob condições de repetitividade.

Desvio-Padrão de Reprodutibilidade (s_R): Desvio-padrão amostral (experimental) calculado de resultados gerados sob condições de reprodutibilidade.

Ensaio (Estudo, Comparação) interlaboratorial: Estudo em que diversos laboratórios medem uma grandeza em uma ou mais porções idênticas de um material estável e homogêneo, em condições documentadas, cujos resultados são compilados em um único relatório [47].

Ensaio (Estudo) Colaborativo (EC): Determinação do desempenho de um procedimento de medição ou de ensaio mediante comparações (ensaios ou estudos) interlaboratoriais.

Ensaio (Estudo) de Proficiência (EP): Determinação do desempenho de um laboratório de medição ou de ensaio por meio de comparações (ensaios ou estudos) interlaboratoriais [ISO 13528:2005].

Avaliação do desempenho de um participante sob critérios preestabelecidos por comparações (ensaios ou estudos) interlaboratoriais [ISO 17043:2010].

Erro aleatório: Componente do erro de medição que, em medições repetidas, varia de maneira imprevisível.

Erro alfa (α) ou erro do tipo I: É a obtenção de um resultado de análise que estabelece a não conformidade de uma amostra quando ela é de fato conforme. É também chamado de falso não conforme, ou falso positivo, e de risco do vendedor ou do produtor.

Erro beta (β) ou erro do tipo II: É a obtenção de um resultado de análise que estabelece a conformidade de uma amostra quando ela é de fato não conforme. É também chamado de falso conforme, ou falso negativo, e de risco do comprador ou do cliente.

Erro de medição: Diferença entre o valor medido de uma grandeza e um valor de referência.

Erro sistemático: Componente do erro de medição que, em medições repetidas, permanece constante ou varia de maneira previsível.

Escopo ou aplicabilidade: Os analitos, matrizes e concentrações para os quais o procedimento analítico pode ser usado satisfatoriamente.

Nota: Além da definição da faixa de capacidade de desempenho satisfatório de cada fator, a definição da aplicabilidade (escopo) pode incluir advertências como a conhecida interferência de outros analitos e a não aplicabilidade do procedimento analítico a certas matrizes e situações.

Exatidão ou Acurácia: Ver acurácia.

Fator de abrangência: Número maior do que um, pelo qual uma incerteza padrão combinada é multiplicada para se obter uma incerteza de medição expandida [22,28].

Nota: Um fator de abrangência é geralmente simbolizado por k (ver também o Guia ISO/IEC 98-3:2008, 2.3.6).

Faixa de Trabalho (FT) ou faixa de medição ou faixa validada: Conjunto de valores de um mensurando para os quais os erros do procedimento medição analítica estão dentro de limites especificados (adaptado de [15,45]).

O intervalo entre as concentrações inferior e superior do analito na amostra de ensaio dentro da qual foi determinado que o procedimento analítico é adequado ao uso pretendido (adaptado de [47])

Faixa de linearidade ou faixa linear ou faixa dinâmica linear: Faixa de concentração na qual a resposta instrumental é linear com a concentração do analito [47].

Em geral, quando se refere a uma faixa linear, considera-se o comportamento funcional da curva de calibração. Nesse caso, a concentração do analito a qual essa definição se refere é aquela no domínio de concentração das soluções padrão de calibração. Para evitar dúvidas, recomendamos usar as expressões: **faixa de linearidade da calibração**, ou **faixa linear da calibração**, ou **faixa dinâmica linear da calibração**.

Não se deve confundir a faixa de linearidade da calibração com a faixa de trabalho ou faixa validada. A primeira está no domínio de concentração do analito nas soluções de calibração, enquanto a segunda está no domínio de concentração do analito nas amostras de ensaio, o mensurando. A diferença entre esses domínios de concentração depende do tipo de unidades de medição de cada um e de fatores de diluição ou pré-concentração das soluções de extração/abertura/digestão das amostras de ensaio e é determinada pela função de medição (equação do mensurando). Quando alíquotas da solução de extração/abertura/digestão são submetidas diretamente ao instrumento de medição analítica, sem diluições ou pré-concentrações, a

constante de proporcionalidade entre esses dois domínios pode, mas não obrigatoriamente, ser igual à unidade.

Função analítica ou função avaliação: Função inversa da função de calibração, $x = f^{-1}(y)$, que descreve a dependência do valor analítico (concentração do analito no padrão de calibração) com o valor medido (resposta instrumental) [47].

Exemplo: No caso em que a função de calibração é a equação da reta $y = a + bx$, então a função analítica será $x = (y - a)/b$.

Função de medição: Função de grandezas cujo valor, quando calculado a partir de valores conhecidos das grandezas de entrada no modelo de medição, é medido da grandeza de saída no modelo de medição [22,28].

Nota 1: Se um modelo de medição $h(Y, X_1, \dots, X_n) = 0$ pode ser escrito explicitamente como $Y = f(X_1, \dots, X_n)$, onde Y é a grandeza de saída no modelo de medição, a função f é a função de medição. Geralmente, f pode simbolizar um algoritmo que fornece, para os valores da grandeza de entrada x_1, \dots, x_n , um valor de saída único correspondente a $y = f(x_1, \dots, x_n)$.

Nota 2: A função de medição também é utilizada para calcular a incerteza de medição associada ao valor medido de Y .

Nota 3: Costuma-se também chamar a função de medição de “**equação do mensurando**” ou “**equação de medição**”, embora esses termos não constem do VIM.

Função de calibração: Equação para a estimação do valor de uma grandeza y a partir de um dado valor de uma grandeza analítica x : $y = f(x)$. A função de calibração pode ser conhecida *a priori* por leis naturais ou estimada experimentalmente por meio de amostras de calibração. A função de calibração representa aquele segmento da função resposta escolhido para estimar o valor analítico de uma amostra de ensaio [47].

Exemplos: O tipo de função de calibração mais usado em química analítica é a equação da reta ou função afim: $y = a + bx$, onde y é a resposta instrumental (e.g., absorvância, área de pico etc.) e x é a concentração do analito na solução padrão de calibração. Costuma-se dizer nesses casos que a função de calibração é linear, mas a expressão mais estritamente correta seria “calibração linear na concentração”. Funções de calibração não lineares na concentração são, por exemplo, $y = a \cdot e^{bx}$, que tem concavidade para cima e sensibilidade crescente com o aumento da concentração; $y = a - be^{-cx}$, que tem concavidade para baixo e sensibilidade decrescente com o aumento da concentração; ou ainda polinômios de segundo ($y = a + bx + cx^2$) ou terceiro grau ($y = a + bx + cx^2 + dx^3$). Essas duas últimas são lineares nos parâmetros ajustados a , b , c , e d , mas não na concentração x .

Função resposta: Relação entre a resposta de um instrumento analítico e a quantidade do analito. A função resposta completa é frequentemente não retilínea [47].

O intervalo de concentração da função resposta contém, em seu interior, o intervalo de concentração da função de calibração.

Garantia da qualidade: Conjunto das ações sistemáticas planejadas e necessárias para prover a adequada confiança de que o resultado analítico satisfará um dado requisito de qualidade.

Grandeza: Propriedade de um fenômeno, de um corpo ou de uma substância, que pode ser expressa quantitativamente sob a forma de um número e de uma referência [22,28].

Nota 1: O conceito genérico de “grandeza” pode ser dividido em vários níveis de conceitos específicos.

Nota 2: A referência pode ser uma unidade de medida, um procedimento de medição, um material de referência ou uma combinação desses.

Nota 3: As séries ISO 80000 e IEC 80000 *Quantities and units* fornecem os símbolos das grandezas. Os símbolos das grandezas são escritos em itálico. Um dado símbolo pode indicar diferentes grandezas.

Nota 4: O formato preferido pela IUPAC-IFCC para designar as grandezas na área de medicina laboratorial é “Sistema-Componente; tipo de grandeza”.

Exemplo: “Plasma (Sangue)–Íon sódio; concentração em quantidade de substância igual a 143 mmol/L em determinada pessoa, em determinado instante.”

Nota 5: Uma grandeza, conforme aqui definida, é escalar (valor numérico associado a uma unidade de medida). Entretanto, um vetor ou um tensor, cujas componentes são grandezas, é também considerado como uma grandeza.

Nota 6: O conceito de “grandeza” pode ser genericamente dividido em, por exemplo, grandeza física, grandeza química e grandeza biológica, ou grandeza de base e grandeza derivada.

Grandeza de entrada: Grandeza que deve ser medida, ou grandeza cujo valor pode ser obtido de outro modo, para calcular um valor medido de um mensurando [22,28].

Exemplo: Quando o comprimento de uma haste de aço a uma temperatura especificada é o mensurando, a temperatura real, o comprimento na temperatura real e o coeficiente de dilatação térmica linear da haste são grandezas de entrada.

Nota 1: Uma grandeza de entrada é frequentemente uma grandeza de saída de um sistema de medição.

Nota 2: As indicações, as correções e as grandezas de influência são grandezas de entrada.

Grandeza de saída: Grandeza cujo valor medido é calculado utilizando-se os valores das grandezas de entrada em um modelo de medição [22,28].

Grandeza de influência: Grandeza que, em uma medição direta, não afeta a grandeza efetivamente medida, mas afeta a relação entre a indicação e o resultado de medição [22,28].

Exemplo 1: Frequência na medição direta da amplitude constante de uma corrente alternada com um amperímetro.

Exemplo 2: Concentração em quantidade de substância de bilirrubina, em uma medição direta da concentração, em quantidade de substância de hemoglobina no plasma sanguíneo humano.

Exemplo 3: Temperatura de um micrômetro utilizado na medição do comprimento de uma haste, mas não a temperatura da própria haste que pode fazer parte da definição do mensurando.

Exemplo 4: Pressão ambiente na fonte iônica de um espectrômetro de massa, durante uma medição de uma fração molar.

Nota 1: Uma medição indireta compreende uma combinação de medições diretas, em que cada uma delas pode ser afetada por grandezas de influência.

Nota 2: No *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement* (GUM), o conceito “grandeza de influência” é definido como na 2ª edição do VIM, contemplando não somente as grandezas que afetam o sistema de medição, como na definição anterior, mas também as que afetam as grandezas efetivamente medidas. Além disso, no GUM este conceito não está limitado a medições diretas.

Heterocedasticidade: Antônimo de homoscedasticidade.

Homoscedasticidade: Igualdade dos desvios-padrão de diferentes amostras estatísticas. Em uma curva de calibração, refere-se à igualdade estatística dos desvios-padrão das replicatas das respostas instrumentais em diferentes níveis de concentração das soluções padrão de calibração.

HORRAT_R – Reproducibility Horwitz Ratio, razão de Horwitz de reprodutibilidade: Desvio-Padrão Relativo de Reprodutibilidade (DPRR) ou Coeficiente de Variação de Reprodutibilidade (CVR), dividido pelo Desvio-Padrão Relativo de Reprodutibilidade (DPRR_H) ou Coeficiente de Variação de Reprodutibilidade (CVR_H) estimado por meio da equação de Horwitz, na qual w é a fração de massa do analito (com ambos, numerador e denominador, nas mesmas unidades):

$$HorRat_R = \frac{100s_R/w}{2w^{-0,1505}} = \frac{100s_R/w}{2^{1-0,5\log w}}$$

HORRAT_r – Repeatability Horwitz Ratio, razão de Horwitz de repetitividade: Desvio-Padrão Relativo de Repetitividade (DPRr), ou Coeficiente de Variação de Repetitividade (CVR), dividido pelo Desvio-Padrão Relativo de Repetitividade (DPRr_H) ou Coeficiente de Variação de Repetitividade (CVR_H) estimado pela equação de Horwitz, na qual w é a fração de

massa do analito (com ambos, numerador e denominador, nas mesmas unidades), e usando a hipótese $s_r = 2/3 s_R$:

$$HorRat_r = \frac{100s_r/w}{2/3 \times 2w^{-0,1505}} = \frac{100s_r/w}{2/3 \times 2^{1-0,5\log w}}$$

Incerteza de medição: Parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas [22,28].

Nota 1: A incerteza de medição compreende componentes provenientes de efeitos sistemáticos, tais como componentes associados a correções e valores atribuídos a padrões, assim como a incerteza definicional. Algumas vezes não são corrigidos efeitos sistemáticos estimados; em vez disso são incorporados componentes de incerteza de medição associados.

Nota 2: O parâmetro pode ser, por exemplo, um desvio-padrão denominado incerteza padrão (ou um de seus múltiplos) ou a metade de um intervalo tendo uma probabilidade de abrangência determinada.

Nota 3: A incerteza de medição geralmente engloba muitos componentes. Alguns deles podem ser estimados por uma avaliação do Tipo A da incerteza de medição, a partir da distribuição estatística dos valores provenientes de séries de medições e podem ser caracterizados por desvios-padrão. Os outros componentes, que podem ser estimados por uma avaliação do Tipo B da incerteza de medição, podem também ser caracterizados por desvios-padrão estimados a partir de funções de densidade de probabilidade baseadas na experiência ou em outras informações.

Nota 4: Geralmente para um dado conjunto de informações, subentende-se que a incerteza de medição está associada a determinado valor atribuído ao mensurando. Uma modificação desse valor resulta em modificação da incerteza associada.

Incerteza de Medição Analítica (IMA): Incerteza de medição associada ao mensurando obtido através de um procedimento de análise química validado.

Incerteza de medição expandida ou incerteza expandida: Produto de uma incerteza padrão combinada por um fator maior do que o número um [22,28].

Nota 1: O fator depende do tipo de distribuição de probabilidade da grandeza de saída e da probabilidade de abrangência escolhida.

Nota 2: O termo “fator” nesta definição se refere ao fator de abrangência.

Nota 3: A incerteza de medição expandida é chamada de “incerteza global”, no parágrafo 5 da Recomendação INC-1 (1980) (ver o GUM), e simplesmente “incerteza”, nos documentos IEC.

Incerteza Máxima Aceitável (Imax): Incerteza de medição máxima determinada em função do risco máximo aceitável de se tomar uma decisão

errada quando usando um resultado de medição. Ela pode ser estabelecida por norma, legislação, contrato ou internamente no laboratório. Resultados de medição com incertezas maiores que a incerteza máxima aceitável não são adequados ao uso pretendido.

Intervalo de abrangência: Intervalo, baseado na informação disponível, que contém o conjunto de valores verdadeiros de um mensurando, com probabilidade determinada [22,28].

Nota 1: Um intervalo de abrangência não está necessariamente centrado no valor medido escolhido (ver o Guia ISO/IEC 98-3:2008/Supl.1).

Nota 2: Não é recomendável que um intervalo de abrangência seja denominado “intervalo de confiança” para evitar confusão com o conceito estatístico (ver o Guia ISO/IEC 98-3:2008, 6.2.2).

Nota 3: Um intervalo de abrangência pode ser deduzido de uma incerteza de medição expandida (ver o Guia ISO/IEC 98-3:2008, 2.3.5).

Instrumento de medição: Dispositivo utilizado para realizar medições, individualmente ou associado a um ou mais dispositivos suplementares [22,28].

Nota 1: Um instrumento de medição que pode ser utilizado individualmente é um sistema de medição.

Nota 2: Um instrumento de medição pode ser um instrumento de medição indicador ou uma medida materializada.

Nota 3: Em química analítica é comum encontrarmos os termos “instrumento de medição analítica” ou “instrumento analítico”, e.g.: espectrômetro de absorção atômica, cromatógrafo, peagômetro, balança, bureta, pipeta, termômetro, multímetro, régua etc.

International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC): União de Química Pura e Aplicada.

Limite de Decisão ($CC\alpha$): É o limite a partir do qual se pode concluir que uma amostra é não conforme com uma probabilidade de erro α .

Limite de Detecção (LD): Valor medido, obtido por um dado procedimento de medição, para o qual a probabilidade de declarar falsamente a ausência de um componente em um material é β , sendo α a probabilidade de declarar falsamente a sua presença.

Essa definição é equivalente à definição de capacidade de detecção ($CC\beta$) [9,22,28,47].

Nota 1: A IUPAC recomenda valores convencionais para α e β iguais a 0,05.

Nota 2: Às vezes, usa-se a abreviação LD (LOD, em inglês).

Nota 3: O termo “sensibilidade” não deve ser empregado no sentido de limite de detecção.

Esta definição e suas notas são aquelas do §4.18 do VIM 2009 [22] e do JCGM 200:2008 [28]. A definição de LD corresponde à definição de capa-

cidade de detecção ($CC\beta$) da Decisão 2002/657/EC e à definição de valor mínimo detectável da variável líquida de estado da ISO 11843-1.

Limite de Quantificação (LQ) ou limite de determinação: Existem várias definições desse termo na literatura:

“Um valor analítico, xLQ , acima do qual a determinação analítica é possível com uma dada precisão mínima. A condição de precisão deve ser declarada em cada caso.” (DANZER, 2007) [47]

“É a menor concentração que pode ser determinada com veracidade e precisão de repetitividade aceitáveis.” (EURACHEM, 1998) [15]

“É o menor teor ou concentração de um analito que pode ser estimada com confiabilidade aceitável.” (AOAC 2002) [2]

“Concentração igual ou maior que a menor concentração da curva de calibração.” (ANVISA, 2007) [3]

“Teor mínimo medido a partir do qual é possível medir o analito com certeza estatística razoável (95% de confiança). Se a veracidade e a precisão são constantes numa gama de concentrações centrada no limite de detecção, o limite de quantificação é numericamente igual a seis ou dez vezes o desvio-padrão da média de ensaios em branco ($n > 20$).” (EC/333/2007) [12]

A definição do Codex Alimentarius é (CAC/GL 72-2009) [9]: “Uma característica de desempenho geralmente expressa em termos de um sinal ou um valor medido que produzirá uma estimativa que terá um desvio-padrão relativo – DPR especificado, em geral 10% (ou 6%).”

$$LQ = k_Q \sigma_Q, \quad k_Q = 1/DPR_Q$$

Onde LQ é o limite de quantificação, σ_Q é o desvio-padrão nesse ponto e k_Q é um multiplicador cujo valor é igual ao recíproco do desvio-padrão relativo (DPR) selecionado.

O DPR aproximado de uma estimativa de σ , baseada em ν graus de liberdade é $1/\sqrt{2\nu}$.

Nota: Se σ é conhecido e constante, então $\sigma_Q = \sigma_\nu$ uma vez que o desvio-padrão da quantidade estimada é independente da concentração. Substituindo k_Q pelo DPR obtém-se: $LQ = 10\sigma_\nu$. Nesse caso LQ é exatamente igual a 3,04 vezes o limite de detecção, considerando que os dados são normais $\alpha = \beta = 0,05$. No LQ uma identificação positiva pode ser alcançada com uma razoável e/ou previamente estabelecida confiança para uma dada matriz e usando um procedimento analítico específico.

Esta definição estabelece as bases para tratar as exceções ao caso simples descrito, i.e., envolvendo distribuições não-normais e heterocedasticidade, e.g. o processo de contagem (Poisson) como aquele usado em PCR em tempo real.

Limite Máximo de Resíduo (LMR): É a concentração máxima de um dado resíduo admissível em determinada matriz.

Nota 1: Os valores de LMR são estabelecidos pela Coordenação de Controle de Resíduos e Contaminantes (CCRC).

Limite Mínimo de Desempenho Requerido (LMDR): Teor mínimo de uma substância a analisar em uma amostra que deve ser detectável e passível de confirmação [10].

Nota 1: Tem o objetivo de padronizar o desempenho analítico mínimo requerido do procedimento analítico cuja substância, sob análise, não possui limite permitido definido. Nesses casos, $CC\alpha$ e $CC\beta$ devem ser menores que o LMDR.

Nota 2: Os valores do LMDR são estabelecidos pela Coordenação de Controle de Resíduos e Contaminantes (CCRC).

Limite de Referência (LR): É o teor máximo admissível de determinada substância em determinada matriz, estabelecido por legislação nacional ou internacional, pelo cliente interno ou externo.

Material de Referência Certificado (MRC): Material de referência, acompanhado por um certificado, com um ou mais valores de propriedades, atestado por um procedimento que estabelece sua rastreabilidade à obtenção exata da unidade na qual os valores da propriedade são expressos. Cada valor certificado é acompanhado por uma incerteza para um nível de confiança estabelecido [22,28].

Matriz branca ou amostra branca: Matriz isenta da substância a analisar ou cujo nível de concentração seja suficientemente baixo de modo a não interferir nos resultados de medição.

Matriz representativa: Matriz escolhida para representar um grupo de matrizes de composição semelhante e usada durante a validação de um procedimento analítico, para o qual se tenha demonstrado que não há diferença significativa do resultado do analito quando medido na matriz representativa e na matriz representada.

Menor Nível Calibrado (MNC): É a concentração (ou massa) mais baixa do analito com a qual o instrumento de medição analítica foi devidamente calibrado [10].

Medição: Processo de obtenção experimental de um ou mais valores que podem ser, razoavelmente, atribuídos a uma grandeza [22,28].

Nota 1: A medição não se aplica a propriedades qualitativas.

Nota 2: A medição implica a comparação de grandezas e engloba contagem de entidades.

Nota 3: A medição pressupõe uma descrição da grandeza que seja compatível com o uso pretendido de um resultado de medição, de um procedimento de medição e de um sistema de medição calibrado que opere

de acordo com um procedimento de medição especificado, incluindo as condições de medição.

Mensurando: Grandeza que se pretende medir [22,28].

Nota 1: A especificação de um mensurando requer o conhecimento do tipo de grandeza, a descrição do estado do fenômeno, do corpo ou da substância da qual a grandeza é uma propriedade, incluindo qualquer componente relevante e as entidades químicas envolvidas.

Nota 2: Na segunda edição brasileira do VIM, o mensurando é definido como a “grandeza específica submetida à medição” e na IEC 60050-300:2001, como a “grandeza submetida à medição”.

Nota 3: A medição, incluindo o sistema de medição e as condições sob as quais ela é realizada, pode modificar o fenômeno, o corpo ou a substância, de modo que a grandeza que está sendo medida pode diferir do mensurando como ele foi definido. Nesse caso, é necessária uma correção adequada.

Exemplo 1: A diferença de potencial entre os terminais de uma bateria pode diminuir quando, na realização da medição, é utilizado um voltímetro com uma condutância interna significativa. A diferença de potencial em circuito aberto pode ser calculada a partir das resistências internas da bateria e do voltímetro.

Exemplo 2: O comprimento de uma haste de aço em equilíbrio com a temperatura ambiente de 23°C será diferente do comprimento à temperatura especificada de 20°C. Nesse caso, é necessária uma correção.

Nota 4: Em química, “analito”, o nome de uma substância ou de um composto são termos utilizados algumas vezes para “mensurando”. Tal uso é incorreto porque esses termos não se referem a grandezas.

Método analítico: Sequência lógica de operações, descritas genericamente e resumidamente, usadas na execução de uma análise química de um dado analito ou um conjunto de analitos em uma matriz, usando determinada técnica analítica [47, ISO 3524-1].

Método multirresíduo: Método analítico capaz de identificar e quantificar vários tipos de analitos de um mesmo grupo químico ou de grupos químicos distintos, em determinada matriz.

Método ou procedimento normalizado: Procedimento analítico desenvolvido, validado e aprovado em ensaios interlaboratoriais colaborativos por um organismo de normalização.

Método ou procedimento oficial: Procedimento analítico desenvolvido, validado e aprovado em ensaios interlaboratoriais, por organismo de normalização ou outras organizações, devidamente homologado pelo órgão legalmente competente.

Nota 1: Os métodos descritos na Farmacopeia Brasileira são considerados métodos oficiais. Por analogia, também são reconhecidos os métodos descritos nas principais farmacopeias.

Nível de interesse ou nível requerido: A concentração da substância a analisar em uma amostra que é significativa para determinar a sua conformidade com a legislação [10].

Padrão interno (surrogate): Composto puro ou elemento adicionado à amostra de ensaio, cujo comportamento químico-físico é considerado como representativo do analito nativo. Às vezes, como nas técnicas analíticas envolvendo espectrometria de massa, são usadas moléculas do analito marcadas com algum isótopo de seus elementos constitutivos.

Padrão de referência: Padrão, geralmente tendo a mais alta qualidade metrológica disponível em um dado local ou em uma dada organização, a partir do qual as medições executadas são derivadas.

Padrão de trabalho (padrão analítico, padrão de calibração): Padrão utilizado rotineiramente para calibrar ou controlar medidas materializadas, instrumentos de medição ou materiais de referência. Um padrão de trabalho é geralmente calibrado por comparação a um padrão de referência. Em laboratórios químicos, o padrão de trabalho é, em geral, chamado de padrão analítico ou de calibração.

Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC)

Precisão de medição (precisão): Grau de concordância entre indicações ou valores medidos, obtidos por medições repetidas, no mesmo objeto ou em objetos similares, sob condições especificadas [22,28].

Nota 1: A precisão de medição é geralmente expressa numericamente por indicadores de incerteza tais como: dispersão, desvio-padrão (s), variância (s^2), ou coeficiente de variação (CV), sob condições de medição especificadas. Uma menor precisão é indicada por um elevado desvio-padrão.

Nota 2: As “condições especificadas” podem ser, por exemplo, condições de repetitividade, condições de precisão intermediária ou condições de reprodutibilidade (ver ISO 5725-3: 1994).

Nota 3: A precisão de medição é utilizada para definir a repetitividade, a precisão intermediária e a reprodutibilidade de medição.

Nota 4: O termo “precisão de medição” é algumas vezes utilizado, erroneamente, para designar a exatidão de medição.

Precisão intermediária (z): Precisão de medição sob um conjunto de condições de precisão intermediária [22,28].

Nota 1: Os termos estatísticos pertinentes são apresentados na ISO 5725-3: 1994.

Probabilidade de abrangência: Probabilidade de que o conjunto de valores verdadeiros de um mensurando esteja contido em um intervalo de abrangência especificado [22,28].

Nota 1: Esta definição se refere à abordagem de incerteza, como apresentado no GUM.

Nota 2: A probabilidade de abrangência é também chamada de “nível da confiança” no GUM.

Probabilidade de erro alfa (α): É a probabilidade de cometer o erro α . Isto é, a probabilidade de obter um resultado não conforme quando a amostra é de fato conforme.

Probabilidade de erro beta (β): É a probabilidade de cometer o erro β . Isto é, a probabilidade de classificar uma amostra como conforme quando ela é de fato não conforme.

Procedimento analítico: Conjunto de operações, descritas especificamente e detalhadamente, usadas na execução da análise de um analito particular ou um conjunto de analitos, de acordo com um dado método analítico [47, ISO 3524-1].

Rastreabilidade metrológica ou rastreabilidade: Propriedade de um resultado de medição pela qual tal resultado pode ser relacionado a uma referência por meio de uma cadeia ininterrupta e documentada de calibrações, cada uma contribuindo para a incerteza de medição [22,28].

Nota 1: Para esta definição, a “referência” pode ser definição de uma unidade de medida por meio de sua realização prática, ou um procedimento de medição que engloba a unidade de medida para uma grandeza não ordinal, ou um padrão.

Nota 2: A rastreabilidade metrológica requer uma hierarquia de calibração estabelecida.

Nota 3: A especificação da referência deve compreender a data em que ela foi utilizada no estabelecimento da hierarquia de calibração, juntamente com qualquer outra informação metrológica relevante sobre a referência, tal como a data na qual foi realizada a primeira calibração da hierarquia de calibração.

Nota 4: Para medições com mais de uma grandeza de entrada no modelo de medição, cada valor de entrada deve ter sua própria rastreabilidade e a hierarquia de calibração envolvida pode formar uma estrutura ramificada ou uma rede. O esforço envolvido no estabelecimento da rastreabilidade metrológica para cada valor da grandeza de entrada deve ser proporcional à sua contribuição relativa para o resultado de medição.

Nota 5: A rastreabilidade metrológica de um resultado de medição não assegura que a incerteza de medição seja adequada para um dado objetivo ou que exista uma ausência de erros humanos.

Nota 6: Uma comparação entre dois padrões pode ser considerada como uma calibração se ela for utilizada para verificar e, se necessário, corrigir o valor e a incerteza de medição atribuídos a um dos padrões.

Nota 7: O ILAC considera que os elementos necessários para confirmar a rastreabilidade metrológica são uma cadeia de rastreabilidade ininterrupta a um padrão internacional ou a um padrão nacional, uma incerteza de medição documentada, um procedimento de medição documentado, uma competência técnica reconhecida, a rastreabilidade metrológica ao SI e os intervalos entre calibrações (ver ILAC P-10:2002).

Nota 8: O termo abreviado “rastreabilidade” é, às vezes, utilizado com o significado de “rastreabilidade metrológica”, assim como de outros conceitos, tais como “rastreabilidade de uma amostra, de um documento, de um instrumento ou de um material”, em que o histórico de um item é importante. Portanto, é preferível utilizar o termo completo “rastreabilidade metrológica” para evitar quaisquer dúvidas.

Recuperação ou fator de recuperação: Fração da concentração ou da quantidade de analito presente, ou adicionado, ou presente e adicionado na alíquota da amostra de ensaio, que é extraída e apresentada para o instrumento de medição. A recuperação mede toda a parte do analito que não é extraída da amostra, ou que se perde nas etapas analíticas anteriores à medição instrumental.

Replicatas independentes: Para fins deste documento, definimos como “replicatas independentes” aquelas replicatas para as quais todo o processo experimental de medição ou de análise química, ou de produção de uma solução de calibração, ou de obtenção de uma amostra de ensaio etc. é repetido desde a sua etapa inicial. Não são replicatas independentes os vários valores de respostas instrumentais obtidos de releituras de uma única injeção no instrumento de medição analítica, de uma mesma solução padrão de calibração, ou de uma mesma solução de amostra de ensaio. Para que essas respostas instrumentais sejam independentes suas soluções devem ser re preparadas desde o início e cada solução re preparada lida uma única vez no instrumento de medição analítico.

Repetitividade de medição ou repetitividade (r): Precisão de medição sob um conjunto de condições de repetitividade [22,28].

As condições de repetitividade são aquelas em que todos os fatores que podem alterar o resultado da medição são mantidos constantes ou controlados, isto é, mesmo procedimento de medição, mesmo analista, mesmas temperatura, pressão e umidade ambientes, mesmo laboratório, mesmos fornecedores e lotes de reagentes, e replicatas de medição realizadas em curto período de tempo.

Reprodutibilidade de medição ou reprodutibilidade (R): Precisão de medição sob um conjunto de condições de reprodutibilidade [22,28].

Nota: Os termos estatísticos pertinentes são apresentados na ISO 5725-1:1994 e na ISO 5725-2:1994. As condições de reprodutibilidade são aquelas em que todos os fatores que podem alterar o resultado da medição são variados na maior extensão possível que se pode ter na rotina. As replicatas

de medição são feitas em dias diferentes, em intervalo de tempo abrangente, em laboratórios, instrumentos e analistas diferentes, entre outros.

Resposta Instrumental (RI): É a indicação (valor indicado, leitura, resultado) do instrumento de medição quando uma amostra de ensaio ou uma solução de calibração é inserida no instrumento de medição, e.g.: absorvância, área de pico, *pH*, diferença de potencial elétrico etc.

Saída de um sistema analítico com uma reação a certo estímulo [47].

Resultado de medição: Conjunto de valores atribuídos a um mensurando, completado por todas as outras informações pertinentes disponíveis [22,28].

Nota 1: Um resultado de medição geralmente contém “informação pertinente” sobre o conjunto de valores, alguns dos quais podem ser mais representativos do mensurando do que outros. Isso pode ser expresso na forma de uma Função de Densidade de Probabilidade (FDP).

Nota 2: Um resultado de medição é geralmente expresso por um único valor medido e uma incerteza de medição. Caso a incerteza de medição seja considerada desprezível para alguma finalidade, o resultado de medição pode ser expresso como um único valor medido. Em muitas áreas, essa é a maneira mais comum de expressar um resultado de medição.

Nota 3: Na literatura tradicional e na edição brasileira anterior do VIM, o resultado de medição era definido como um valor atribuído a um mensurando obtido por medição, que poderia ser representado por uma indicação, ou um resultado não corrigido, ou um resultado corrigido, de acordo com o contexto.

Robustez: Susceptibilidade de um procedimento analítico a alterações das condições experimentais, as quais podem ser expressas como uma lista dos materiais da amostra, das substâncias a analisar, das condições de armazenamento, das condições ambientais e/ou de preparação da amostra em que o método pode ser aplicado tal como apresentado ou com pequenas alterações específicas. Relativamente a todas as condições experimentais que possam, na prática, estar sujeitas a variações (por exemplo, estabilidade dos reagentes, composição da amostra, *pH*, temperatura), devem ser indicadas quaisquer alterações susceptíveis de afetar os resultados analíticos.

Propriedade de um procedimento analítico que indica sua insensibilidade a mudanças de condições operacionais conhecidas sobre o resultado do procedimento e, portanto, sua adequação a seu propósito de uso [47].

Seletividade: Propriedade de um sistema de medição, utilizado com um procedimento de medição especificado, segundo a qual o sistema fornece valores medidos para um ou vários mensurandos, tal que os valores de cada mensurando sejam independentes uns dos outros, ou de outras grandezas associadas ao fenômeno, corpo ou substância em estudo [22,28].

Exemplo 1: Aptidão de um sistema de medição composto por um espectrômetro de massa para medir a razão entre correntes iônicas geradas por

dois compostos especificados, sem interferência de outras fontes especificadas de corrente elétrica.

Exemplo 2: Aptidão de um sistema de medição para medir a potência de uma componente de um sinal a uma determinada frequência sem sofrer interferências de componentes do sinal ou de outros sinais, em outras frequências.

Exemplo 3: Aptidão de um receptor para discriminar entre um sinal desejado e sinais não desejados, tendo geralmente frequências ligeiramente diferentes da frequência do sinal desejado.

Exemplo 4: Aptidão de um sistema de medição de radiação ionizante para responder a uma radiação particular a ser medida na presença de radiação concomitante.

Exemplo 5: Aptidão de um sistema de medição para medir a concentração em quantidade de substância de creatinina no plasma sanguíneo por um procedimento de Jaffé sem ser influenciado pelas concentrações de glicose, urato, cetona e proteína.

Exemplo 6: Aptidão de um espectrômetro de massa para medir a abundância em quantidade de substância do isótopo ^{28}Si e do isótopo ^{30}Si no silício proveniente de um depósito geológico sem influência mútua ou do isótopo ^{29}Si .

Nota 1: Em física, existe somente um mensurando; as outras grandezas do mesmo tipo do mensurando são grandezas de entrada para o sistema de medição.

Nota 2: Em química, as grandezas medidas envolvem frequentemente componentes diferentes do sistema submetido à medição e estas grandezas não são, necessariamente, do mesmo tipo.

Nota 3: Em química, a seletividade de um sistema de medição é obtida normalmente para grandezas associadas a componentes selecionadas em concentrações dentro de intervalos estabelecidos.

Nota 4: O conceito de seletividade em física (ver Nota 1) é próximo daquele da especificidade, como às vezes é utilizado em química.

É a extensão na qual um conjunto de n analitos podem ser medidos simultaneamente por (no mínimo) n sensores (canais detectores) sem interferência de outros componentes e, portanto, podem ser determinados independentemente e sem distúrbios [47].

É a extensão na qual um procedimento analítico pode determinar analito(s) particular(es) em uma mistura(s) ou matriz(es) sem a interferência de outros componentes de comportamento semelhante.

Nota 5: Seletividade é o termo recomendado em química analítica para expressar a extensão na qual um procedimento analítico particular pode determinar analito(s) na presença de outros componentes. A seletividade pode ser graduada. O uso do termo especificidade para o mesmo conceito é desencorajado, pois em geral isso leva a confusões.

Sensibilidade: Quociente entre a variação de uma indicação de um sistema de medição e a variação correspondente do valor da grandeza medida [22,28].

Nota 1: A sensibilidade pode depender do valor da grandeza medida.

Nota 2: A variação do valor da grandeza medida deve ser grande quando comparada à resolução.

Nota em [47]: Em medições analíticas é, de fato, a quociente diferencial do valor medido para o valor analítico.

Sistema Analítico: Conjunto de circunstâncias que contribuem para a qualidade do resultado analítico, incluindo equipamentos, reagentes, procedimentos, materiais de ensaio, pessoal, condições ambientais, medidas de garantia da qualidade (seção 18.6.1 do IUPAC Orange Book [45]).

Solução padrão de calibração ou solução de calibração ou padrão de calibração: Uma solução (ou outra diluição) do analito e, se usado, do padrão interno usada para a calibração do instrumento de medição analítica. Ela pode ser preparada a partir de um padrão de trabalho e pode ser matrizada.

Técnica analítica ou princípio de medição: Princípio físico ou químico e/ou instrumental usado na determinação de um analito. É o fenômeno que serve como base para uma medição.

Aplicação analítica genérica de um princípio científico [47].

Tendência (Bias): Estimativa de um erro sistemático [22,28].

É a diferença entre a esperança de um resultado de ensaio e um valor de referência aceito [47].

É a diferença entre uma média de um número suficiente de resultados de medição em condições de repetitividade e o valor verdadeiro convencional estabelecido por um padrão, material de referência ou MRC. A tendência é uma medida da veracidade, quanto maior a tendência menor é a veracidade do resultado da medição.

Validação: Verificação na qual os requisitos especificados são adequados para um uso pretendido [22,28].

Exemplo: Um procedimento de medição, normalmente utilizado para a medição da concentração da massa de nitrogênio em água, pode também ser validado para a medição no soro humano.

Confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para determinado uso pretendido são atendidos (ISO 17025 [23]).

Processo pelo qual é estabelecido, por estudo em laboratório, que as características de desempenho de um procedimento atendem aos requisitos para um uso pretendido [47].

Valor convencional: Valor atribuído a uma grandeza por um acordo, para um dado propósito [22,28].

Exemplo 1: Valor convencional da aceleração da gravidade, $g_n = 9,806 65 \text{ m.s}^{-2}$.

Exemplo 2: Valor convencional da constante de Josephson, $KJ-90 = 483 597,9 \text{ GHz.V}^{-1}$.

Exemplo 3: Valor convencional de um dado padrão de massa, $m = 100,00347 \text{ g}$.

Nota 1: O termo “valor verdadeiro convencional” é algumas vezes utilizado para esse conceito, porém seu uso é desaconselhado.

Nota 2: Um valor convencional é algumas vezes uma estimativa de um valor verdadeiro.

Nota 3: Geralmente considera-se que um valor convencional está associado a uma incerteza de medição convenientemente baixa, que pode ser nula.

Valor analítico: Magnitude de uma grandeza analítica (x) medida em uma amostra de ensaio, em um primeiro momento, e atribuída a uma amostra de referência usada para calibração, em um segundo momento [47].

Portanto, podemos interpretar essa definição dizendo que o valor analítico é o valor convencional definido no § 2.12 do VIM [22,28] e chamado de valor verdadeiro convencional nas edições anteriores do VIM. Por exemplo, o valor analítico pode ser o valor do teor de um analito em um MRC ou o valor da concentração de uma solução padrão de calibração.

Veracidade ou veracidade de medição: Grau de concordância entre a média de um número infinito de valores medidos repetidos e um valor de referência [22,28, 9].

Nota 1: A veracidade não é uma grandeza e, portanto, não pode ser expressa numericamente. Porém, a norma ISO 5725 apresenta medidas para o grau de concordância.

Nota 2: A veracidade está inversamente relacionada ao erro sistemático, porém não está relacionada ao erro aleatório.

Nota 3: Não se deve utilizar o termo exatidão de medição no lugar de “veracidade” e vice-versa [22,28]. A veracidade é geralmente expressa como um erro sistemático, ou uma correção, ou um viés. É estimada por meio de correções, ou fatores de correções oriundos de calibrações, recuperações, efeito de matriz, ou outros efeitos sistemáticos.

É o grau de concordância entre o valor médio obtido de uma grande série de resultados de ensaio e um valor de referência aceito [47,45].

Verificação: Provimento de evidência objetiva de que um dado item atende a requisitos especificados [22,28].

Exemplo 1: Confirmação de que um dado material de referência, como declarado, é homogêneo para o valor e para o procedimento de medição em questão, até uma porção, do material sob medição, com massa de 10 mg.

Exemplo 2: Confirmação de que as propriedades relativas ao desempenho ou aos requisitos legais são atendidas por um sistema de medição.

Exemplo 3: Confirmação de que uma incerteza alvo pode ser obtida.

Nota 1: Quando aplicável, recomenda-se que a incerteza de medição seja levada em consideração.

Nota 2: O item pode ser, por exemplo, um processo, um procedimento de medição, um material, um composto ou um sistema de medição.

Nota 3: Os requisitos especificados podem ser, por exemplo, as especificações de um fabricante.

Nota 4: Em metrologia legal e geralmente na avaliação da conformidade, a verificação, conforme definida no VIML, compreende o exame e a marcação e/ou a emissão de um certificado de verificação para um sistema de medição.

Nota 5: A verificação não deve ser confundida com calibração. Nem toda verificação é uma validação.

Verificação de Procedimento Analítico (VPA): Processo de verificação/avaliação de desempenho, documentado, aplicável ao procedimento (método) analítico normalizado ou oficial. Objetiva comprovar se o referido procedimento analítico opera adequadamente nas condições de rotina do laboratório, em conformidade com os critérios de aceitação estabelecidos neste Manual.

O método para a verificação do procedimento analítico constitui-se no mínimo da análise em replicatas e em condições de precisão intermediária de um MRC ou outro material de referência, para a estimação da veracidade (correção, fator de correção, recuperação) e da precisão de repetitividade e intermediária do procedimento analítico, isto é, a acurácia ou exatidão do procedimento.

A qualificação ou verificação de um procedimento analítico é uma validação simplificada.

ANEXO XI

Matrizes Representativas (Praguicida e Micotoxinas)

Tabela A.XI.1 – Seleção de matrizes representativas para validação de procedimentos de determinação de praguicidas

Grupos de Produtos	Propriedades Comuns	Classe de Produtos	Espécies Representativas
Produtos de Origem Vegetal			
I	Alto teor de água e clorofila	Hortaliças frondosas do gênero Brassica, hortaliças frondosas, leguminosas	Espinafre, alface brócolis, repolho, couve e vagem
II	Alto teor de água e ausência ou baixo teor de clorofila	Pomos; drupas, pequenas frutas e bagas, hortaliças de frutos, raízes e tubérculos	Maçã, pera, pêssego, cereja, morango, uva, tomate, pimentão, melão, batata, cenoura, cogumelo, salsa
III	Alta acidez	Frutas cítricas	Laranja, limão
IV	Alto teor de açúcares		Passas, tâmaras
V	Alto teor óleos/gorduras	Oleaginosas; castanhas	Abacate, semente de girassol, noz, pistache
VI	Ausência ou baixo teor de água	Cereais em grãos e seus produtos	Trigo, arroz, milho
	Produtos de alta especificidade		e.g.: Alho, lúpulo, chá, especiarias, oxicoco
Produtos de Origem Animal			
		Carnes	Carne bovina, carne de frango
		Visceras	Fígado, rim
		Gorduras da carne	
		Leite	Leite de vaca
		Ovos	Ovos de Galinha

Obs.: Produtos de alta especificidade não podem ser validados por intermédio do uso de espécies representativas.

Tabela A.XI.2 – Grupo de matrizes, por categoria, a serem utilizadas na validação de procedimento analíticos e no controle de qualidade para micotoxinas

Classe	Categoria	Matrizes consideradas similares pertencentes à mesma categoria
I	Amêndoas e amendoim	Amendoim, pasta de amendoim, farelo de amendoim, avelãs, castanha-do-brasil, pistache, nozes, amêndoas em geral e suas respectivas pastas ou manteigas e coco
II	Cereais	Arroz, milho, cevada centeio, trigo, farinha de milho, trigo, farinha de trigo
III	Ração e ingredientes de ração	Farelo de soja, farelo de trigo, farelo de milho, rações de frango, suíno, equino e bovina
IV	Frutas secas	Uva-passa, ameixa, damasco, tâmara, figo, banana, dentre outras
V	Leguminosas e oleaginosas	Feijão, lentilhas e leguminosas em geral
VI	Café verde	Café verde
	Café torrado e solúvel	Café torrado ou solúvel
VII	Leite	Leite fluído, leite em pó
VIII	Algodão	Caroço de algodão e farelo de algodão

Obs.: Na caracterização do grupo, foram levados em consideração os seguintes parâmetros: dureza, composição centesimal, interferentes analíticos (pigmentos e outros), processo de preparo de amostras.

ANEXO XII

Planejamento Fatorial para o Estudo de Robustez

Uma das mais eficientes estratégias para realizar o estudo de robustez é utilizar os chamados planejamentos fatoriais completos ou fracionários. Existem outros planejamentos, tais como o planejamento fatorial com ponto central, planejamento estrela, planejamento fatorial com face centrada e ponto central, planejamento Plackett-Burman, planejamento Doehlert etc. [4,10,19,29,40,41,42,43,44]. Os planejamentos fatoriais fracionários saturados são chamados de abordagem de Youden na Decisão 2002/657/EC [10].

O planejamento fatorial reduz o número de experimentos (ou ensaios ou amostras) ao mínimo necessário para detectar os efeitos principais e/ou os efeitos de interação dos fatores (tratamentos na linguagem da ANOVA), que podem influenciar significativamente no resultado da medição do procedimento analítico, afetando, assim, na qualidade metro-lógica e na confiabilidade do procedimento analítico.

Devido à sua eficiência, os planejamentos fatoriais permitem a redução do tempo e dos custos para a realização da validação de um procedimento analítico.

Planejamentos fatoriais são constituídos de combinações de condições experimentais, os fatores ou tratamentos, nas quais alguns ou todos os fatores estudados ocorrem conjuntamente com dois ou mais níveis de outro fator (definição adaptada de [14]).

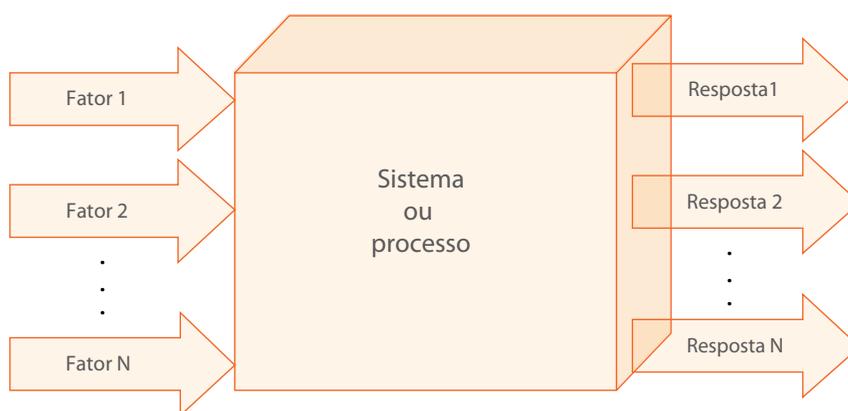
Os fatores ou tratamentos são as grandezas de entrada ou de influência que podem afetar as respostas, as variáveis de saída, do processo em estudo. Um processo pode apresentar mais de uma resposta (Figura A.XII.1).

Na validação de um procedimento analítico, o processo é o próprio procedimento analítico. A função resposta, ou simplesmente resposta, é a tendência (erro sistemático ou correção) do resultado analítico experimental, a concentração ou o teor do analito, em um MRC ou um padrão, ou uma matriz branca fortificada, ou um extrato de matriz branca fortificada, ou uma Amostra de Controle de Qualidade (ACQ). Preferencialmente a resposta é uma combinação da tendência e da precisão do ensaio, por exemplo, suas somas. Os fatores são as condições experimentais que, espera-se, possam alterar o resultado analítico.

Os fatores podem ser quantitativos ou qualitativos, contínuos ou discretos. Exemplos: temperatura 40°C ou 60°C; tempo de extração 50 min ou 55 min; solvente acetonitrila ou etanol; coluna cromatográfica A ou B; laboratório A ou B; matriz fígado ou músculo etc.

Os níveis dos fatores são os diferentes valores, dois ou mais, que eles podem assumir. O número de níveis, estudados para cada fator não precisa ser igual (planejamentos de níveis misturados). No entanto, os planejamentos mais usados experimentalmente são aqueles de mesmo número de níveis por cada fator.

Figura A.XII.1 – Representação de um sistema ou processo que, sob a ação de diversos fatores, responde de formas diferentes



Obs.: Os detalhes ou o mecanismo de funcionamento do sistema ou processo são desconhecidos (caixa preta). É possível apenas alterar os valores dos fatores e medir as respostas resultantes.

Planejamentos Fatoriais Completos

Se todas as combinações possíveis dos níveis de todos os fatores aparecem no planejamento então ele é chamado de “planejamento fatorial completo”.

Um planejamento fatorial completo de f (fatores) e p (níveis de cada fator) é designado planejamento p^f . O número total de experimentos (ou ensaios ou amostras) N_{exp} em um tal planejamento é: $N_{\text{exp}} = p^f$. Exemplos: Um fatorial completo com dois fatores ($f = 2$) e dois níveis por fator ($p = 2$) exigirá quatro experimentos (ou ensaios ou amostras): $N_{\text{exp}} = 2^2 = 4$. Um fatorial completo com dois fatores ($f = 2$) e três níveis por fator ($p = 3$) exigirá nove experimentos (ou ensaios ou amostras): $N_{\text{exp}} = 3^2 = 9$. Um fatorial completo com sete fatores ($f = 7$) e dois níveis por fator ($p = 2$) exigirá 128 experimentos (ou ensaios ou amostras): $N_{\text{exp}} = 2^7 = 128$.

Neste Anexo serão discutidos apenas os planejamentos fatoriais de dois níveis, que são os mais aplicados em estudos de robustez. Nesses pla-

nejamientos atribuem-se, ao nível mais alto de cada fator, os símbolos + ou +1, ou uma letra maiúscula que representa o fator. Ao nível mais baixo de cada fator, são designados os símbolos – ou –1, ou uma letra minúscula que representa o fator. Os fatores, por sua vez, são simbolizados por números ou letras em negritos.

Os planejamentos fatoriais completos podem ser representados por quadrados, cubos ou hipercubos no espaço dimensional dos fatores. A Figura A.XII.2 apresenta os planejamentos fatoriais completos 2^2 e 2^3 , e um planejamento fatorial fracionário 2^{3-1} .

A matriz quadrada $N_{\text{exp}i} \times N_{\text{exp}f}$ contendo as diversas combinações de níveis dos fatores para cada experimento (ou ensaio ou amostra) a realizar e as combinações dos sinais para o cálculo da resposta média global **M** e dos efeitos principais dos fatores e de suas interações, é chamada de “tabela de coeficientes de contraste”. A Tabela A.XII.1 e a Tabela A.XII.2 mostram os coeficientes de contraste para os planejamentos fatoriais completos 2^2 e 2^3 , respectivamente, dentro de retângulos tracejados.

A matriz $N_{\text{exp}i} \times f$ apresentada nas áreas sombreadas das tabelas deste Anexo é chamada de “matriz planejamento” [44]. Ela contém todas as combinações dos níveis dos fatores que serão utilizados em cada experimento planejado.

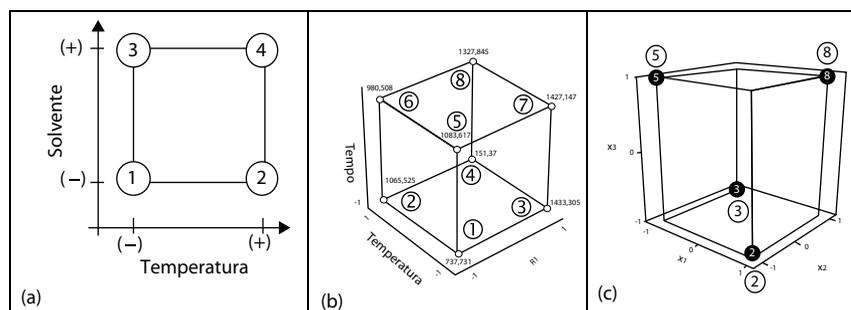
Para construir a tabela de coeficientes de contraste de um planejamento fatorial completo, deve-se proceder da seguinte forma:

1. Constrói-se primeiro uma coluna de coeficientes de contrastes da média global **M** contendo somente sinais positivos e com $N_{\text{exp}f}$ elementos ou linhas.
2. Do lado direito da coluna de **M**, coloca-se a coluna com os coeficientes de contrastes do fator **1**, constituída de uma alternância de sinal negativo e positivo, começando com o sinal negativo.
3. Do lado direito da coluna do fator **1**, coloca-se a coluna com os coeficientes de contrastes do fator **2**, constituída de uma alternância de dois sinais negativos e dois sinais positivos, começando com os sinais negativos.
4. Do lado direito da coluna do fator **2**, coloca-se a coluna com os coeficientes de contrastes do fator **3**, constituída de uma alternância de quatro sinais negativos e quatro sinais positivos, começando com os sinais negativos.
5. Adicionam-se as colunas dos coeficientes de contrastes dos fatores até o último fator a estudar, sempre dobrando em relação à coluna anterior o número de sinais negativos e positivos em sequência da alternância. Nesse ponto está terminada a cons-

trução de todas as combinações de experimentos (ou ensaios ou amostras) a se realizar no estudo de robustez (áreas sombreadas nas tabelas de coeficientes de contrastes mostradas neste Anexo).

- Para obter as colunas dos contrastes dos efeitos de interação basta multiplicar os coeficientes de contraste dos fatores que interagem entre si em cada linha de cada experimento (ou ensaio ou amostra). Assim, para calcular os coeficientes de contraste da coluna da interação **12**, multiplicam-se os elementos da coluna do fator **1** pelos elementos da coluna do fator **2**, linha após linha; para obter os coeficientes de contraste da coluna da interação **13**, multiplicam-se os elementos da coluna do fator **1** pelos elementos da coluna do fator **3**; para determinar os coeficientes de contraste da coluna da interação **123**, multiplicam-se os elementos da coluna do fator **1** pelos elementos da coluna do fator **2** e pelos elementos da coluna do fator **3**, linha após linha, e assim por diante até obter a última interação de todos os fatores que se deseja estudar.

Figura A.XII.2 – Representação gráfica em um sistema de coordenadas dos planejamentos fatoriais completos



Notas: (a) 2^2 , fatores: temperatura e solvente, nas circunferências os número dos experimentos.

(b) 2^3 , fatores: temperatura, razão de impregnação e tempo (Figura 7 em [41]).

(c) Planejamento fatorial fracionário 2^{3-1} para três fatores genéricos x_1 , x_2 e x_3 , somente os experimentos 2, 3, 5 e 8 do fatorial completo são realizados (Figura 1 em [40]).

Tabela A.XII.1 – Planilha para um planejamento fatorial completo 2^2 com duplicata dos experimentos

Exp./ Amostra	M	Fatores		Int.	Respostas		
		1	2	12	$R_{i,1}$	$R_{i,2}$	$R_{m,i}$
1	+	-	-	+	57 ⁽⁵⁾	61 ⁽³⁾	59
2	+	+	-	-	92 ⁽⁷⁾	88 ⁽⁸⁾	90
3	+	-	+	-	55 ⁽²⁾	53 ⁽⁶⁾	54
4	+	+	+	+	66 ⁽⁴⁾	70 ⁽¹⁾	68
Efeitos:	67,75	22,5	-13,5	-8,5			S_p : Sefeito
							2,55 1,803

Fonte: Adaptação da Tabela 3.1 em [4].

Notas: R_{ij} é a resposta da j -ésima replicata do i -ésimo experimento.

$R_{m,i}$ é a resposta média em cada experimento i replicado.

Var_{ij} é a variância das respostas replicadas em cada experimento i do planejamento fatorial.

Obs.: A tabela dos coeficientes de contraste é mostrada na matriz 4x4 circundada pela linha tracejada.

A matriz planejamento dos níveis alto e baixo para cada fator em cada experimento é mostrada na área sombreada.

Na Tabela A.XII.1, os fatores são a temperatura (1) nos níveis 40°C (-) e 60°C (+) e o solvente de extração (2) nos níveis acetonitrila (-) e etanol (+).

As respostas $R_{i,1}$ e $R_{i,2}$ são as recuperações percentuais do analito em cada experimento de extração. A resposta média global é $M = 67,75$.

O efeito principal da temperatura 22,5 é maior que o efeito principal do solvente -13,5.

O efeito de interação da temperatura e do solvente -8,5 é o menor dos efeitos. Teste F : a diferença entre as variâncias 8 e 2 não é significativa ($F_{\text{calc}} = 4$, $F_{\text{crit};\alpha;v_1;v_2} = F_{\text{crit};0,05;1;1} = 161,5$, $p\text{-valor} = 29,5\%$)

O desvio-padrão agrupado é 2,55 e o desvio-padrão do efeito é 1,80. A ordem sorteada de execução dos experimentos replicados está indicada pelos números entre parênteses e sobrescritos ao lado das respostas do experimento.

Tabela A.XII.2 – Planilha para um planejamento fatorial completo 2^3 com duplicata dos experimentos

Exp./ Amostra	Fatores								Interações				$R_{i,1}$	$R_{i,2}$	$R_{m,i}$	Var_{ij}
	M	1	2	3	12	13	23	123								
1	+	-	-	-	+	+	+	-	56 ⁽⁷⁾	52 ⁽¹²⁾	54,0	8				
2	+	+	-	-	-	-	+	+	85 ⁽⁹⁾	88 ⁽¹⁰⁾	86,5	4,5				
3	+	-	+	-	-	+	-	+	49 ⁽¹¹⁾	47 ⁽¹⁵⁾	48,0	2				
4	+	+	+	-	+	-	-	-	64 ⁽²⁾	62 ⁽¹⁾	63,0	2				
5	+	-	-		+	-	-	+	65 ⁽¹³⁾	61 ⁽⁵⁾	63,0	8				
6	+	+	-	+	-	+	-	-	92 ⁽⁶⁾	95 ⁽¹⁶⁾	93,5	4,5				
7	+	-	+	+	-	-	+	-	57 ⁽¹⁴⁾	60 ⁽³⁾	58,5	4,5				
8	+	+	+	+	+	+	+	+	70 ⁽⁸⁾	74 ⁽⁴⁾	72,0	8				
Efeitos:	67,31	22,88	-13,88	8,88	-8,63	-0,88	0,88	-0,13			S_p^2	2,28				
											S_{efeito}	1,14				

Fonte: Adaptação das tabelas 3.3 e 3.4 em [4].

Notas: R_{ij} é a resposta da j -ésima replicata do i -ésimo experimento.

$R_{m,i}$ é a resposta média em cada experimento i replicado.

Var_{ij} é a variância das respostas replicadas em cada experimento i do planejamento fatorial.

Obs.: A tabela dos coeficientes de contraste é mostrada na matriz 8x8 circundada pela linha tracejada.

A matriz planejamento dos níveis alto e baixo para cada fator em cada experimento é mostrada na área sombreada.

Na Tabela A.XII.2, os fatores são a temperatura (1) nos níveis 40°C (-) e 60°C (+); o solvente de extração (2) nos níveis acetoneitrila (-) e etanol (+); e o tempo de extração (3) nos níveis 100 min (-) e 120 min (+).

As respostas $R_{i,1}$ e $R_{i,2}$ são as recuperações percentuais do analito em cada experimento de extração. A resposta média global é $M = 67,31$.

O efeito principal da temperatura 22,8 é maior que o efeito principal do solvente -13,88, o qual, por sua vez, é maior que o efeito principal do tempo 8,88. O efeito de interação da temperatura e do solvente -8,63 é o maior dos efeitos de interação, sendo todos os demais efeitos de interação insignificantes (desprezíveis). O desvio-padrão agrupado é 2,28 e o desvio-padrão do efeito é 1,14.

A ordem sorteada de execução dos experimentos replicados está indicada pelos números entre parênteses e sobrescritos ao lado das respostas do experimento.

Fazendo-se um teste F de homogeneidade de variâncias [ver a eq. (1) e parágrafos seguintes ou eq. (A.II.2) e parágrafos seguintes], com graus de liberdade do numerador e do denominador iguais a 1 (duplicata menos 1), entre todos os pares de variâncias dos experimentos, concluímos que todos os pares têm variâncias iguais.

Exemplo: $F_{\text{calc}} = 8/2 = 4 < 161,4 = F_{\text{crit},0,05;1,1} = F_{\text{crit},\alpha,v_1,v_2}$ isto é, mesmo as duas variâncias mais diferentes não são estatisticamente diferentes entre si (logo, são iguais), no nível de confiança de 95%. Embora esse não seja um teste de hipótese múltiplo para testar a simultânea igualdade entre todas essas variâncias, ele dá uma forte evidência dessa igualdade múltipla.

Assim, pode-se assumir que o desvio-padrão do efeito $s_{\text{efeito}} = 1,61$ é uma medida da incerteza de todos os efeitos. Dessa forma, um Intervalo de Confiança (IC) ao redor do valor dos efeitos pode ser calculado usando o $t_{\text{crit},\alpha,v} = t_{\text{crit},0,05;2} = 2,776$ para 4 graus de liberdade ($v = N_{\text{exp}} - N_{\text{expf}} = 16 - 8 = 4$) e 95% de nível da confiança. Logo, o IC ao redor de cada efeito será de $\pm(2,776 \times 1,14 = 3,16)$.

Somente os IC dos efeitos de interação **13**, **23** e **123** contém o zero e são insignificantes, enquanto os três efeitos principais e o da interação **12** são significativamente diferentes de zero.

As tabelas dos coeficientes de contrastes para os planejamentos fatoriais completos 2^4 e 2^5 , que levam a 16 e 32 experimentos (ou ensaios ou amostras), respectivamente, são mostradas na Tabela A.XII.3 e na Tabela A.XII.4, respectivamente.

Os experimentos (ou ensaios ou amostras) para o estudo de robustez são realizados nas combinações de níveis dos fatores apresentadas nas

colunas dos fatores principais e indicadas nas áreas sombreadas nas tabelas de coeficientes de contrastes presentes neste Anexo.

Recomenda-se que cada um dos N_{expf} experimentos (ou ensaios ou amostras) de um planejamento fatorial sejam replicados J vezes, na medida em que isso não aumente exageradamente o número total de experimentos replicados: $N_{\text{exp}} = J \times N_{\text{expf}}$ (notar a diferença entre os índices dessa equação). A replicação dos experimentos (ou ensaios ou amostras) reduz a chance de que respostas de experimentos (ou ensaios ou amostras) espúrios ou duvidosos (*outliers*) conduzam à super ou à subestimação dos efeitos e interações.

A realização de todos os N_{exp} experimentos (ou ensaios ou amostras), incluindo as J replicações, deve ser feita em ordem aleatória e não segundo o seu número no planejamento. Na Tabela A.XII.1 e na Tabela A.XII.2, a ordem de realização dos experimentos (ou ensaios ou amostras) é indicada pelos números entre parênteses sobrescritos à direita de cada resposta.

Para se calcular a média global ou grande média \mathbf{M} usa-se a seguinte equação:

$$\mathbf{M} = \frac{\sum_{i=1}^{N_{\text{expf}}} R_{m,i}}{N_{\text{expf}}} \quad (\text{A.XII.1})$$

Exemplos: A média global do fatorial da Tabela A.XII.1 é:

$$\mathbf{M} = 67,75 = (59+90+54+68)/4.$$

A média global do fatorial da Tabela A.XII.2 é:

$$\mathbf{M} = 67,31 = (54,0+86,5+48,0+63,0+63,0+93,5+58,5+72,0)/8$$

Os efeitos principais dos fatores, também chamados de efeitos de primeira ordem, são designados pelos seus números ou símbolos em negrito: **1**, **2**, **3** etc., ou **p**, **V**, **T** etc.

Os efeitos de interação de dois, três ou mais fatores, também chamados de efeitos de segunda, terceira ordem etc., são designados pelas justaposições de seus números ou símbolos em negrito dos fatores que interagem: **12**, **13**, **123** etc., ou **pV**, **pT**, **pTV** etc.

Em geral, um efeito de interação dos fatores torna-se menor quanto maior a ordem desse efeito de interação.

O cálculo de qualquer efeito principal ou de interação se faz somando as respostas médias $R_{m,i}$ dos N_{expf} experimentos (ou ensaios ou amos-

tras), cada uma multiplicada pelo i -ésimo sinal + ou - que aparece na coluna do efeito na tabela dos coeficientes de contraste do planejamento fatorial (i^{\pm}), dividido por metade dos experimentos (ou ensaios ou amostras) do fatorial:

$$\text{Efeito} = \frac{\sum_{i=1}^n i^{\pm} R_{m,i}}{N_{\text{expf}}/2}, \quad i^{\pm} = -1 \text{ ou } +1 \quad (\text{A.XII.2})$$

Exemplos: O efeito principal do fator 1 (temperatura **T**), na Tabela.A.XII.1, é:

$$\text{Efeito 1} = \mathbf{T} = 22,5 = (-59+90-54+68)/2.$$

O efeito principal do fator 2 (solvente **S**), na Tabela.A.XII.1, é:

$$\text{Efeito 2} = \mathbf{S} = -13,5 = (-59-90+54+68)/2.$$

O efeito de interação dos fatores 1 e 2 (temperatura **T** e solvente **S**), na Tabela.A.XII.1, é:

$$\text{Efeito 12} = \mathbf{TS} = -8,5 = (59-90-54+68)/2.$$

O efeito de interação dos fatores 1, 2 e 3 (temperatura **T**, solvente **S** e o tempo **t**), na Tabela.A.XII.2, é:

$$\text{Efeito 123} = \mathbf{TS}t = -0,125 = (-54+86,5+48-63+63-93,5-58,5+72)/4 \approx 0,13.$$

Uma consequência da eq. (A.XII.2) é que todos os efeitos são obtidos da diferença entre duas metades das respostas do planejamento fatorial. Por isso, esses efeitos são também chamados de contrastes, na linguagem estatística.

Quando um ou mais experimentos (ou ensaios ou amostras) são replicados, pode-se calcular a variância de repetitividade $\text{var}_{r,i}$ associada da cada i -ésimo experimento (ou ensaio ou amostra) do planejamento fatorial replicado pela expressão:

$$s_{r,i}^2 = \text{var}_{r,i} = \frac{\sum_{j=1}^J (R_{i,j} - R_{m,i})^2}{J-1}, \quad j = 1, 2, 3, L, \dots, J \quad i = 1, 2, 3, L, \dots, N_{\text{expf}} \quad (\text{A.XII.3})$$

Para o caso particular de duplicatas, $J = 2$, a eq. (A.XII.3) se torna:

$$s_{r,i}^2 = \text{var}_{r,i} = \frac{(R_{i,1} - R_{i,2})^2}{2}, \quad i = 1, 2, 3, L, \dots, N_{\text{expf}} \quad (\text{A.XII.4})$$

Se considerarmos como válida a hipótese de que todas as variâncias $\text{var}_{r,i}$ de cada experimento (ou ensaio ou amostra) replicado são iguais entre si, a chamada hipótese de homoscedasticidade, que pode não ser verdadeira e pode ser testada estatisticamente com um teste F , então uma variância agrupada var_p pode ser obtida pela equação:

$$\text{var}_p = s_p^2 = \frac{\sum_{i=1}^{N_{\text{expf}}} (J-1) s_{r,i}^2}{\sum_{i=1}^{N_{\text{expf}}} (J-1)} = \frac{\sum_{i=1}^{N_{\text{expf}}} (J-1) s_{r,i}^2}{N_{\text{expf}} (J-1)} = \frac{\sum_{i=1}^{N_{\text{expf}}} s_{r,i}^2}{N_{\text{exp}} - N_{\text{expf}}} = \frac{\sum_{i=1}^{N_{\text{expf}}} \text{var}_{r,i}}{N_{\text{exp}} - N_{\text{expf}}} \quad (\text{A.XII.5})$$

O desvio-padrão agrupado, igual à raiz quadrada da variância agrupada, $s_p = (\text{var}_p)^{1/2}$, mede o desvio-padrão de uma única medição da resposta do experimento no caso de validade da hipótese de homoscedasticidade. Portanto, s_p é uma estimativa da incerteza de repetitividade de cada um dos experimentos (ou ensaio ou amostra) do planejamento fatorial.

No caso da validade da hipótese de homoscedasticidade citada anteriormente, e para o planejamento balanceado (mesmo número J de réplicas para todos os N_{expf} experimentos do planejamento fatorial), o desvio-padrão associado a todos os efeitos, isto é, a incerteza padrão dos efeitos é:

$$s_{\text{efeito}} = \sqrt{\frac{4s_p^2}{J \times N_{\text{expf}}}} = \sqrt{\frac{4}{N_{\text{exp}}}} s_p = \frac{s_p}{\sqrt{N_{\text{exp}}/4}} \quad (\text{A.XII.6})$$

Exemplo: Aplicando a eq. (A.XI.5) nos dados da última coluna da Tabela.A.XII.1 obtém-se a variância agrupada:

$$\text{var}_p = (8 + 8 + 8 + 2)/(8 - 4) = 26/4 = 6,5$$

Logo, o desvio-padrão agrupado é $s_p = 6,5^{1/2} = 2,5495$ e os experimentos foram duplicados, $J = 2$. Então, aplicando a eq. (A.XII.6): $s_{\text{efeito}} = 2,5495/2^{1/2} = 1,803$.

Se a incerteza combinada do ensaio já estiver sido calculada, conforme as metodologias apresentadas na seção 8 – *Incerteza de Medição Analítica*, da Parte II, ela (ou seu quadrado) deve ser preferencialmente usada no lugar de s_p ou de s_p^2 na eq. (A.XII.6). Na falta da incerteza combinada, prefere-se também usar o desvio-padrão da precisão intermediária s_R no lugar de s_p na eq. (A.XII.6).

Um teste t bilateral pode ser feito para um dado nível de confiança $1 - \alpha/2$ e grau de liberdade ν igual ao número total de experimentos replicados menos o número de experimentos do fatorial $\nu = N_{\text{exp}} - N_{\text{expf}}$ encontrando-se na tabela de pontos percentuais de t de Student, o t crítico, $t_{\nu, 1-\alpha/2}$.

O efeito somente é considerado significativo, isto é, diferente de zero, se seu módulo for maior que $t_{v,1-\alpha/2} \times s_{\text{efeito}}$. Em geral se usa $\alpha = 0,05$, ou seja 95% de nível de confiança. Existem outras formas de testar a significância de um dado efeito como usando ANOVA ou um gráfico de probabilidades normais [4,19,29,43,44].

Tabela A.XII.3 – Tabela dos coeficientes de contraste para um planejamento fatorial completo 2^4

Exp.	M	1	2	3	4	12	13	14	23	24	34	123	124	134	234	1.234
1	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
2	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
3	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-
4	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
5	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-
6	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+
7	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
8	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
9	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-
10	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+
11	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+
12	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-
13	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+
14	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
15	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Obs.: A matriz planejamento dos níveis alto e baixo para cada fator em cada experimento é mostrada na área sombreada.

Exemplo: Usando o fatorial 2^4 da Tabela A.XII.3, estuda-se a resolução de separação entre dois picos cromatográficos em função da variação em dois níveis dos fatores: 1= temperatura; 2 = percentagem do solvente A, na mistura de solventes; 3 = velocidade do fluxo do solvente; e 4 = tipo do solvente A, etanol (-) ou acetonitrila (+).

As respostas para os 16 experimentos 1 a 16, não replicados nessa ordem, são: 52, 61, 124, 113, 85, 66, 185, 192, 98, 86, 201, 194, 122, 139, 289, 286 (valores da Tabela 4.2 em [4]). Calculam-se os contrastes dos efeitos principais dos fatores 2 e 4, do efeito de interação desses dois fatores e do efeito de interação dos quatro fatores, usando a eq. (A.XII.2) e os sinais das colunas 2, 4, 24 e 1.234 da Tabela A.XII.3, respectivamente, a saber:

$$2 = \frac{-52 - 61 + 124 + 113 - 85 - 66 + 185 + 192 - 98 - 86 + 201 + 194 - 122 - 139 + 289 + 286}{16/2} = \frac{875}{8} = 109,375$$

$$4 = \frac{-52 - 61 - 124 - 113 - 85 - 66 - 185 - 192 + 98 + 86 + 201 + 194 + 122 + 139 + 289 + 286}{16/2} = \frac{537}{8} = 67,125$$

$$24 = \frac{+52 + 61 - 124 - 113 + 85 + 66 - 185 - 192 - 98 - 86 + 201 + 194 - 122 - 139 + 289 + 286}{16/2} = \frac{175}{8} = 21,875$$

$$2 = \frac{+52 - 61 - 124 + 113 - 85 + 66 + 185 - 192 - 98 + 86 + 201 - 194 + 122 - 139 - 289 + 286}{16/2} = \frac{-71}{8} = -8,875$$

Cálculos semelhantes levam a todos os valores dos demais contrastes:

1 = -2,38; 2 = 109,38; 3 = 54,38; 12 = -1,13; 13 = 2,88; 14 = 1,13; 23 = 25,63; 24 = 21,88; 34 = 9,88; 123 = 2,63; 124 = -2,63; 134 = 5,38; 234 = 0,13; 1.234 = -8,88.

Como não há replicação, não se pode calcular as variâncias var_{r_i} e nem o s_p .

Tabela A.XII.4 – Tabela dos coeficientes de contraste para um planejamento fatorial completo 2^5

Exp.	M	1	2	3	4	5	12	25	124	135	235	345	1.235	1.345	2.345	12.345
1	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
2	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
3	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+
4	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-
5	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
6	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
7	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-
8	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+
9	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+
10	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
11	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
12	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
13	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
14	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+
15	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+
16	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
17	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+
18	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-
19	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-
20	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+
21	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-
22	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
23	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+
24	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
25	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-
26	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
27	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+
28	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
29	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+
30	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-
31	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-
32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Exp.	M	1	2	3	4	5	12	25	124	135	235	345	1.235	1.345	2.345	12.345

Obs.: Para economizar espaço, são mostrados apenas os coeficientes de contrastes da média global, dos cinco fatores principais e de dez interações dos fatores.

A matriz planejamento dos níveis alto e baixo para cada fator em cada experimento é mostrada na área sombreada.

Fica como exercício a obtenção dos coeficientes de contraste das outras 16 interações: 13, 14, 15, 23, 24, 34, 35, 45, 123, 125, 134, 145, 234, 245, 1.234, 1.245, que estão faltando para completar a matriz 32×32 da tabela de coeficientes de contrastes desse planejamento.

Planejamentos Fatoriais Fracionários

Quando o número de parâmetros é superior a cinco, o total de experimentos de um planejamento fatorial completo se torna muito grande. Nesses casos pode-se reduzir o tempo e o custo de realização do estudo de robustez, diminuindo o número de experimentos a realizar, por meio do uso dos chamados planejamentos fatoriais fracionários.

Nos planejamentos fracionários, não é possível estimar todos os efeitos e as interações possíveis de maneiras completamente independentes. Efeitos principais se confundem com os de interação e estes se confundem com efeitos de interação de ordem superior.

Devido a esses confundimentos, os contrastes calculados por meio da tabela de coeficientes de contrastes não são os efeitos principais puros ou os efeitos de interação puros de uma dada ordem. Os contrastes são, na verdade, a soma de dois ou mais efeitos de ordens diferentes. Lembrando que, em geral, os efeitos de ordem superior são menores que os efeitos de ordem inferior. Esses contrastes estimam aproximadamente bem o efeito de ordem inferior. A literatura especializada usa novos símbolos para esses contrastes e não os símbolos dos números em negrito. Por motivo de simplificação, continuaremos a usá-los neste Manual.

Assim, em trabalhos com planejamentos fatoriais fracionários, procura-se, em geral, construir planejamentos fatoriais que, de preferência, só confundam os efeitos principais com os efeitos de interação de ordem três ou superiores do planejamento, isto é, não há confundimento entre efeito principal e efeito de interação de ordem dois.

Por causa desses inconvenientes, só utilizamos planejamentos fatoriais fracionários para fazer uma triagem entre os muitos fatores a estudar, de modo a evidenciar os fatores que apresentam maiores efeitos.

Após a triagem dos fatores que mais afetam o procedimento analítico com um planejamento fatorial fracionário, pode ser conveniente ou necessário fazer-se um estudo mais detalhado dos efeitos principais e de interações desses fatores mais importantes, agora em menor número, com um planejamento fatorial completo.

Um planejamento fatorial fracionário de fração meia para planejamentos com dois níveis e f fatores reduz o número de experimentos pela metade, relativamente ao planejamento completo. Tal planejamento de fração meia é denotado 2^{f-1} . Assim, um planejamento de fração meia para três fatores é denotado 2^{3-1} e tem quatro ($N_{\text{expf}} = 2^{3-1} = 2^2 = 4$) experimentos em vez dos oito experimentos do fatorial completo 2^3 . Analogamente, o fatorial de fração meia 2^{5-1} tem 16 ($N_{\text{expf}} = 2^{5-1} = 2^4 = 16$) experimentos, em vez dos 32 do fatorial completo 2^5 .

Um fatorial fracionário de fração um quarto ($\frac{1}{4}$) para planejamentos com dois níveis e f fatores reduz o número de experimentos para a quarta parte, relativamente ao planejamento completo. Tal planejamento de fração $\frac{1}{4}$ é denotado 2^{f-2} . Assim, um planejamento de fração $\frac{1}{4}$ para cinco fatores é denotado 2^{5-2} e tem oito ($N_{\text{expf}} = 2^{5-2} = 2^3 = 8$) experimentos em vez dos 32 do fatorial completo 2^5 . Um fatorial de fração $\frac{1}{4}$ para três fatores não pode existir, pois resultaria em um número de experimentos ($2^{3-2} = 2$) menor que o número de fatores a estudar.

Em planejamentos fatoriais fracionários 2^{f-k} , há uma resolução máxima que se pode alcançar igual a f , no máximo. O planejamento de resolução máxima tem a menor quantidade de confundimentos entre efeitos e também a maior eficiência para detectar efeitos principais dos f fatores estudados. Exemplo: Para o planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} podem-se construir planejamentos de resolução quatro ou três; no caso do planejamento fatorial fracionário 2^{8-3} podem-se construir planejamentos de resolução cinco, quatro ou três.

A notação para indicar a resolução de um planejamento fatorial fracionário é um índice em algarismos romanos. Exemplos: O planejamento 2_{IV}^{4-1} tem resolução quatro, enquanto o planejamento 2_{III}^{4-1} de resolução três estuda o mesmo número de fatores com o mesmo número de experimentos (ensaios), mas é menos eficiente que o planejamento 2_{IV}^{4-1} . O planejamento 2_{III}^{7-4} tem resolução três, a menor possível para um fatorial 2^{7-4} (esse é o planejamento que aparece na Tabela 11 da Decisão 2002/657/EC [10] (ver Tabela A.XII.7). Não mostraremos aqui como se obtém o valor da resolução de um planejamento fatorial fracionário (ver a bibliografia especializada [4, 29,43]).

Planejamentos fatoriais fracionários de resolução três confundem efeitos principais com os efeitos de interação de segunda ordem (e.g., 2_{III}^{5-2} ou 2_{III}^{7-4}). Os planejamentos fatoriais fracionários de resolução quatro não confundem mais seus efeitos principais com os efeitos de interação de segunda ordem, mas os confundem com os de terceira ordem (e.g., 2_{III}^{4-1} ou 2_{III}^{5-2} ou 2_{III}^{7-4}). Os planejamentos fatoriais fracionários de resolução cinco somente confundem efeitos principais com os efeitos de interação de quarta ordem (e.g., 2_V^{5-1} ou 2_V^{7-2} ou 2_V^{8-3}). Quanto mais alta a resolução mais pura fica a estimativa dos efeitos principais a partir dos contrastes de primeira ordem.

Em alguns casos, é possível construir diferentes planejamentos fatoriais fracionários com a mesma resolução, quando ela é menor que a resolução máxima. Esses diferentes planejamentos têm diferentes eficiências entre si. Exemplo: Três planejamentos 2_{III}^{4-1} diferentes podem ser construídos com a mesma resolução três.

O planejamento fatorial fracionário com o menor número de experimentos ainda maior que o de fatores é chamado de planejamento fatorial fracionário saturado. Exemplo: Para sete fatores o planejamento fatorial

fracionário saturado é 2^{7-4} , que é um planejamento de fração $1/16$, e resulta em oito (2^3) experimentos em vez dos 128 experimentos do planejamento completo 2^7 . Para cinco fatores o planejamento fatorial fracionário saturado é 2^{5-2} , que também tem oito experimentos. Para cinco fatores não existe o planejamento fracionário de fração $1/8$, que resultaria em menos experimentos ($2^{5-3} = 4$) que fatores.

A Tabela A.XII.5, a Tabela A.XII.6 e a Tabela A.XII.7 mostram os coeficientes de contraste para os planejamentos fatoriais fracionários 2_{IV}^{4-1} , 2_{III}^{5-2} e 2_{III}^{7-4} , respectivamente, todos de apenas oito experimentos (ensaios).

Para construir a tabela de coeficientes de contraste de um planejamento fatorial fracionário de fração meia para estudar f fatores, procede-se da seguinte forma:

1. Constrói-se primeiramente uma tabela de coeficientes de contrastes da média e dos efeitos principais de um planejamento fatorial completo, para um fator a menos do que se deseja. Assim, para obter o planejamento 2^{4-1} para quatro fatores, é necessário construir a tabela do planejamento completo 2^3 . Dessa forma, têm-se os coeficientes de contrastes para a média global e para os $f - 1$ fatores que se deseja estudar.
2. Justapõe-se à direita da tabela construída, no passo anterior, a coluna dos contrastes do f -ésimo fator obtido, multiplicando-se os elementos das colunas anteriores linha a linha.
3. Constrói-se cada uma das colunas das interações da mesma forma que para um planejamento fatorial completo, multiplicando os elementos das colunas dos fatores que interagem.

Tabela A.XII.5 – Planilha para um planejamento fatorial fracionário 2_{IV}^{4-1} sem replicação

Exp./ Amostra	Fatores					Interações						
	M	1	2	3	4	12	13	14	23	24	34	R
1	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	52
2	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	86
3	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	201
4	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	113
5	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	122
6	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	66
7	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	185
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	286
Contr.:	138,87	-2,25	114,75	51,75	69,75	8,75	24,75	26,75	26,75	24,75	8,75	

Fonte: Adaptação das tabelas 4.4 e 4.5 em [4].

Notas: Contr. = contrastes.

Relação geradora do fator 4: $4=123$.

Obs.: A matriz planejamento dos níveis alto e baixo para cada fator em cada experimento é mostrada na área sombreada.

Na Tabela A.XII.5, os fatores são a temperatura (1) nos níveis 40°C (-) e 60°C (+); o solvente de extração (2) nos níveis acetonitrila (-) e etanol (+); o tempo de extração (3) nos níveis 100 min (-) e 120 min (+); e a granulometria da amostra sob extração (4) nos níveis 150 Mesh (-) e 200 Mesh (+).

As respostas R são as recuperações percentuais do analito em cada experimento (ou ensaio ou amostra) de extração.

Os padrões de confundimento são: 1=234, 2=134, 3=124, 4=123, 12=34, 13=24, 14=23 e I=1234.

Tabela A.XII.6 – Planilha para um planejamento fatorial completo 2_{III}^{5-2} em replicação

Exp./		Fatores					Interações					
Amostra	M	1	2	3	4	5	12	13	14	15	23	R
1	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	52
2	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	92
3	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	198
4	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	113
5	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	122
6	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	76
7	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	189
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	286
Contr.:	141,0	1,5	111,0	54,5	67,0	4,5						

Fonte: Adaptação das tabelas 3.3 e 3.4 em [4].

Notas: Contr. = contrastes.

Relações geradoras: 4=123, 5=23.

Obs.: A matriz planejamento dos níveis alto e baixo para cada fator em cada experimento (ou ensaio) é mostrada na área sombreada.

Os fatores são a temperatura (1) nos níveis 40°C (-) e 60°C (+); o solvente de extração (2) nos níveis acetonitrila (-) e etanol (+); e o tempo de extração (3) nos níveis 100 min (-) e 120 min (+); a granulometria da amostra sob extração (4) nos níveis 150 Mesh (-) e 200 Mesh (+); e o volume de solvente de extração (5) nos níveis 150 ml (-) e 200 ml (+).

As respostas R são as recuperações percentuais do analito em cada experimento (ou ensaio ou amostra) de extração.

Os padrões de confundimento são: 2=35, 3=25, 5=23, 1=234, 2=134, 3=124, 4=123 e I=1234.

Para evitar erros, é sempre aconselhável usar uma planilha eletrônica para obter as tabelas dos coeficientes de contrastes dos planejamentos fatoriais desejados e para os cálculos de seus efeitos.

As tabelas A.XII.8, A.XII.9, A.XII.10, A.XII.11 e A.XII.12 apresentam os coeficientes de contrastes para os planejamentos fatoriais fracionários

não saturados 2_{VI}^{6-1} , 2_V^{7-2} , 2_V^{8-3} , 2_V^{9-4} , e 2_V^{10-5} . Todos esses planejamentos apresentam resolução máxima e não misturam os efeitos principais com os de interação de segunda e nem de terceira ordens. Assim, eles têm eficiências, suficientemente altas para os estudos de robustez e levam a 32 ($N_{\text{expf}} = 32$) experimentos não replicados. Essas tabelas foram construídas sob a hipótese de que os efeitos principais dos fatores diminuem do primeiro fator para o último. Se essa ordem de importância for verificada após o estudo de robustez, então esses planejamentos são os de maior eficiência para detectar os efeitos principais dos fatores, apesar dos confundimentos inerentes dos fatoriais fracionários. Por isso, no uso dessas tabelas, é sempre conveniente ordenar, com base nas expectativas e experiências anteriores, os fatores em ordem decrescente de importância esperada para atribuir-lhes os seus símbolos numéricos **1, 2, 3** etc., procurando fazer com que o fator 1 seja o mais importante e assim sucessivamente, após o estudo de robustez.

As planilhas eletrônicas para planejamentos fatoriais fracionários das tabelas A.XII.7, A.XII.8, A.XII.9, A.XII.10, A.XII.11 e A.XII.12, assim como outros fatoriais fracionários, envolvendo no máximo 32 ($N_{\text{expf}} \leq 32$) experimentos não replicados, podem ser encontradas, juntamente com este Manual de Garantia da Qualidade Analítica, no sítio do Mapa: <www.agricultura.gov.br>. Dessa forma o usuário deste Manual poderá sempre encontrar um planejamento fatorial mais conveniente aos seus interesses e objetivos.

As planilhas eletrônicas para planejamentos fatoriais completos até sete fatores e planejamentos fatoriais fracionários até seis fatores (2^{3-1} , 2^{4-1} , 2^{5-1} , 2^{5-2} , 2^{6-1} , 2^{6-2} , 2^{6-3}) são apresentadas na referência [40] e estão disponíveis no sítio: <<http://lqta.iqm.unicamp.br/>>.

O conjunto das 12 tabelas de coeficientes de contrastes apresentadas no Anexo XII disponibiliza ao usuário deste Manual de Garantia da Qualidade Analítica uma gama de possíveis escolhas de planejamentos para realizar seu estudo de robustez particular. Os vários exemplos numéricos incluídos permitem um autotreinamento do pessoal técnico, refazendo os cálculos apresentados.

Aconselhamos que, para um número mais baixo de fatores, o usuário faça mais replicações de modo a, se possível, realizar 32 ou no máximo 48 experimentos no total. Por exemplo, para os planejamentos fatoriais 2^3 ou 2^{4-1} ou 2^{5-2} ou 2^{7-4} poder-se-ia realizar quatro, cinco ou seis replicações por experimento; para os planejamentos fatoriais 2^4 ou 2^{5-1} ou 2^{6-2} , a realização de duas replicações por experimento já levaria aos 32 experimentos e de triplicatas a 64 experimentos.

Os números de replicações para cada experimento de um planejamento fatorial não precisam ser todos iguais (planejamento não balance-

ado). Pode-se, inclusive, não replicar alguns experimentos. Sempre que possível procure replicar no mínimo dois experimentos, replicando um experimento entre aqueles que contiverem o maior número de sinais negativos (níveis baixo) e outro entre aqueles de maior número de sinais positivos (níveis altos) na matriz de planejamento.

Para facilitar a realização dos experimentos na bancada, é aconselhável construir um formulário de registro dos experimentos, contendo a matriz de planejamento com os valores dos níveis de cada fator no lugar dos sinais + ou -. É possível também substituir os números em negrito, símbolos dos fatores, por sua identificação textual. Esse formulário conterá também os campos para anotar os valores das respostas replicadas, avaliadas em cada experimento. Um exemplo de formulário de registros é apresentado na Tabela A.XII.13, para o planejamento 2³ apresentado na Tabela A.XII.2, com a adição de mais replicações de alguns dos experimentos de forma não balanceada.

Critérios de Aceitação, Análise dos Resultados dos Planejamentos Fatoriais

De posse dos valores dos efeitos e ou contrastes do planejamento fatorial realizado, é necessário verificar se o valor de algum efeito/contraste principal ou de interação de segunda ordem, demonstrado como significativo, é maior que três vezes o desvio-padrão da precisão intermediária (reprodutibilidade interna) s_R do procedimento analítico (Atenção: essa comparação é com s_R e não com CV_R).

Se todos os efeitos/contrastos principais ou de segunda ordem são menores que $3 \times s_R$, então o procedimento analítico poderá ser classificado como “procedimento analítico robusto e adequado para as análises de rotina”, na faixa de variação estudada dos fatores de influência. Especificar essas faixas por fator.

Se um ou mais desses efeitos/contrastos de segunda ordem é maior que $3 \times s_R$, o procedimento analítico deverá ser classificado como “procedimento analítico de uso restrito”, na faixa de variação estudada dos fatores de influência. Especificar essas faixas por fator. Nesse caso pode-se também refazer o estudo de robustez para aqueles fatores que foram significativos e uma faixa de variação (nível alto menos nível baixo) mais curta, verificando a adequação nessa nova faixa.

Se um ou mais desses efeitos/contrastos principais é maior que $3 \times s_R$, o procedimento analítico deverá ser classificado como “procedimento analítico não robusto e inadequado para as análises de rotina”, na faixa de variação estudada dos fatores de influência.

Tabela A.XII.7 – Tabela dos coeficientes de contraste para um planejamento fatorial fracionário saturado 2_{III}^{7-4} com triplicata dos ensaios

Exp./ Amostr.	Fatores								Respostas				
	M	1	2	3	4	5	6	7	$R_{i,1}$	$R_{i,2}$	$R_{i,3}$	$R_{m,j}$	$Var_{r,i}$
1	+	-	-	-	-	+	+	+	54 ⁽⁷⁾	58 ⁽¹²⁾	56 ⁽¹⁹⁾	56	4
2	+	+	-	-	+	+	-	-	65 ⁽⁹⁾	66 ⁽²¹⁾	67 ⁽¹⁰⁾	66	1
3	+	-	+	-	+	-	+	-	51 ⁽¹⁷⁾	45 ⁽¹¹⁾	57 ⁽¹⁵⁾	51	36
4	+	+	+	-	-	-	-	+	50 ⁽²⁾	52 ⁽²³⁾	54 ⁽¹⁾	52	4
5	+	-	-	+	+	-	-	+	50 ⁽¹³⁾	58 ⁽⁵⁾	54 ⁽²⁴⁾	54	16
6	+	+	-	+	-	-	+	-	67 ⁽⁶⁾	70 ⁽²⁰⁾	73 ⁽¹⁶⁾	70	9
7	+	-	+	+	-	+	-	-	42 ⁽²²⁾	39 ⁽¹⁴⁾	45 ⁽³⁾	42	9
8	+	+	+	+	+	+	+	+	60 ⁽⁸⁾	64 ⁽¹⁸⁾	68 ⁽⁴⁾	64	16
Contr.:	56,88	12,25	-9,25	1,25	-0,75	6,75	0,25	3,75				S_p : 3,45	
												S_{efeito} : 1,41	

Fonte: Adaptação das tabelas 4.10 e 4.11 em [4].

Nota: Contr. = contrastes.

Relações geradoras: 4=123, 5=23, 6=13, 7=12.

Obs.: Esse é o planejamento fatorial que aparece na Tabela 11 da Decisão 2002/657/EC [10], usando letras maiúsculas e minúsculas no lugar dos sinais e em ordem transposta à dessa tabela. As correspondências dos símbolos dos fatores entre essas duas tabelas são: **1=C, 2=B, 3=A, 4=G, 5=D, 6=E, 7=F.**

Como a Tabela A.XII.7 apresenta um planejamento saturado, os contrastes dos efeitos principais já se confundem com os contrastes de efeitos de interação de segunda ordem e com os contrastes de interações de ordem superiores: **1=27=36=45=234, 2=17=35=46=134, 3=15=25=47=124, 4=12=34=56=123, 5=13=24=57, 6=14=23=67, 7=15=26=37,**

Se considerarmos as variâncias dos oito experimentos iguais entre si (hipótese de homoscedasticidade), então o intervalo de confiança para 95% de nível de confiança e grau de liberdade $v = N_{exp} - N_{expf} = 24 - 8 = 16$ e t crítico $t_{crit,\alpha,v} = t_{crit,0,025;16} = 2,120$ será: $IC = t_{crit,\alpha,v} \times s_{efeito} = 2,12 \times 1,41 = 2,99$.

Assim, concluímos que somente os contrastes relacionados aos efeitos principais 1, 2, 5 e 7 são significativamente diferentes de zero. No entanto, essa conclusão deve ser encarada com cautela, pois um teste F [vide eq. (1) e parágrafos seguintes ou a eq. (A.II.2) e parágrafos seguintes] entre os pares das variâncias dos experimentos, com graus de liberdade dois (triplicata menos 1) para o numerador e denominador, tem um F crítico igual a $F_{crit,\alpha,v1,v2} = F_{crit,0,05;2;2} = 19,00$, porém, o F_{calc} para os experimentos três e dois, $F_{calc,\alpha,v1,v2} = 36/1 = 36$, é maior que 19, implicando em diferença significativa dessas duas variâncias, logo na heterocedasticidade dessas duas variâncias.

Não calculamos aqui os contrastes associados aos efeitos de interação de segunda ordem. Em um estudo de robustez pode valer a pena, também, calculá-los e estudar suas significâncias. Lembramos que os contrastes em um planejamento fatorial fracionário não medem os efeitos puros devido aos confundimentos. Nesse exemplo, seria conveniente fazer um estudo com um planejamento completo 2^4 dos fatores 1, 2, 5 e 7.

Tabela A.XII.8 – Tabela dos coeficientes de contraste para um planejamento fatorial fracionário 2^{6-1}_{VI}

Exp.	M	1	2	3	4	5	6	12	13	14	15	16	23	24	25	26
1	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
3	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+
4	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-
6	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
7	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
8	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+
9	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
10	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+
11	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-
12	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
13	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+
14	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-
15	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+
16	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-
17	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
18	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+
19	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-
20	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
21	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
22	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-
23	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+
24	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-
25	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+
26	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-
27	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+
28	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
29	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
30	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
31	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Exp.	M	1	2	3	4	5	6	12	13	14	15	16	23	24	25	26

Nota: Relações geradoras: **6=12345**.

Obs.: Para economizar espaço, apenas os coeficientes de contrastes da média global, dos seis fatores principais e de nove interações de fatores são mostrados.

A matriz planejamento dos níveis alto e baixo para cada fator em cada experimento (ou ensaio ou amostra) é mostrada na área sombreada.

Tabela A.XII.9 – Tabela dos coeficientes de contraste para um planejamento fatorial fracionário 2^{7-2}_V

Exp.	M	1	2	3	4	5	6	7	12	13	14	15	16	17	23	24
1	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
2	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
3	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
4	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
5	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+
6	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
7	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-
8	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
9	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-
10	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
11	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+
12	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+
13	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
14	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-
15	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+
16	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+
17	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+
18	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
19	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
20	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
21	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+
22	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
23	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-
24	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-
25	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-
26	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
27	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+
28	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+
29	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
30	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
31	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+
32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Exp.	M	1	2	3	4	5	6	7	12	13	14	15	16	17	23	24

Nota: Relações geradoras: **6=12345, 7=2345.**

Obs.: Para economizar espaço, apenas os coeficientes de contrastes da média global, dos sete fatores principais e de oito interações de fatores são mostrados.

A matriz planejamento dos níveis alto e baixo para cada fator em cada experimento (ou ensaio ou amostra) é mostrada na área sombreada.

Tabela A.XII.10 – Tabela dos coeficientes de contraste para um planejamento fatorial fracionário 2_{V}^{8-3}

Exp.	M	1	2	3	4	5	6	7	8	12	13	14	15	16	17	18
1	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
2	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
3	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-
4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
5	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
6	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
7	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
8	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
9	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
10	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
11	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+
12	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
13	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-
14	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-
15	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-
16	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
17	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+
18	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
19	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+
20	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
21	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-
22	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-
23	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
24	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
25	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-
26	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
27	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
28	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
29	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
30	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+
31	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Exp.	M	1	2	3	4	5	6	7	8	12	13	14	15	16	17	18

Nota: Relações geradoras: **6=12345**, **7=2345**, **8=1345**.

Obs.: Para economizar espaço, apenas os coeficientes de contrastes da média global, dos oito fatores principais e de sete interações de fatores são mostrados.

A matriz planejamento dos níveis alto e baixo para cada fator em cada experimento (ou ensaio ou amostra) é mostrada na área sombreada.

Tabela A.XII.11 – Tabela dos coeficientes de contraste para um planejamento fatorial fracionário 2_{V}^{9-4}

Exp.	M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	12	13	14	15	16	17
1	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
2	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
3	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+
4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
5	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+
6	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
7	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
8	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
9	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+
10	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
11	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-
12	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
13	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-
14	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+
15	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+
16	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
17	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+
18	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
19	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-
20	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+
21	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-
22	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+
23	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+
24	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
25	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-
26	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
27	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+
28	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
29	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+
30	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-
31	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Exp.	M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	12	13	14	15	16	17

Nota: Relações geradoras: **6=12345**, **7=2345**, **8=1345**, **9=1245**.

Obs.: Para economizar espaço, apenas os coeficientes de contrastes da média global, dos nove fatores principais e de seis interações de fatores são mostrados.

A matriz planejamento dos níveis alto e baixo para cada fator em cada experimento (ou ensaio ou amostra) é mostrada na área sombreada.

Tabela A.XII.12: Tabela dos coeficientes de contraste para um planejamento fatorial fracionário 2_{V}^{10-5}

Exp.	M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	13	14	15	16
1	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
3	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-
4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
5	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
6	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
7	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+
8	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
9	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-
10	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
11	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+
12	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
13	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+
14	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
15	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
16	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
17	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
18	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
19	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+
20	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+
21	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+
22	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+
23	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-
24	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
25	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
26	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
27	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
28	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-
29	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-
30	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-
31	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Exp.	M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	13	14	15	16

Nota: Relações geradoras: **6=12345**, **7=2345**, **8=1345**, **9=1245**, **10=1235**.

Obs.: Para economizar espaço, apenas os coeficientes de contrastes da média global, dos dez fatores principais e de cinco interações de fatores são mostrados.

A matriz planejamento dos níveis alto e baixo para cada fator em cada experimento (ou ensaio ou amostra) é mostrada na área sombreada.

Tabela A.XII.13

Lanagro-MG/CGAL/SDE/Mapa
Formulário de Registro de Estudo de Robustez com
Planejamento Fatorial Laboratório WelMAG
Procedimento em Validação: POP-LWM-019 - Análise de Resíduos de
Medicamentos em Carne Bovina por HPLC

Resp. da Validação: _____

Data Início: 19ago10

Técnico da Validação: _____

Data Fim: 11set10

Exp./ Ensaio/ Amostra	Fatores			Respostas replicadas					
	1 Temperatura	2 Solv Extr	3 Tempo Extr	$R_{i,1}$	$R_{i,2}$	$R_{i,3}$	$R_{i,4}$	$R_{i,5}$	$R_{i,6}$
1	40	MeCN	100	56 ⁽⁷⁾	54 ⁽²⁶⁾	55 ⁽²³⁾	53 ⁽¹⁹⁾	54 ⁽²¹⁾	52 ⁽¹²⁾
2	60	MeCN	100	85 ⁽⁹⁾	88 ⁽¹⁰⁾				
3	40	EtOH	100	49 ⁽¹¹⁾	47 ⁽¹⁵⁾	48 ⁽²⁷⁾			
4	60	EtOH	100	64 ⁽²⁾	63 ⁽¹⁸⁾	63 ⁽²⁵⁾	62 ⁽¹⁾		
5	40	MeCN	120	65 ⁽¹³⁾	63 ⁽²²⁾	61 ⁽⁵⁾			
6	60	MeCN	120	92 ⁽⁶⁾	95 ⁽¹⁶⁾				
7	40	EtOH	120	57 ⁽¹⁴⁾	60 ⁽³⁾				
8	60	EtOH	120	70 ⁽⁸⁾	71 ⁽¹⁷⁾	72 ⁽²⁸⁾	73 ⁽²⁰⁾	72 ⁽²⁴⁾	74 ⁽⁴⁾

Obs.: Os fatores são a temperatura de extração (1) nos níveis 40°C (-) e 60°C (+); o solvente de extração (2) nos níveis MeCN = acetonitrila (-) e EtOH= etanol (+); e o tempo de extração (3) nos níveis 100 min (-) e 120 min (+).

As respostas $R_{i,1}$ e $R_{i,6}$ são as recuperações percentuais do analito em cada experimento de extração. Planejamento não balanceado dos $N_{\text{exp}} = 8$ ensaios do planejamento fatorial com $N_{\text{exp}} = 28$ ensaios no total.

Verifica-se que com esses novos resultados as médias $R_{m,i}$ dos experimentos 1 a 8 são as mesmas que aparecem na Tabela AXII.2. Logo os valores dos efeitos principais e de interação também são os mesmos. As variâncias $\text{var}_{\tau,i}$ para os experimentos 1 a 8, são agora: 2; 4,5; 1; 0,67; 4; 4,5; 4,5 e 2.

Um novo teste F entre as duas variâncias mais diferentes entre si (4,5 e 0,67) resulta em: $F_{\text{calc}} = 4,5/0,67 = 6,7 < 10,1 = F_{\text{crit},0,05;1,3} = F_{\text{crit},\alpha,v_1,v_2}$ isto é, essas duas variâncias ainda são estatisticamente iguais no nível de confiança de 95%.

O novo valor do desvio-padrão agrupado é $s_p = [(5 \times 2 + 1 \times 4,5 + 2 \times 1 + 3 \times 0,67 + 2 \times 4 + 1 \times 4,5 + 1 \times 4,5 + 5 \times 2) / (5 + 1 + 2 + 3 + 2 + 1 + 1 + 5)]^{1/2} = [45,51 / 20]^{1/2} = 1,51$. E o novo desvio-padrão dos efeitos é $s_{\text{efeito}} = 0,57$. O $t_{\text{crit},\alpha,\nu}$ crítico para 20 graus de liberdade ($\nu = N_{\text{exp}} - N_{\text{expf}} = 28 - 8 = 20$) é: $t_{\text{crit},\alpha,\nu} = t_{\text{crit},0,05;20} = 2,09$. O IC ao redor de cada efeito será de $\pm(2,09 \times 0,57 = 1,19)$.

Logo, como antes, os efeitos de interação **13**, **23** e **123** são insignificantes, enquanto os três efeitos principais e o da interação **12** são significativamente diferentes de zero.

ANEXO XIII

Referências Normativas e Bibliográficas

1. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Food and Agriculture Organization (FAO). Cooperation on International Traceability in Analytical Chemistry (CITAC). *Consultation Held in Miskolc*. Hungary, 1999.
2. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). *AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals*. 19 dez. 2002.
3. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). *Guia para o controle da qualidade para a análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos para os laboratórios integrantes do Para*. Brasília, jul. 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/reblas/para/CONTROLE_QUALIDADE.pdf>.
4. BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. *Como fazer experimentos*. 3. ed. Campinas, SP: Editora Unicamp, 2007. ISBN 978-85-268-0753-2.
5. BEDSON, P.; SARGENT, M. The development and application of guidance on equipment qualification of analytical instruments. *Accred. Qual. Assur*, v. 1, p. 265-274, 1996.
6. BEDSON, P. *Guidance on equipment qualification of analytical instruments: high performance liquid chromatography (HPLC)*. LGC/VAM/1998/026.2, VAM – Valid Analytical Measurement, LGC (Teddington) Limited. Jun. 1998.
7. COMMISSION D'ÉTABLISSEMENT DES METHODS D'ANALYSES DU COMISSARIAT À L'ÉNERGIE ATOMIQUE (CETAMA). *Statistique appliquée a l'exploitation des mesures*. Deuxième ed. Masson, Paris, 1986.
8. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. *Guidelines on good laboratory practice in residue analysis*. CAC/GL40-1993, Rev.1-2003, Joint Fao/Who Food Standards Programme. Thirty-second Session. Rome, Italy, 29 Jun. 4 July 2009. Report of the Thirtieth Session of the, Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling, Balatonalmádi, Hungary, 9-13 Mar. 2009. Draft Guidelines at Step 8: 1. Draft Guidelines for Settling Disputes on Analytical (Test) Results (para. 25, Appendix II); 2. draft guidelines on analytical terminology (para. 43, Appendix III).
9. CODEXALIMENTARIUSCOMMISSION. *Guidelines on analytical terminology*. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.do?lang=en>. Acesso em: 19 dez. 2010. CAC/GL 72-2009.

10. EUROPEAN COMMISSION (EC). Commission Decision 2002/657/CE of 12 august 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*, 2002, L 221 /8.
11. EUROPEAN COMMISSION (EC). Directorate general for health and consumer affair – DG SANCO. SANCO 10684 (01/01/2010). *Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food And Feed*. Substitui a SANCO 3131/2007.
12. EUROPEAN COMMISSION (EC). Commission Regulation. EC n. 333/2007 of 28 March 2007 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of lead, cadmium, mercury, inorganic tin, 3-MCPD and benzo(a) pyrene in foodstuffs.
13. EUROPEAN COMMISSION (EC). Regulamento CE n. 882/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de abril de 2004. Relativo aos controlos oficiais realizados para assegurar a verificação do cumprimento da legislação relativa aos alimentos para animais e aos gêneros alimentícios e das normas relativas à saúde e ao bem-estar dos animais. *Jornal Oficial da União Europeia*, p.1-141, 30 abr. 2004. L 165.
14. ELLISON, S. L. R.; BARWICK, V. J.; FARRANT, T. J. D. *Practical statistics for the analytical scientist – a bench guide*. Cambridge: RSC Publishing, 2009. ISBN 978-0-85404-131-2.
15. EURACHEM. *EURACHEM Guide: the fitness for purpose of analytical methods a laboratory guide to method validation and related topics*. First Internet Version Dec. 1998. Disponível em: <www.eurachem.org>. ISBN: 0-948926-12-0.
16. EURACHEM/CITAC. *Guide: quantifying uncertainty in analytical measurement*. 2 ed. 2000. Disponível em: <www.eurachem.org>; <www.measurementuncertainty.org/>. ISBN 0 948926 15 5.
17. EURACHEM/CITAC. *Guide: measurement uncertainty arising from sampling a guide to methods and approaches*. Produced jointly with EUROLAB, Nordtest and the UK RSC Analytical Methods Committee. 2007.
18. EURACHEM/CITAC. *Guide: use of uncertainty information in compliance assessment*. ELLISON, S. L. R. (LGC, UK); WILLIAMS, A. (UK) (Ed.). 2007.
19. HINES, W. W. et al. *Probabilidade e estatística na engenharia*. 4. ed. Livros Técnicos e Científicos (LTC). Rio de Janeiro, 2006. Tradução de: John Willey & Sons. *Probability and Statistics in Engineering*. 4th ed. 2003. ISBN 85-216-14748.

20. HUBER, L. *Validation and qualification in analytical laboratories*. Boca Raton, USA: Interpharm/CRC Press, 1998. ISBN 1-57491-080-9.
21. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). *Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos*. Rio de Janeiro, fev. 2010. 20p. DOQ-CGCRE-008 Ver 03.
22. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). *Vocabulário internacional de metrologia: conceitos fundamentais e gerais e termos associados* (VIM 2008). Rio de Janeiro, 2009. [VIM 2009]. Portaria Inmetro nº 319, de 23 de outubro de 2009. Tradução autorizada pelo BIPM da 3. ed. internacional do VIM – International Vocabulary of Metrology. Basic and general concepts and associated terms. JCGM 200:2008.
23. INTERNACIONAL STANDARDS ORGANIZATION (ISO). *General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*. Geneva, 2005. 28 p. ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 Versão Corrigida 2:2006. Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Disponível em: <www.abnt.org.br>. ISO/IEC 17025.
24. INTERNACIONAL STANDARDS ORGANIZATION (ISO). *Capability of detection – part 1: terms and definitions*. Geneva, 1997. 10 p. ISO 11843-1.
25. INTERNACIONAL STANDARDS ORGANIZATION (ISO). *Capability of detection – part 2: methodology in the linear calibration Case*. Geneva, 2000. 24 p. ISO 11843-2.
26. INTERNACIONAL STANDARDS ORGANIZATION (ISO). *Accuracy (trueness and precision) of method measurements and results – part 2: basic method for the determination of the repeatability and reproducibility of a standard measurement method*. Geneva, 1994. 42 p. ISO 5725-2.
27. INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC) (IUPAC). International Organization for Standardization (ISO). Association of Official Analytical Chemists (AOAC International). Eurachem. *Technical Report Harmonised Guidelines for the Use of Recovery Information in Analytical Measurement*. Prepared by THOMPSON, Michael et al. 1998.
28. JOINT COMMITTEE FOR GUIDES IN METROLOGY (JCGM). *Working Group 2. International Vocabulary of Metrology – Basic and General Concepts and Associated Terms* (VIM). *Vocabulaire International de Métrologie – Concepts Fondamentaux et Généraux et Termes Associés* (VIM). BIPM, 2008.

29. MASSART, D. L. et al. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics – Part A*. Amsterdam: Elsevier, 1997. ISBN 0-444-89724-0 Set ISBN 0-444-82854-0.
30. MILLER, J. N.; MILLER, J. C. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 5th ed. Harlow, England: Pearson Prentice Hall, 2005. 268 p. ISBN-10: 0-13-129192-0, ISBN-13: 978-0131291928.
31. MONTGOMERY, D. C.; PECK, E. A.; GEOFFREY, V. C. *Introduction to Linear Regression Analysis*. 4th ed. John Wiley & Sons, 2006. ISBN 0-471-75495-1.
32. PETER C. M.; RICHARD, E. Z. *Statistical Methods in Analytical Chemistry*. 2nd ed. New York: Wiley Intersciences Publications, John Wiley & Sons, 2000, p. 424. ISBN 0-471-29363-6.
33. PRICHARD, E.; BARWICK, V. *Quality Assurance in Analytical Chemistry. Analytical Techniques in the sciences*. John Wiley & Sons, 2007. ISBN 978-0-470-01204-8.
34. SOUZA, S. V. C. de. *Procedimento para Validação Intralaboratorial de Métodos de Ensaio: delineamento e aplicabilidade em análise de alimentos*. 2007. Tese (Doutorado) – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, 2007. E-mail: <scheillavitorino@terra.com.br>.
35. THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis. *Pure & Appl. Chem.*, 2002.
36. THOMPSON, M; WOOD, R. Harmonized Guidelines for Internal Quality Control in Analytical Chemistry Laboratories. *Pure & Appl. Chem.*, v. 67, n. 4, p. 649-666, 1995.
37. Algoritmo Simplex. Disponível em: <www.chem.uoa.gr/applets/AppletSimplex/Apppl_Simplex2.html>. Esse sítio tem um simulador gráfico do algoritmo Simplex. Disponível em: <www.grabitech.se/algorithm.html>. Acesso em: 16 dez. 2010.
38. BUREAU INTERNATIONAL DES POIDS ET MESURES (BIPM). International Electrotechnical Commission (IEC). International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC). International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). International Standards Organization International Union of Pure and Applied Physics (IUPAP) Organização Internacional de Metrologia Legal (OIML), Iso, Iupap, Oiml. *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM)*. Corrected and Reprinted, 1995. ISBN 92-67-10188-9.
39. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). *Guia para a Expressão da Incerteza de Medição*. 3. ed. brasileira do Guide to the

- Expression of Uncertainty in Measurement. rev. Rio de Janeiro: ABNT/Inmetro, ago. 2003. ISBN 85-07-00251-X.
40. TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 338-350, mar./abr. 2006. As planilhas eletrônicas para planejamentos fatoriais desse artigo estão disponíveis em: <<http://lqta.iqm.unicamp.br>>. Acesso em: 28 dez. 2010.
 41. CAPOBIANCO, G.; COUTINHO, A. dos R.; LUENGO, C. A. Preparação de carvões ativados com poros de dimensões nanométricas a partir de precursores de biomassa. In: PROCEEDINGS OF THE 5TH ENCONTRO DE ENERGIA NO MEIO RURAL, 5., 2004, Campinas (SP) [online]. Disponível em: <http://www.proceedings.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=MSC000000022004000200034&lng=en&nrm=iso>.
 42. GIMENEZ, I. de F.; COSTA JR., N. B. da. *Quimiometria, São Cristóvão*. Universidade Federal de Sergipe (UFSE). Centro Superior de Educação a Distância (CESAD), 2007. Aulas de 10 a 15 sobre planejamento fatorial. Disponível em: <<http://ava.cesad.ufs.br/cat/PDF/Quimiometria/Quimiometria%20Aula%201.pdf>>. Acesso em: 31 dez. 2010.
 43. CALADO, V. *Planejamento de experimentos usando o Statistica*. Editora E-papers, 2005. ISBN: 8587922831, ISBN-13: 9788587922830.
 44. MULLINS, E. *Statistics for the quality control chemistry laboratory*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2003. ISBN 0-85404-671-2.
 45. INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). *Compendium of Analytical Nomenclature*. IUPAC Orange Book. Disponível em: <http://old.iupac.org/publications/analytical_compendium/>. Acesso em: 27 jan. 2011.
 46. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. *Appendix V: draft guidelines for the design and implementation of national regulatory food safety assurance programmes associated with the use of veterinary drug residues in foods*. (at Step 8 of the Elaboration Procedure). CODEX ALINORM 09/32/31 May 2009, Joint Fao/Who Food Standards Programme Codex Alimentarius Commission, Thirty second Session Rome, Italy, 29 Jun./4 July 2009, Report Of The Eighteenth Session Of The Codex Committee On Residues Of Veterinary Drugs In Foods, Natal, Brazil 11-15 May 2009.
 47. DANZER, K. *Analytical chemistry, theoretical and metrological fundamentals*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2007. ISBN 978-3-540-35988-3, DOI 10.1007/b103950.
 48. DRAPER, N. R.; SMITH, H. *Applied Regression Analysis*. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 1998. ISBN: 0-471-17082-8.

49. HELENE, O. *Método dos mínimos quadrados com formalismo matricial*. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2006. Disponível em: <www.livivusp.com.br>, <www.livrariadafisica.com.br>. ISBN 8588325543, EAN 9788588325548.
50. BEVINGTON, P. R.; ROBINSON, K. D. *Data reduction and error analysis for physical science*. New York: McGraw-Hill, 2003. ISBN 978-0-07-247227-1.
51. HAMILTON, W. C. *Statistics in Physical Science: estimation, hypothesis testing and least squares*. New York: The Ronald Press Company, 1964. Library Congress Catalog Card Number 64-22168.
52. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC INTERNATIONAL). *Natural Toxins. Official methods of analysis of AOAC International*. 17th ed. p. 1-64, 2000. Chapter 49. (Gaithersburg, MD: AOAC International).
53. DRAGACCI, S.; GROSSO, F. Immunoaffinity column clean-up with liquid chromatography for determination of aflatoxin M1 in liquid milk: collaborative study. *Journal of AOAC International*, v. 84, n. 2, 2001.
54. SHEPHERD, M.; GILBERT, J. Long-Term Storage stability of Deoxynivalenol Standard Reference Solutions. *Journal Agriculture of Food Chemistry*, v. 36, p. 305-308, 1988.
55. EUROPEAN COMMISSION (EC). Commission Regulation 2006/401/CE of 23 February 2006. Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Official Journal of the European Communities*, 9 Mar. 2006. L 70/12.
56. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC INTERNATIONAL) 2005. *Official methods of analysis of AOAC International*. 18th ed. Edited by William Horwitz and George W. Latimer. Current through Revision 3. Natural Toxins. 2010. chapter 49.
57. Scheilla V. C. de Souza, Roberto G. Junqueira, A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Analítica Chimica Acta*, v. 552 p. 25-35, 2005, doi:10.1016/j.aca.2005.07.043.
58. Bruce, B.; Minkkinen, P.; Riekola, M. L. Practical method validation: validation sufficient for an analysis method. *Mikrochim Acta*, v. 128 p. 93-106, 1998.
59. Taverniers, I; de Loose, M.; van Bockstaele, E. Trends in quality in the analytical laboratory II: Analytical method validation and quality assurance. *Trends Anal. Chem.* v. 23 p. 535-552, 2004.

ANEXO XIV

Quadros Comparativos: Manual de Garantia da Qualidade Analítica *versus* outras Referências Normativas

Os quadros que se seguem fazem uma comparação simplificada dos conteúdos dos sete documentos ou normas internacionais com este “Manual de Garantia da Qualidade Analítica”.

Na primeira série de quadros, o Manual é comparado com quatro documentos, nesta ordem: a Decisão EC/657/2002 [10]; SANCO 10684/2009 [11]; EC/333/2007 [12] e CODEX ALINORM 09/32/31-2009 [46].

Na segunda série de quadros, o Manual é comparado com os outros três documentos, nesta ordem: INMETRO DOQ-CGECRE-008 Rev 03 Fev/2010 [21]; Guia EURACHEM 1998 Fit for Purpose [15] e IUPAC-AOAC Thompson 2002 [35].

Quadros Comparativos

Abrangência do Manual de Garantia da Qualidade Analítica em Relação aos Parâmetros de Validação Preconizados pelas Principais Normas e Referências Utilizadas

Parâmetros de Validação	Documentos				CODEX ALINORM 09/32/31 2009
	Manual de Gar. Qual. Analítica	EC/657/2002	SANCO 10684/2009 ⁽¹⁾	EC/333/2007	
<ul style="list-style-type: none"> • II.3 • Curvas de calibração matrizadas ou não matrizadas. • Pelo menos com cinco níveis de concentração. • Seis réplicas para cada nível de concentração. • Intervalo de trabalho. • MMQO/ MMQP⁽²⁾. • Homoscedasticidade/Heterocedasticidade • Equação da Reta ou polinômio. • Grau de ajuste da calibração com testes estatísticos. • Aceitabilidade dos parâmetros. ajustados da curva de calibração. • Faixa de trabalho do LQ até a maior concentração com incerteza = lmax • Sensibilidade é determinada pela derivada da curva de calibração. 	<ul style="list-style-type: none"> • 3.1.1.5 • Pelo menos com cinco níveis de concentração, incluindo o zero. • Intervalo de trabalho. • Equação da Reta. • Grau de ajuste dos dados na curva. • Aceitabilidade dos parâmetros ajustados da curva. 	<ul style="list-style-type: none"> • Calibração <i>Bracketing</i>. • Extratos com níveis altos de resíduos devem ser diluídos até a faixa de calibração. • Prevê a calibração por interpolação entre dois pontos. • Prevê a calibração com um ponto. • Prevê calibração exclusiva dos analitos representativos. 	<ul style="list-style-type: none"> • ND 	<ul style="list-style-type: none"> • 172 - Ajuste de regressão de reta. Curva de calibração matrizada. 	

Parâmetros de Validação	Documentos				CODEx ALINORM 09/32/31 2009
	Manual de Gar. Qual. Analítica	EC/6571/ 2002	SANCO 10684/ 2009 ⁽¹⁾	EC/333/ 2007	
Seletividade / Especificidade	<ul style="list-style-type: none"> • II.4.1 a II.4.2 - Análise de três níveis, seis réplicas de analito em solução e de matriz branca fortificada usando curva de calibração não matrizada (CCAS), Teste F e Teste t. • II.4.3 - Testes estatísticos sobre o intercepto e a inclinação das curvas de calibração matrizada (CCMBF ou CCEMBF) e não matrizada (CCAS), Teste F e Teste t. 	<ul style="list-style-type: none"> • 3.1.1.1 - Estimar os efeitos dos possíveis interferentes por fortificação de matriz branca ($n \geq 20$). 	<ul style="list-style-type: none"> • Avaliação visual da resposta instrumental em branco de reagente e em amostra de controle. 	<ul style="list-style-type: none"> • ND 	<ul style="list-style-type: none"> • 162-163 - Para procedimentos analíticos de triagem (<i>screening</i>). Análise de 30 matrizes brancas de diferentes fontes. Testar substâncias potencialmente interferentes. • 164 - Para procedimentos analíticos quantitativos. Definição e importância. • 175-180 - Para procedimentos analíticos de confirmação. Definição. FTIR e MS acoplada a GC e LC. Relação de possíveis métodos analíticos de confirmação.
Efeito de Matriz					
Parâmetros de Validação	Documentos				CODEx ALINORM 09/32/31 2009
	Manual de Gar. Qual. Analítica	EC/6571/ 2002	SANCO 10684/ 2009 ⁽¹⁾	EC/333/ 2007	
Veracidade	<ul style="list-style-type: none"> • II.5 - Ensaio com MRC ou com matriz branca fortificada em três níveis de concentração, seis réplicas por nível. 	<ul style="list-style-type: none"> • 3.1.1.2 - Ensaio com MRC; ou • 3.1.2.1 - com matriz branca fortificada em três níveis de concentração, seis réplicas por nível. 	<ul style="list-style-type: none"> • Recuperação média de fortificações no nível de interesse e no nível de reportagem. 	<ul style="list-style-type: none"> • Se possível a veracidade deve ser verificada com MRC. 	<ul style="list-style-type: none"> • 165-168 - Definição e limites. Usar MRC ou fortificações ao redor do MRL⁽³⁾.
Tendência					
Recuperação					

Parâmetros de Validação	Documentos			
	Manual de Gar. Qual. Analítica	EC/657/ 2002	SANCO 10684/ 2009 ⁽¹⁾	EC/333/ 2007
<p>Precisão de Repetitividade</p> <p>Precisão Intermediária (Reprodutibilidade intralaboratorial)</p> <p>Precisão de Reprodutibilidade</p>	<ul style="list-style-type: none"> II .6.3 - Repetitividade: ensaios com amostras de controle em três níveis de concentração, seis réplicas por nível. II.6.4 - Reprodutibilidade intralaboratorial: repetição dos ensaios de repetitividade em três dias. II.6 - Reprodutibilidade: participação em ensaios colaborativos. 	<ul style="list-style-type: none"> 3.1.2.1 - Repetitividade: ensaios com amostras em três níveis de concentração, seis réplicas por nível. 3.1.2.3 - Reprodutibilidade intralaboratorial: repetição dos ensaios de repetitividade em três dias. 3.1.2.4 - Reprodutibilidade: participação em ensaios colaborativos. 	<ul style="list-style-type: none"> Mínimo de cinco replicatas de fortificações no nível de interesse e no nível de reportagem. DPR de reprodutibilidade. 	<ul style="list-style-type: none"> HorRat_y < 2. HorRat_R < 2.
			<ul style="list-style-type: none"> 165-166 - Definição e limites. 169 - Precisão de repetitividade e reprodutibilidade. Estudo em diferentes dias, com pools de diferentes tecidos (matrizes), diferentes lotes de reagentes, diferentes equipamentos etc. (reprodutibilidade intralaboratorial). 	<p>CODEX ALINORM 09/32/31 2009</p>

Parâmetros de Validação	Documentos				CODEX ALINORM 09/32/31 2009
	Manual de Gar. Qual. Analítica	EC/ 657/ 2002	SANCO 10684/ 2009 ⁽¹⁾	EC/ 333/ 2007	
Limite de decisão (CC α)	<ul style="list-style-type: none"> • II.7.4 a II.7.6 CCα. • II.7.7 a II.7.9 CCβ. 	<ul style="list-style-type: none"> • 3.1.1.5 - CCα. Método descrito na norma ISO 11843 ou analisando 20 ou mais matrizes brancas. 			
Capacidade de detecção (CC β)	<ul style="list-style-type: none"> • Utilizando a curva de previsão da calibração (ISO 11843) e principais fontes de incerteza. • Pela análise de 20 matrizes brancas fortificadas no LMDR ou no LMR. 	<ul style="list-style-type: none"> • 3.1.1.6 - CCβ. Método descrito na norma ISO 11843 ou analisando 20 ou mais matrizes brancas fortificadas em CCα. 	<ul style="list-style-type: none"> • ND 	<ul style="list-style-type: none"> • ND 	<ul style="list-style-type: none"> • ND
Parâmetros de Validação	Documentos				CODEX ALINORM 09/32/31 2009
	Manual de Gar. Qual. Analítica	EC/ 657/ 2002	SANCO 10684/ 2009 ⁽¹⁾	EC/ 333/ 2007	
Incerteza de Medição Analítica (IMA)	<ul style="list-style-type: none"> • II.8.1 - Metodologia <i>Bottom-Up</i> (ISO GUM). • II.8.2 - Metodologia <i>Top-Down</i>, considerando as incertezas de amostragem, reprodutibilidade interna, tendência e de calibração. (Guia EURACHEM/CITAC QUAM:2000) 	<ul style="list-style-type: none"> • ND 	<ul style="list-style-type: none"> • ISO GUM (ISBN 92-67-10188-9); • EURACHEM/CITAC QUAM:2000. • DPR de reprodutibilidade. 	<ul style="list-style-type: none"> • Define a incerteza padrão de medição u e a incerteza expandida de medição U, mas não descreve seus procedimentos de estimação. 	<ul style="list-style-type: none"> • 190 - Determina a obrigatoriedade e se reporta ao Guia EURACHEM/CITAC QUAM:2000.

Parâmetros de Validação	Documentos				CODEX ALINORM 09/32/31 2009
	Manual de Gar. Qual. Analítica	EC/657/2002	SANCO 10684/2009 ⁽¹⁾	EC/333/2007	
Limite de Detecção (LD)	<ul style="list-style-type: none"> • II.7.1 - Corresponde ao valor do CCB calculado como para substâncias banidas. • II.7.2 - Estimado a partir da Incerteza Máxima Aceitável (Imax), definida por norma, legislação específica, contrato com o cliente ou pelo laboratório. • Abordagem por critérios ou baseada nos riscos. Adequação ao uso pretendido. 	<ul style="list-style-type: none"> • LD = CCB (ver Quadro 9 dessa norma). 	<ul style="list-style-type: none"> • ND 	<ul style="list-style-type: none"> • Três vezes o desvio-padrão do branco (n>20). 	<ul style="list-style-type: none"> • 173 - Intercepto mais três vezes o desvio-padrão residual do ajuste.
Limite de Quantificação (LQ)	<ul style="list-style-type: none"> • Abordagem por critérios ou baseada nos riscos. Adequação ao uso pretendido. 	<ul style="list-style-type: none"> • ND 	<ul style="list-style-type: none"> • Menor nível fortificado validado com veracidade e precisão aceitáveis. 	<ul style="list-style-type: none"> • Seis ou dez vezes o desvio-padrão do branco (n>20). 	<ul style="list-style-type: none"> • 174 - Intercepto mais dez vezes o desvio-padrão do residual do ajuste.
Parâmetros de Validação	Documentos				CODEX ALINORM 09/32/31 2009
	Manual de Gar. Qual. Analítica	EC/657/2002	SANCO 10684/2009 ⁽¹⁾	EC/333/2007	
Escopo/ Aplicabilidade	<ul style="list-style-type: none"> • II.9 - Estudo feito com planejamento fatorial completo ou fracionário de máxima resolução ou fracionário saturado (youden) ou variando fator a fator. • II.11 - Relatório de validação. 	<ul style="list-style-type: none"> • 3.1.1.3 - Estudo feito com planejamento fatorial saturado (youden). 	<ul style="list-style-type: none"> • Recuperação média e reprodutibilidade interna em validação concorrente (on-going validation). 	<ul style="list-style-type: none"> • ND 	<ul style="list-style-type: none"> • 183 - Determina o uso de planejamento fatorial para o estudo de robustez⁽⁴⁾ e relaciona alguns fatores que podem ser estudados.
Robustez					

Parâmetros de Validação	Documentos				
	Manual de Gar. Qual. Analítica	EC/ 657/ 2002	SANCO 10684/ 2009 ⁽¹⁾	EC/ 333/ 2007	CODEX ALINORM 09/32/31 2009
Estabilidade	<ul style="list-style-type: none"> • IV.1 - Estabilidade do analito na matriz não processada. • IV.1 - Estabilidade pós- processamento. • IV.3 - Estabilidade do analito em solução. • IV.4 - Estabilidade das soluções padrão. 	<ul style="list-style-type: none"> • 3.1.1.4. • Estabilidade do analito em solução. • Estabilidade do analito na matriz. 	<ul style="list-style-type: none"> • ND 	<ul style="list-style-type: none"> • ND 	<ul style="list-style-type: none"> • 185 - Estabelece a necessidade de estudo de estabilidade do analito nas soluções padrão e na matriz. Estudo por um período mínimo de 90 dias.

Notas: ND - Não Descrito.

⁽¹⁾ Substitui a SANCO/3131/2007.

⁽²⁾ MMQ = Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO) ou Ponderados (MMQP).

⁽³⁾ Usa erradamente o termo *accuracy* onde deveria usar *trueiness*.

⁽⁴⁾ Usa o termo *ruggedness* e não o termo *robustness*.

Parâmetros de Validação	Documentos		
	Manual de Gar. Qual. Analítica	INMETRO DOQ-CGCRE-008 Rev 03 Fev/2010 ⁽⁶⁾	Guia EURACHEM 1998 Fit for Purpose
	<ul style="list-style-type: none"> • II.3 • Curvas de calibração matrizadas ou não matrizadas. • Pelo menos com cinco níveis de concentração. • Seis réplicas para cada nível de concentração. • Intervalo de trabalho. • MMQO/ MMQP⁽²⁾. • Homoscedasticidade / heteroscedasticidade. • Equação da Retra ou polinômio. • Grau de ajuste da calibração com testes estatísticos. • Aceitabilidade dos parâmetros ajustados da curva. • Faixa de trabalho do LQ até a maior concentração com incerteza = lmax. • Sensibilidade é determinada pela derivada da curva de calibração. 	<ul style="list-style-type: none"> • 8.2.2 • Ajuste de reta pelo MMQ. • Pelo menos com cinco níveis de concentração. • Número de replicatas igual ao da rotina. • Faixa de linearidade por inspeção visual da curva de calibração. • Indica testes para valores discrepantes (<i>outliers</i>), para homoscedasticidade e ANOVA para linearidade. • Indica outras funções no caso da curva de calibração não ser reta. 	<p>IUPAC-AOAC Thompson 2002</p> <ul style="list-style-type: none"> • A3 - Linearidade: • Propõe o uso de curvas de calibração na rotina mais simples que na validação. • Teste informal da linearidade pelo exame do gráfico dos resíduos do ajuste da reta. • O uso do coeficiente de correlação é enganoso e inadequado para testar linearidade e deve ser evitado. • Seis níveis ou mais de calibração equidistantes. • Faixa de 0-150% ou 50-150% da conc. do analito. • Duplicata ou triplicata em ordem aleatória das soluções de calibração. • A7 - Faixa validada não é necessariamente igual à faixa de linearidade e depende da incerteza de medição. • O nível de interesse deve estar dentro da faixa validada. • A10 - Sensibilidade: é o gradiente da função de calibração. Não o considera útil para a validação, mas o é para os procedimentos de garantia da qualidade para a verificação dos instrumentos de medição.
Linearidade		<ul style="list-style-type: none"> • 6.26 – 6.30 • O limite inferior da faixa de trabalho é o LD/LQ. • Faixa de linearidade por inspeção visual da curva de calibração ou do gráfico de resíduos com dez ou mais níveis de concentração. • Inspeção visual do gráfico da resposta instrumental vs concentração de matriz branca fortificadas ou com diversos MRCs. • MMQP no caso de heteroscedasticidade. • Outras funções que não a reta. Não recomenda polinômio de grau > 2. • 6.44 - Sensibilidade: o gradiente da curva de calibração. 	
Sensibilidade			
Faixa de trabalho			
Calibração polinomial			

Parâmetros de Validação	Documentos		
	Manual de Gar. Qual. Analítica	INMETRO DOQ-CGCRE-008 Rev 03 Fev/2010 ⁽⁵⁾	Guia EURACHEM 1998 Fit for Purpose
Seletividade/ Especificidade	<ul style="list-style-type: none"> • II.4.1 a II.4.2 - Análise de três níveis, seis réplicas de analito em solução e de matriz branca fortificada usando curva de calibração não matrizada (CCAS). Teste F e Teste t. 	<ul style="list-style-type: none"> • 8.2.1 • Comparação dos resultados da análise com a amostra e materiais de referência pelo método em estudo e outros métodos validados. • Analisar amostras contendo vários interferentes suspeitos na presença do analito de interesse. 	<ul style="list-style-type: none"> • 6.13 – 6.19 • Comparação dos resultados da análise com a amostra e materiais de referência pelo método em estudo e outros métodos independentes validados. • Analisar amostras contendo vários interferentes suspeitos na presença do analito de interesse.
	Efeito de Matriz	<ul style="list-style-type: none"> • II.4.3 - Testes estatísticos sobre o intercepto e a inclinação das curvas de calibração matrizada (CCMBF ou CCEMBF) e não matrizada (CCAS). Teste F e Teste t. 	<ul style="list-style-type: none"> • A2 • Deve ser avaliada para qualquer interferente importante provável de estar presente. • Define o “índice de seletividade” como a razão da sensibilidade da curva de calibração matrizada sem o interferente e a inclinação da resposta instrumental vs a concentração do interferente na mesma matriz branca.

Parâmetros de Validação	Documentos			IUPAC-AOAC Thompson 2002
	Manual de Gar. Qual. Analítica	INMETRO DOQ-CGCRE-008 Rev 03 Fev/2010 ⁽⁵⁾	Guia EURACHEM 1998 Fit for Purpose	
Veracidade	<ul style="list-style-type: none"> • 11.5 - Ensaio com MRC ou com matriz branca fortificada em três níveis de concentração, seis réplicas por nível. 	<ul style="list-style-type: none"> • 8.2.6 • Estimada através de MRC ou ensaio colaborativo ou pela recuperação. • Recomenda corrigir o resultado se a recuperação for significativa⁽⁶⁾. • Recomenda comparar o resultado da análise do MRC com seu certificado usando o erro relativo ou o índice z-escore ou o erro normalizado. • Considere como recuperação apenas o ensaio com amostra (matriz branca) fortificada. 	<ul style="list-style-type: none"> • 6.30 – 6.36 • A veracidade é expressa em termos da tendência. • Comparação com um MRC ou com outro procedimento analítico bem caracterizado (validado) de referência baseado em um método analítico primário. • Determinação da média e do desvio-padrão de ensaios replicados com MRC. • Dez replicações. • 6.46 – 6.47 - Recuperação: Obtidas de MRCs. • Obtidas de fortificações em diferentes concentrações de matriz branca ou amostra de ensaio. 	<ul style="list-style-type: none"> • A4 - Veracidade: Medir a tendência com MRC. • Uso de procedimento de referência. • Uso de fortificação para medir a recuperação. • A6 - Recovery: por estudo de fortificação no A.4.
Tendência				
Recuperação				

Parâmetros de Validação	Documentos			IUPAC-AOAC Thompson 2002
	Manual de Gar. Qual. Analítica	INMETRO DOQ-CGCRE-008 Rev 03 Fev/2010 ⁽⁶⁾	Guia EURACHEM 1998 Fit for Purpose	
Precisão de Repetitividade	<ul style="list-style-type: none"> II.6.3 - Repetitividade: ensaios com amostras de controle em três níveis de concentração, seis réplicas por nível. 	<ul style="list-style-type: none"> 8.2.6.3 - Usa o CV. 8.2.6.3.1 - Repetitividade: desvio-padrão s_r em condições de repetitividade. Limite de repetitividade (r): $r = t_{vac} \times 2^{1/2} \times s_r$ 8.2.6.3.2 - Precisão intermediária: desvio-padrão s_{pi} em condições de precisão intermediária. 8.2.6.3.3 - Desvio-padrão s_R em condições de reprodutibilidade: indica a equação de Horwitz-Thomson para estimar s_{Rr}. Limite de reprodutibilidade (R): $R = t_{vac} \times 2^{1/2} \times s_{Rr}$ Número de replicações ≥ 7. Avaliação da precisão pelo HORRAT. 	<ul style="list-style-type: none"> 6.37 – 6.40 - Ensaios com MRC, MR, matriz branca fortificada, dez replicatas para cada nível na faixa de trabalho. Calcular s_r, r, s_R e R em função da concentração. 	<ul style="list-style-type: none"> A5 Especificada como desvio-padrão ou desvio-padrão relativo = CV. Prec. intermediária s_{pi} ou total s_{tot} prec. de repet. s_r ou intrabeladas s_{ib} e prec. entre ou interbeladas s_{eb}: $s_{tot} = s_{ib} \times 2^{1/2} + s_{eb}$, onde $n_r = \text{num. replicatas do resultado das amostras de ensaio na rotina, em geral 1.}$ Prec. em geral é i) const. ou ii) proporcional à C_{anal}: CV = const. Avallar em no mínimo um nível alto e outro baixo da faixa C_{anal} validada. Um teste F é adequado para avallar a homoscedasticidade. Experimentos podem ser planejados para estimar a precisão em diferentes combinações de condições intermediárias, estimando-se os efeitos entre-dias, entre-equipamentos, entre-técnicos etc. (ANOVA)
Precisão de Intermediária (Reprodutibilidade intralaboratorial)	<ul style="list-style-type: none"> II.6.4 - Reprodutibilidade intralaboratorial: repetição dos ensaios de repetitividade em três dias. 			
Precisão de Reprodutibilidade	<ul style="list-style-type: none"> II.6 - Reprodutibilidade: participação em ensaios colaborativos. 			

Parâmetros de Validação	Documentos			
	Manual de Gar. Qual. Analítica	INMETRO DOQ-CGCRE-008 Rev 03 Fev/2010 ⁽⁶⁾	Guia EURACHEM 1998 Fit for Purpose	IUPAC-AOAC Thompson 2002
Limite de decisão (CC α)	<ul style="list-style-type: none"> • II.7.4 a II.7.6 CCα. • II.7.7 a II.7.9 CCβ. • Utilizando a curva de previsão da calibração (ISO 11843) e principais fontes de incerteza. 	<ul style="list-style-type: none"> • ND 	<ul style="list-style-type: none"> • 6.20 - menciona nesta seção que a ISO 11843 usa o termo "valor mínimo detectável da variável líquida de estado", logo CCβ no lugar de LD. 	<ul style="list-style-type: none"> • ND
Capacidade de detecção (CC β)	<ul style="list-style-type: none"> • Pela análise de 20 matrizes brancas fortificadas no LMDR ou no LMR. 	<ul style="list-style-type: none"> • ND 		

Parâmetros de Validação	Documentos			
	Manual de Gar. Qual. Analítica	INMETRO DOQ-CGCRE-008 Rev 03 Fev/2010 ⁽⁶⁾	Guia EURACHEM 1998 Fit for Purpose	IUPAC-AOAC Thompson 2002
Incerteza de Medição Analítica (IMA)	<ul style="list-style-type: none"> • II.8.1 - Metodologia <i>Bottom-Up</i> (ISO GUM). • II.8.2 - Metodologia <i>Top-Down</i>, considerando as incertezas de amostragem, reprodutibilidade interna, tendência e de calibração. (Guia EURACHEM/CITAC QUAM:2000) 	<ul style="list-style-type: none"> • ND • Cita o uso do erro normalizado para avaliar participação em ensaio de proficiência se o laboratório calcular a incerteza expandida do resultado analítico (8.2.6.1.3). 	<ul style="list-style-type: none"> • 6.41 – 6.43 • Deve combinar as incertezas das fontes de precisão de longo termo (prec. inter.), tendência (correção), calibração dos instrumentos de medição (em geral pequena em relação às duas primeiras) e algum efeito significativo detectado no estudo de robustez. • Pode-se ampliar a incerteza se uma correção significativa é estimada, mas o resultado não é corrigido por ela. 	<ul style="list-style-type: none"> • A13 - Propõe que um componente de incerteza devido à variação possível da matriz dentro da classe definida seja avaliada. • A14 - Lei de propagação das incertezas (método <i>Bottom-Up</i>) incluindo as fontes de variabilidade detectadas na validação: s_r e s_{ep}, ou seja precisão intermediária ou reprod. interna. Incluir as fontes de não homogeneidade e variabilidade da matriz. Considerar a dependência da incerteza com a conc. Calcular a incerteza expandida. Recomenda fator de abrangência $k \geq 3$ para procedimentos apenas validados internamente no laboratório. • B1 - Detalhes sobre a determinação experimental dos coeficientes de sensibilidade usando dados do estudo de robustez. • B1 - Recomenda a avaliação de incerteza por julgamento na impossibilidade de estimar mais estatísticas.

Parâmetros de Validação	Documentos			
	Manual de Gar. Qual. Analítica	INMETRO DOQ-CGCRE-008 Rev 03 Fev/2010 ⁽⁵⁾	Guia EURACHEM 1998 Fit for Purpose	IUPAC-AOAC Thompson 2002
Limite de Detecção (LD)	<ul style="list-style-type: none"> • 11.7.1 - Corresponde ao valor do $CC\beta$ calculado como para substâncias banidas. 	<ul style="list-style-type: none"> • 8.2.4 • Recomenda seu cálculo para análises de concentrações baixas (traços). • Calcula o LD como zero ou a média dos brancos somada a um múltiplo t do desvio-padrão do branco. • Recomenda a verificação experimental do LD com fortificação no valor calculado em, no mínimo, sete réplicas. • Um LD para cada combinação matriz/analito. 	<ul style="list-style-type: none"> • 6.20 – 6.23 • Recomenda seu cálculo para análises de concentrações baixas (traços). • a) LD como zero dos brancos somado a três vezes o desvio-padrão do branco s_0. 10 replicatas • b) LD de branco fortificado sucessivas vezes em concentração baixa em, no mínimo, dez réplicas por concentração. Cálculo como em a). • c) $LD = 0 + 4,65 \times s_0$. • O LD para procedimento qualitativo é obtido por fortificações cada vez mais baixas (dez replicatas cada) até a concentração que não dê 100% de positivos. 	<ul style="list-style-type: none"> • A8 • Para procedimentos em que a faixa validada não inclui o zero e nem está próxima dele, não é necessário determinar LD. • O conceito tem muitos problemas: várias e diferentes abordagens envolvem a incerteza no zero sem especificar as condições, as estimativas são tendenciosas para baixo e assumem um questionável comportamento normal em baixas concentrações. • LD apresentados em literatura e brochuras de instrumentos analíticos são menores que LD “práticos” e não são adequados como LD de validação. • s_0 do branco determinado com, no mínimo, seis replicatas. LD calculado na base de $3s_0$.

Parâmetros de Validação	Documentos		
	Manual de Gar. Qual. Analítica	INMETRO DOQ-CGCRE-008 Rev 03 Fev/2010 ⁽⁶⁾	Guia EURACHEM 1998 Fit for Purpose
Limite de Quantificação (LQ)	<ul style="list-style-type: none"> 11.7.2 - Estimado a partir da Incerteza Máxima Aceitável (Imax), definida por norma, legislação específica, contrato com o cliente ou pelo laboratório. Abordagem por critérios ou baseada nos riscos. Adequação ao uso pretendido. 	<ul style="list-style-type: none"> 8.2.5 Indica que LQ = MNC (especialmente para análise de traços) excluindo o branco. Calcula o LQ como zero ou a média dos brancos somada a um múltiplo 5, 6 ou 10 do desvio-padrão do branco. Recomenda que a maneira mais realista é determinar o LQ experimentalmente por fortificações sucessivas, com base em critérios aceitação de desvio-padrão pré-definidos (abordagem pró-critérios). 	<p>IUPAC-AOAC Thompson 2002</p> <ul style="list-style-type: none"> A9 Apresenta as definições matemáticas arbitrarias de LQ como 10% DPR ou 2LD questionando a garantia do uso do procedimento acima desses limites. Não recomenda o uso de LQ. Recomenda expressar a incerteza de medição como função da concentração, e comparar essa função com os critérios de adequação ao uso pretendido acordado entre o laboratório e o cliente ou usuário final do resultado analítico.

Parâmetros de Validação	Documentos			
	Manual de Gar. Qual. Analítica	INMETRO DOQ-CGECRE-008 Rev 03 Fev/2010 ⁽⁶⁾	Guia EURACHEM 1998 Fit for Purpose	IUPAC-AOAC Thompson 2002
Escopo/ Aplicabilidade	<ul style="list-style-type: none"> • II.9 - Estudo feito com planejamento fatorial completo ou fracionário de máxima resolução ou fracionário saturado (<i>youden</i>) ou variando fator a fator. • II.11 - Relatório de validação. 	<ul style="list-style-type: none"> • 8.2.6.4 - Estudo feito com planejamento fatorial saturado (<i>youden</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> • 6.45 • Fazer variações deliberadas no procedimento e investigar os subsequentes efeitos sobre seu desempenho. • Planejar experimentos para monitorar os efeitos sobre a veracidade e a precisão, variando sistematicamente as variáveis que podem afetar o desempenho do procedimento analítico significativamente. • Indica o uso do método de planejamento fatorial saturado (<i>youden</i>). 	<ul style="list-style-type: none"> • A1 - Escopo/aplicabilidade: O relatório da validação: identidade/especificação; faixas de conc. matrizes validadas; procedimento definitivo; recomendações de controle e de segurança etc. • A11 - robustez: Define <i>ruggedness</i> como a resistência a pequenas variações nas condições experimentais do procedimento. Variar fator a fator ou usar o planejamento fatorial fracionário (<i>youden</i>). Exemplos de fatores a alterar: alterações no instrumento, operador, marca de reagente, conc. de reagente, pH, temperatura e/ou tempo de um processo.
Robustez				

Parâmetros de Validação	Documentos			
	Manual de Gar. Qual. Analítica	INMETRO DOQ-CGECRE-008 Rev 03 Fev/2010 ⁽⁵⁾	Guia EURACHEM 1998 Fit for Purpose	IUPAC-AOAC Thompson 2002
Estabilidade	<ul style="list-style-type: none"> • IV.1 - Estabilidade do analito na matriz não processada. • IV.1 - Estabilidade pós- processamento. • IV.3 - Estabilidade do analito em solução. • IV.4 - Estabilidade das soluções padrão. 	• ND	• ND	• ND

Notas: ND - Não Descrito.

C_{anal} = concentração do analito.

⁽²⁾ MMQ = Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO) ou Ponderados (MMQP)

⁽⁵⁾ A numeração das seções desse documento coloca, inadequadamente, a seção 8.2.6.3 precisão e a seção 8.2.6.3 robustez como subseções da seção 8.6 Tendência/Recuperação, dando a falsa impressão de que esse é causa daqueles.

⁽⁶⁾ Usa na nota da seção 8.2.6 o termo exatidão quando deveria usar veracidade.

ISBN 978-85-7991-055-6



9 788579 191055 51



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA