



**Karina da Silva Tavares** Validação de métodos de análises cromatográficas:  
**Ferreira** determinação de HCl



**Karina da Silva Tavares** **Validação de métodos de análises cromatográficas:**  
**Ferreira** **determinação de HCl**

Relatório de estágio apresentado à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química Analítica e Qualidade, realizado sob a orientação científica da Prof<sup>a</sup> Doutora Maria Eduarda da Cunha Pereira, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, e co-orientação do Prof. Doutor Carlos Borrego, Professor Catedrático do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho aos meus filhos que são o meu maior tesouro...

**o júri**  
presidente

**Prof. Doutor Artur Manuel Soares da Silva**  
Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutor Pedro Emanuel Pato Martins**  
Assistente convidado da Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Viana do Castelo

**Prof. Doutor Carlos Borrego**  
Professor Catedrático do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutora Maria Eduarda da Cunha Pereira**  
Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao Professor Doutor Carlos Borrego, por toda a disponibilidade e pelo apoio dispensado ao longo deste trabalho.

Agradeço à Professora Maria Eduarda Pereira pelo acompanhamento e pela ajuda dispensada, mostrando-se sempre disponível na partilha de conhecimentos.

Ao meu marido, aos meus pais, irmã e cunhados, agradeço o apoio, o encorajamento e a compreensão incondicional que sempre me demonstraram.

Ao IDAD entidade que contribuiu para o enriquecimento da minha experiência profissional.

A todos aqueles que, não estando aqui mencionados, de alguma forma me apoiaram na realização deste mestrado.

**palavras-chave**

Cromatografia Iónica, Validação de métodos, Efluentes Gasosos, Cloreto de Hidrogénio

**resumo**

São muitas as situações em que um laboratório se vê “obrigado” a implementar metodologias analíticas com o intuito de obter um resultado com o maior rigor analítico possível.

Uma parcela significativa desse rigor provém do conhecimento que é tido à priori da resposta e da performance do método analítico que se pretende aplicar.

O objetivo principal deste trabalho é descrever os estudos e respetivas conclusões, relativos ao processo de implementação de uma metodologia analítica que envolve a cromatografia iónica, como técnica instrumental para a determinação de Cloreto de Hidrogénio – HCl – em amostras gasosas provenientes de fontes fixas de acordo com o referencial normativo EN 1911:2010.

O processo de validação passa pela avaliação de diversos parâmetros, tais como, quantificação do método de ensaio, precisão e exatidão, para os quais, foram elaboradas cartas de controlo com o intuito de verificar se a metodologia implementada se encontra sob controlo estatístico.

Do processo de validação foram definidos os seguintes critérios base para a implementação em rotina da metodologia analítica: gama de trabalho 0,15 a 40 mg Cl/L; limite de quantificação de 0,15 mg Cl/L; coeficiente de variação do estudo de precisão intermédia da verificação experimental do limite de quantificação e padrões de controlo inferior a 10 %; ensaios de recuperação aceites na gama 80 a 120%; incerteza relativa da ordem dos 12%. Por outro lado, na participação em ensaios interlaboratoriais foram obtidos resultados satisfatórios.

**keywords**

Ionic Chromatography, Validation of methods, Stack Emissions, Hydrogen Chloride.

**abstract**

There are many situations in which a laboratory is forced to implement analytical methods in order to obtain a result with the best analytical precision that is possible.

A significant part of that precision comes for the initial knowledge of the response and performance of the analytical method we wish to apply.

The main objective of this work is to describe great part of the studies and conclusions that were made, regarding the implementation process of an analytical methodology involving ionic chromatography, as an instrumental technique to the determination of Hydrogen Chloride – HCl – in gaseous samples from stack emissions EN 1911:2010.

The validation process consists on the evaluation of several parameters, such as, quantification of the test method, precision and accuracy, for which control charts were made, in order to verify if the implemented methodology lies under statistical control.

From the validation process the following base criteria were defined for the implementation of an analytical methodology: working range between 0.15 and 40 mg Cl/L; limit of quantification of 0.15 mg Cl/L; coefficient of variation of intermediate precision study of experimental verification of quantification limit and control patterns less than 10%; recovery tests accepted within a range between 80 and 120%; relative uncertainty near 12 %. On the other hand, when participating in interlaboratory proficiency tests, satisfactory results were obtained.

## Índice

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS .....	1
VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E REQUISITOS DE VALIDAÇÃO PARA A CROMATOGRAFIA IÓNICA.....	4
1. Avaliação dos princípios teóricos do método.....	13
2. Performance Cromatográfica.....	16
2.1 Fator de retenção (k).....	18
2.2 Fator de separação ( $\alpha$ ) .....	18
2.3 Resolução (Rs).....	18
2.4 Número de pratos (N).....	19
2.5 Fator de assimetria (As) e/ou de alargamento (TF).....	19
2.6 Velocidade de eluição.....	20
3. Parâmetros analíticos de validação.....	21
3.1 Curva de calibração .....	21
3.2 Gama de trabalho .....	22
3.3 Linearidade .....	23
3.4 Sensibilidade.....	26
3.5 Limites de deteção e de quantificação .....	26
3.6 Precisão/fidelidade.....	28
3.6.1 Repetibilidade / Fidelidade em condições de repetibilidade .....	29
3.6.2 Reprodutibilidade .....	29
3.6.3 Precisão Intermédia / Fidelidade intermédia .....	29
4. Avaliação direta.....	30
4.1 Materiais de referência certificados (MRC) .....	30
4.2 Ensaio interlaboratoriais.....	31
4.2.1 Fator de Desempenho (“Z-score”).....	33



4.2.2 Erro Normalizado .....	33
4.3 Ensaio de recuperação .....	34
5. Incertezas .....	35
5.1 Incerteza associada à variabilidade/fidelidade do método de ensaio (uvar) .....	37
5.1.1 Através dos padrões de controlo .....	37
5.1.2 Através dos duplicados de amostra .....	37
5.2 Incerteza associada à justeza da medição .....	37
5.2.1 Através da análise de materiais de referência certificados (MRC): .....	38
5.2.2 Através de ensaios de recuperação .....	38
5.3 Incerteza combinada .....	39
5.4 Incerteza expandida .....	39
<b>RESULTADOS DA VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA DE DETERMINAÇÃO DE HCL EM AMOSTRAS DE EFLUENTES GASOSOS .....</b>	<b>40</b>
1. Sistema Cromatográfico .....	41
2. Material e soluções de trabalho .....	43
3. Preparação da amostra .....	43
4. Performance cromatográfica.....	43
5. Gama de trabalho, linearidade e limites do método .....	46
6. Estudo da precisão .....	54
7. Estudo da exatidão do método.....	58
7.1 Ensaio de recuperação .....	58
7.2 Erros relativos .....	59
7.3 Ensaio de comparação interlaboratorial .....	59
8. Incertezas .....	59
<b>RESULTADOS DO CONTROLO DA QUALIDADE .....</b>	<b>63</b>
1. Curva de Calibração .....	65

2.	Padrões de Controlo .....	68
3.	Branco.....	72
4.	Duplicados .....	72
5.	Limiar analítico.....	73
6.	Ensaio de Recuperação .....	74
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....		76
BIBLIOGRAFIA .....		79
ANEXO I – COMPOSIÇÃO DO SISTEMA DE QUALIDADE EM PORTUGAL .....		84
ANEXO II – QUALIFICAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS PARA FINS ANALÍTICOS		87

## Índice das tabelas

Tabela 1. Critérios de avaliação da qualificação de desempenho do cromatógrafo iónico.	8
Tabela 2. Condições gerais de operação do equipamento. ....	42
Tabela 3. Estudo da eficiência do sistema para a determinação de Cloretos. ....	44
Tabela 4. Estudo da sensibilidade.....	45
Tabela 5. Capacidade de resolução da coluna cromatográfica. ....	46
Tabela 6. Avaliação da intensidade do sinal em função da concentração. ....	47
Tabela 7. Teste de Homogeneidade de Variâncias para cada uma das gamas de trabalho. .....	49
Tabela 8. Parâmetros da curva de calibração para cada uma das gamas. ....	52
Tabela 9. Limites associados ao método, declive e ordenada na origem. ....	52
Tabela 10. Ensaio de repetibilidade e avaliação da presença de valores aberrante, gama baixa. ....	54
Tabela 11. Ensaio de repetibilidade e avaliação da presença de valores aberrante, gama média. ....	55
Tabela 12. Ensaio de repetibilidade e avaliação da presença de valores aberrante, gama alta. ....	56
Tabela 13. Ensaio de precisão intermédia. ....	57
Tabela 14. Teor de recuperação dos ensaios de fortificação das amostras.....	58
Tabela 15. Participação nos ECI's para a determinação de cloretos/HCl. ....	59
Tabela 16. Estimativa da incerteza para a componente Veracidade.....	60
Tabela 17. Estimativa da incerteza para a componente fidelidade.....	61
Tabela 18. Avaliação dos resíduos no ensaio realizado a 21 de setembro de 2011. ....	65
Tabela 19. Definição das casas decimais.....	72
Tabela 20. Limite de deteção do método.....	74

## Índice das figuras

Figura 1. Etapas de validação da instrumentação em HPLC, adaptado de Papadoyannis (2005). .....	6
Figura 2. Diferentes níveis da garantia da qualidade para um laboratório de ensaios. ....	9
Figura 3. Propósitos de uma medição analítica, adaptado de Mairé (1999).....	12
Figura 4. Constituição do trem de amostragem de HCl em efluentes gasosos, adaptado de EPA (2010). .....	15
Figura 5. Medidas obtidas a partir de um cromatograma, adaptado de Paschoal <i>et al.</i> 2008. ....	17
Figura 6. Curvas da equação de van Deemter. ....	21
Figura 7. Variação de HETP em função da velocidade linear e do fluxo. ....	44
Figura 8. Cromatograma para um padrão multi-elementos de 1 mg/L. ....	45
Figura 9. Intensidade do sinal em função da concentração e respetivo intervalo de confiança para a gama baixa, média e alta. ....	47
Figura 10. Desvio padrão em função da área para a gama baixa, média e alta. ....	48
Figura 11. Curva de calibração para o cloreto e avaliação pelo teste <i>Mandel</i> de cada gama de trabalho. ....	51
Figura 12. Distribuição dos resíduos para cada uma das gamas. ....	53
Figura 13. Triângulo da qualidade para os dados analíticos, adaptado de Bansal et al (2004). ....	64
Figura 14. Carta de controlo de amplitudes e indivíduos para o declive da gama baixa. .	66
Figura 15. Carta de controlo de amplitudes e indivíduos para o declive da gama média. .	66
Figura 16. Carta de controlo de amplitudes e indivíduos para o declive da gama alta. ....	67
Figura 17. Carta de Controlo de Amplitudes e Indivíduos para o tempo de retenção para o ião cloreto. ....	68
Figura 18. Tendência da leitura do padrão de controlo de verificação do limite de quantificação (0,15 mg/L Cl) e o padrão intermédio da gama baixa (0,40 mg/L Cl). ....	69

Figura 19. Tendência da leitura do padrão de controle da gama média (3,0 e 7,0 mg/L Cl). .....	70
Figura 20. Tendência da leitura do padrão de controle da gama alta (16,0 e 36,0 mg/L Cl). .....	71
Figura 21. Diferença relativa de duplicados de amostras (período de Janeiro de 2010 a Julho de 2012). .....	73

## Lista de Siglas e Abreviaturas

$\alpha$  – Fator de separação.

A – Coeficiente do efeito dos caminhos múltiplos, equação de Van Demteer.

AFNOR – Association Française de Normalisation.

ANOVA – Analysis of Variance.

AOAC - Association of Analytical Communities.

APLAC – Asia Pacific Laboratory Accreditation Cooperation.

As – Fator de assimetria.

ASTM – American Society for Testing and Materials.

B – Coeficiente de difusão longitudinal, a equação de Van Demteer.

bar – Unidade de pressão.

BPL – Boas práticas de laboratório.

BSI – British Standards Institution.

C – Coeficiente de transferência de massa, a equação de Van Demteer.

CASCO – Committee on conformity assessment.

CDER – Center for Drug Evaluation and Research.

CEN – European Committee for Standardization

CENELEC – European Committee for Electrotechnical Standardization

CITAC – Cooperation on International Traceability in Analytical Chemistry.

CV – Coeficiente de variação.

CNQ – Conselho Nacional da Qualidade.

CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono.

CT – Comité Técnico.

$\Delta L$  – Variação da resposta.

$\Delta C$  – Variação da concentração.

DIN – Deutsches Institut für Normung.

DL – Decreto – Lei.

DS – Diferença das variâncias.

EA – European co-operation for Accreditation.

ECI – Exercícios de Comparação Interlaboratorial.

EPTIS – European Information System of Profency Testing Schemes.

En – Erro normalizado.

Er – Erro relativo.

EURACHEM – Rede de organizações europeias com o objetivo de promover a rastreabilidade internacional das medições analíticas e as práticas de qualidade.

Eurolab – European Federation of National Associations of Measurement, Testing and Analytical Laboratories.

FDA – Food and Drug Administration.

GUM – Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement.

H – Altura equivalente a um prato.

HCl – Cloreto de Hidrogénio.

HETP – Height Equivalent to a Theoretical Plate.

HPLC – High Performance Liquid Chromatography.

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Ácido sulfúrico.

IEC – International Electrotechnical Commission.

IDAD – Instituto do Ambiente e Desenvolvimento.

ILAC – International Laboratory Accreditation Cooperation.

INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.

INSA – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.

IPAC – Instituto Português de Acreditação.

IPPC – Integrated Pollution Prevention and Control.

IPQ – Instituto Português da Qualidade.

ISO – International Organization for Standardization.

ISO/TS – International Organization for Standardization / Technical Specification.

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry.

k – Fator de retenção.

K – Unidade de temperatura, Kelvin.

kPa – Unidade de pressão, kilo Pascal.

L – Comprimento da coluna.

LD – Limite de deteção.

LDE – Limite de deteção do equipamento.

LDM – Limite de deteção do método.

LQ – Limite de quantificação.

MR – Material de referência.

MRC – Materiais de referência certificados

N – Número de pratos  
NATA – National Association of Testing Authorities.  
NaHCO<sub>3</sub> – Hidrogenocarbonato de sódio.  
Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – Carbonato de sódio.  
NIST – National Institute of Standards and Technology.  
NP – Norma Portuguesa.  
OECD – Organização para a Cooperação e Desenvolvimentos Económico.  
ONS – Organismo de Normalização Sectorial.  
ppm – Partes por milhão.  
PG – Valor teste do teste Fischer/Snedecor.  
RELACRE – Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal.  
Rs – Resolução.  
S – Variância.  
SMEWW – Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.  
SPQ – Sistema Português da Qualidade.  
S<sub>y/x</sub> – Desvio padrão residual da reta.  
TF – Fator de alargamento.  
t<sub>M</sub> – Tempo em que as moléculas do(s) analito(s) fica(m) na fase móvel.  
t<sub>R</sub> – Tempo de retenção do analito.  
t'<sub>R</sub> – Tempo de retenção relativo do analito.  
US EPA – United States Environmental Protection Agency.  
USP – United States Pharmacopeial Convention.  
μ – Velocidade linear da fase móvel.  
VDI – Verein Deutscher Ingenieure.  
VIM – Vocabulário Internacional de Metrologia.  
W<sub>b</sub> – Largura de base do pico cromatográfico.  
W<sub>50</sub> – Largura do pico cromatográfico a meia altura.  
WHO – World Health Organization.  
Z-score – Fator de desempenho.



## **INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**

A preocupação atual dos laboratórios de prestação de serviços é de atenderem às exigências do mercado, dando resposta com qualidade a baixo custo. A implementação de um sistema da qualidade permite estabelecer um conjunto de procedimentos e responsabilidades que a empresa põe em ação para garantir que sejam efetuadas medições que satisfaçam as necessidades dos clientes.

O desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou a implementação de um método conhecido, envolvem um processo de avaliação que estime sua eficiência na rotina do laboratório. Este processo é denominado de validação. Várias definições estão descritas na literatura para validação, tratando-se portanto de termo não-específico em constante evolução (Sarah K 2005).

De acordo com a United States Pharmacopeia XXIV (2000), a validação de métodos analíticos “é o processo pelo qual é estabelecido, por estudos de laboratório, que as características executadas do método satisfazem os requisitos para as aplicações analíticas praticadas”.

“A validação deve ser considerada parte do ciclo de vida completo de um sistema informatizado. Este ciclo inclui as fases de planejamento, especificação, programação, teste, entrada em funcionamento, documentação, operação, monitorização e modificação” (INFARMED 2008).

“Validação é o processo de definir uma exigência analítica e confirmar que o método sob investigação tem capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer”(EURACHEM 1998).

“Confirmação por testes e apresentação de evidências objetivas de que determinados requisitos são preenchidos para um dado uso intencional” (ISO/IEC17025 2005).

“O objetivo da validação consiste em demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito”(Máire C 1999).

A validação, segundo o relatório 32 da Organização Mundial de Saúde (WHO 1992) “é o ato documentado que atesta que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, operação ou sistema realmente conduza aos resultados esperados”.

Determinado método é considerado validado desde que cumpra todos os requisitos estabelecidos no referencial de base. Sempre que a metodologia implementada não cumpra na íntegra os requisitos estabelecidos no referencial, nomeadamente, inclusão de

novas técnicas ou uso de diferentes equipamentos, o laboratório deverá proceder à sua avaliação, através da comparação com outras metodologias de referência em prática no próprio laboratório ou em outro laboratório, com vista a verificar se há ou não diferenças significativas.

O principal objetivo deste trabalho é o de apresentar o processo de validação de modo a constatar o cumprimento na íntegra do referencial normativo EN 1911:2010, nomeadamente na implementação da cromatografia iónica como técnica analítica para a determinação de HCl em amostras de efluentes gasosos, numa gama de  $1 \text{ mg m}^{-3}$  a  $5000 \text{ mg m}^{-3}$ , para condições de pressão e temperatura normal (101,3 kPa e 273 K, respetivamente).

Com vista a demonstrar todo o processo analítico de implementação da metodologia analítica, o presente trabalho encontra-se dividido em cinco capítulos. O presente capítulo, corresponde ao primeiro no qual se descrevem os diversos conceitos de validação, assim como a indicação do objetivo do trabalho que se pretende atingir.

O segundo capítulo está dividido em duas componentes: a primeira compreende à descrição do enquadramento das metodologias de validação dos métodos analíticos em laboratórios acreditados; a segunda componente identifica os requisitos de validação focalizados para a cromatografia iónica.

O terceiro capítulo compreende os resultados da validação da metodologia analítica que aplica a cromatografia iónica como técnica instrumental para a determinação do HCl em amostras de efluentes gasosos.

O quarto capítulo abrange os resultados do controlo de qualidade adotado para a metodologia analítica desenvolvida.

O último capítulo tece as considerações finais no que diz respeito à obtenção e viabilidade dos objetivos inicialmente propostos.

**VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E REQUISITOS DE VALIDAÇÃO  
PARA A CROMATOGRAFIA IÓNICA**

O Comércio internacional, a globalização e os requisitos base da qualidade de vida, nomeadamente a saúde, o meio ambiente e os alimentos, são hoje de grande importância e requerem uma forte infraestrutura internacional, exigindo que os dados analíticos sejam comparáveis e consistentes. Consequentemente, é necessário eliminar as “barreiras técnicas entre os países. Para atingir este reconhecimento a nível internacional”, (Silva and Alves 2006), ou seja, garantir que, uma vez efetuada a medição esta seja aceite em qualquer país, é necessário uniformizar os requisitos legais, de certificação e de acreditação.

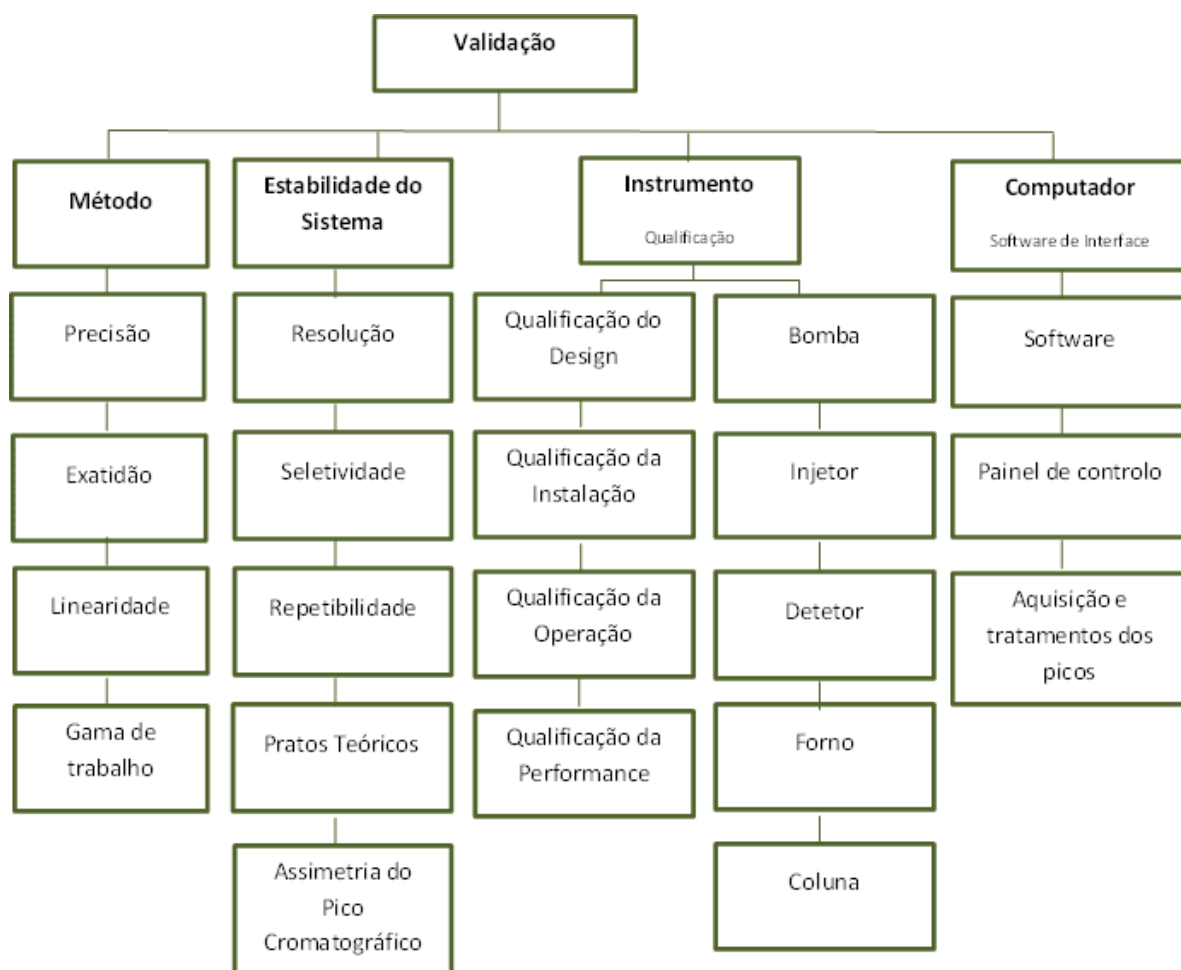
É com base neste objetivo que os estados membros da OECD se reuniram e legislaram as substâncias químicas e outras, para as quais o fabricante deve executar estudos laboratoriais e submeter estes estudos a uma autoridade governamental que avalia a sua conformidade. Em Portugal essa autoridade é o IPQ, organismo público que tem por missão a coordenação do SPQ e de outros sistemas de qualificação regulamentar que lhe forem conferidos por lei, a promoção e a coordenação de atividades que visem contribuir para demonstrar a credibilidade da ação dos agentes económicos, bem como o desenvolvimento das atividades inerentes à sua função de laboratório nacional de metrologia.

Enquanto Organismo Nacional Coordenador do SPQ, são atribuições do IPQ a gestão, coordenação e desenvolvimento do Sistema Português da Qualidade, numa perspetiva de integração de todas as componentes relevantes para a melhoria da qualidade de produtos, de serviços e de sistemas da qualidade e da qualificação de pessoas. No anexo I é apresentado uma breve descrição das diversas entidades que gerem a máquina da qualidade e que são entidades de referência para os laboratórios de ensaio.

Após a referência das entidades que em Portugal gerem toda a máquina da Qualidade é necessário entender como se constrói o mecanismo da validação.

A validação é referida como um procedimento de verificação da performance do método analítico, sendo a linha de orientação mais comum na maioria da documentação científica divulgada e objetivo deste trabalho. Contudo, a validação vai muito para além dos estudos dos parâmetros referidos no capítulo seguinte e depende muito da entidade regulamentadora para a qual o laboratório deve prestar informação (EPA, USP, FDA, etc).

As linhas orientadoras para o enquadramento da avaliação de um sistema cromatográfico seguem o capítulo geral 1058 da USP, para a validação de métodos instrumentais, o qual define o seguinte princípio base: “Testes de adequação do sistema são uma parte importante para as metodologias cromatográficas. Os testes baseiam-se no conceito de que os equipamentos, sistema eletrónico, operações analíticas e amostras constituem um único sistema e que deve ser avaliado como tal”. Na Figura 1 são esquematizados os diferentes elementos que devem ser considerados num sistema cromatográfico de forma a avaliar a adequação do sistema.



**Figura 1.** Etapas de validação da instrumentação em HPLC, adaptado de Papadoyannis and Samanidou (2005).

Resumidamente, o guia da USP apresenta as boas práticas para evidenciar a adequação do sistema hardware do instrumento (qualificação instrumental) para além da avaliação do método de análises e o software (qualificação processo) (Kaminski et al. 2010).

A primeira entidade que introduziu a terminologia da implementação da qualificação instrumental e qualificação do processo de performance direcionando para a indústria farmacêutica foi a FDA em maio de 1987 (Smith 2007).

A validação e a qualificação possuem essencialmente o mesmo conceito. O termo qualificação é normalmente usado para equipamentos, utilidades e sistemas, enquanto validação se aplicada a processos (para o laboratório o processo é a metodologia analítica). Assim, a qualificação constitui-se uma parte da validação. No entanto, existem documentos onde se utiliza o termo “validação”, inclusive em substituição do termo “qualificação”.

Embora a monografia 1058 da USP seja de caráter recomendatório, foi bem recebida pela indústria farmacêutica e serve de orientação para outras áreas. Neste documento estabelece-se que o processo de qualificação de um sistema instrumental segue o modelo dos quatro Q's (Swartz 2002): Qualificação de Design; Qualificação da Instalação; Qualificação Operacional; Qualificação de Desempenho. No anexo II apresenta-se a informação mais detalhada da abrangência das avaliações a que são sujeitos os equipamentos.

No âmbito da aplicação da cromatografia iônica como técnica analítica num laboratório de ensaios da área ambiental, a avaliação instrumental passa pela qualificação da instalação e operacionalidade no ato da receção do equipamento. Posteriormente, sempre que se iniciam ensaios e após cada intervenção de manutenção de caráter preventivo ou curativo, o laboratório deve proceder a avaliação da qualificação de desempenho. Esta avaliação é alcançada com ensaios experimentais para os quais são avaliadas a exatidão e a precisão dos resultados.

Consoante a sua finalidade, a etapa Qualificação de Desempenho pode ser considerada em duas fases (Papadoyannis and Samanidou 2005): 1) A primeira etapa antes da implementação e validação do método, na qual são definidos os critérios do sistema cromatográfico, normalmente indicados pelo fabricante que servem de base de referência na avaliação da aptidão do equipamento; 2) A segunda etapa corresponde à avaliação do sistema como um todo para o cumprimento da metodologia desenvolvida, cujos procedimentos e critérios dos diversos parâmetros de validação serão descritos no capítulo seguinte.

Na Tabela 1 (Kaminski et al. 2010), definem-se os principais parâmetros avaliados e respectivas metodologias de avaliação e os critérios associados.

**Tabela 1.** Critérios de avaliação da qualificação de desempenho do cromatógrafo iônico.

<b>Módulo</b>	<b>Parâmetros</b>	<b>Procedimento e Critério</b>
Bomba	Precisão do caudal de eluição	Para a eluição isocrática e com auxílio de um balão de 10 mL calibrado e um cronómetro calibrado, avaliar o tempo requerido para preencher até à marca o balão. O caudal final não deve diferir em mais de 3%.
Injetor	Precisão do volume de injeção	Realizar 10 injeções de 40 µL e avaliar a diferença de massa da <i>vial</i> antes e após as injeções. O resultado final não deve ser superior a 1%
Coluna	Tempo de retenção	A variação do tempo de retenção deve ser inferior a 2%, face à última injeção para a mesma concentração.
	Área do pico	$CV \leq 1,0 \%$
	Altura do pico	$CV \leq 1,0 \%$
	Resolução do pico	$R_s \geq 1,25$
Detetor	Ruído	Após 30 min de estabilização do sistema e realizando uma injeção, verificar que a oscilação da linha de base não deve ultrapassar os 0,3 volts.
	Desvio (Drift)	A linha de base não deve oscilar em mais de 0,3 volt/h.

Os critérios anteriores também servem de base para a avaliação do desgaste do equipamento provocado pelo uso constante, mas também sempre que ocorra alteração, seja por mudança de fornecedores ou troca de componentes.

Em conclusão, o processo de qualificação é a primeira etapa antes de iniciar a validação analítica e maioritariamente é desenvolvida fora do ambiente laboratorial nomeadamente nas instalações do fabricante, servindo de referência para o técnico analista.

A importância da validação analítica tornou-se mais acentuada, quando na década de setenta, se observou uma enorme variabilidade de resultados de ensaios toxicológicos de

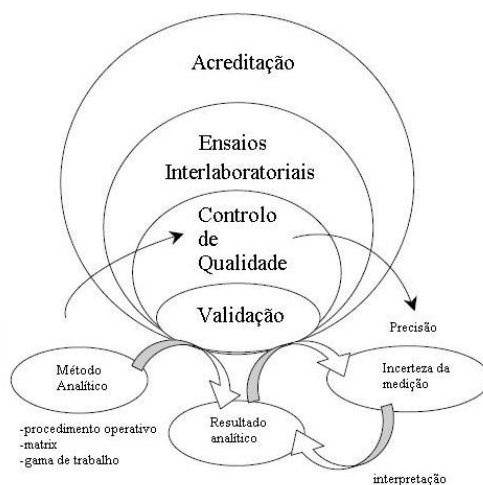


amostras submetidas a ensaios interlaboratoriais pelo governo dos Estados Unidos. A partir de iniciativas de instituições do governo americano como a FDA e EPA e a partir do resultado de estudos para garantir a integridade dos dados laboratoriais que levaram ao estabelecimento de acordos mútuos entre os Estados Unidos da América e a União Europeia e Estados Unidos da América com a comunidade económica Ásia Pacífico, surgiu, em 1978, o documento ISO/IEC 25 (Hoolihan 1999).

O principal objetivo deste programa é a padronização das exigências que os laboratórios devem obter para demonstrar competência na realização do seu serviço de forma a tornar público, internacionalmente, os seus resultados e serem passíveis de reprodução por parte de outros laboratórios.

Contudo, na Europa não foi aceite o referencial ISO/IEC 25 vigorando a norma DIN EN 45001. No entanto ambos os referenciais apresentavam lacunas e ambiguidades, nomeadamente ao nível dos critérios a considerar na declaração da política da qualidade, nas rastreabilidades das medições, entre outros. Iniciando-se em 1995 a revisão de ambos os documentos, através do grupo de trabalho “Working Group 10” da ISO/CASCO, resultando em 1999 e oficialmente publicada em 2000 a norma ISO/IEC 17025.

A norma ISO/IEC 17025 estabelece os critérios com os quais os laboratórios demonstram a sua competência técnica, que possuem um sistema da qualidade efetivo e que são capazes de produzir resultados tecnicamente válidos. Na Figura 2, é indicado a interligação dos diferentes níveis da garantia da qualidade para um laboratório de ensaios (Michael Thompson 1995, EURACHEM 1998, Michael Thompson 2002).



**Figura 2.** Diferentes níveis da garantia da qualidade para um laboratório de ensaios.

A figura anterior pretende resumir todos os níveis que constituem a Qualidade Total. Torna-se indispensável conhecer perfeitamente cada nível, de forma a atingir os objetivos pretendidos no âmbito da qualidade dos ensaios do Laboratório. Neste caso, a validação é a ferramenta adequada para garantir a confiabilidade da metodologia analítica. “Muitas são as normas internacionais (ISO, USP, FDA, AOAC, NATA, ASTM) e sistemas da qualidade (Boas práticas de laboratório IUPAC; ISO/IEC 17025) que requerem a validação de métodos analíticos” (Silva and Alves 2006) e a documentação do trabalho de validação, para a obtenção de resultados confiáveis e adequados ao uso pretendido. Portanto existem fortes razões legais, técnicas e comerciais que justificam a validação de métodos analíticos (Hubert et al. 1999, Sarah K 2005, Hubert et al. 2007).

Por vezes a terminologia validação é confundida com a terminologia verificação. A diferença reside no enquadramento da aplicação dos mecanismos de estudo nas metodologias a avaliar. Métodos normalizados, como os dos compêndios referenciais normativo e outros, “já são métodos validados e não é necessário proceder ao processo completo de validação, desde que não ocorram alterações significativas dos mesmos. Entretanto, a conformidade dos métodos normalizados usados deve ser verificada sob condições reais de uso. É da responsabilidade do analista e do laboratório, verificar se as características de desempenho prescritas no método oficial podem ser obtidas”(Silva and Alves 2006). Por outro lado, para desenvolver uma metodologia analítica e aplicar parcialmente ou alterar significativamente uma metodologia referida num método de referência, é necessário desenvolver todo o mecanismo de validação por forma a garantir a qualidade dos resultados obtidos (Huber 2010).

A validação de um método deve ser adaptada caso a caso, sendo progressivamente mais exigente para as seguintes situações: Extensões e/ou modificações de métodos normalizados; Métodos normalizados utilizados fora do âmbito de utilização prevista; Métodos Não Normalizados; Métodos criados e desenvolvidos pelo próprio laboratório.

Uma questão de suma importância é o delineamento das etapas que compõem o procedimento de validação de um método analítico. A validação de um método considerado de referência, ou mesmo a validação de modificações de métodos de referência (métodos internos do laboratório), requerem uma avaliação prévia dos objetivos para os quais se propõe a sua aplicação.

A aplicação de testes estatísticos como o t de Student, Fisher, Cochran, Grubbs, ANOVA, testes de hipóteses entre outros, facilitam a tomada de decisões, quanto aos dados, menos subjetivas, o que faz com que os processos de validação de métodos analíticos sejam mais objetivos e fáceis de demonstrar e implementar.

A validação de um método analítico deve ser documentada. O procedimento operacional padrão deve ser claro, objetivo “e completo, aprovado e autorizado pelo grupo de garantia da qualidade da empresa. A documentação da validação deve conter ainda, especificação dos requisitos, características de desempenho obtidas, critérios de aceitação dos valores obtidos das características de desempenho em comparação com os requisitos e a afirmação da validade dos resultados quanto ao atendimento das necessidades do problema analítico”(Silva and Alves 2006).

Embora não haja um consenso sobre quais os parâmetros que devem ser considerados num processo de validação de um método analítico, há alguns parâmetros que fazem parte da maioria dos processos de validação (CDER 1994, Michael Thompson 1995, Máire C 1999, Isabel Taverniers, 2004, Ribani et al. 2004, Q2(R1)-Guideline 2005, Papadoyannis and Samanidou 2005).

Em Portugal para efetuar a validação de um método de ensaios as orientações são indicadas no guia OGC001 (IPAC2010), o qual indica que, pode ser necessário e conveniente realizar alguns (ou todos) os estudos abaixo indicados.

Avaliação indireta, com o intuito de evidenciar as seguintes características: estudo dos princípios (fundamentos) teóricos do método para evidenciar a base científica do método; estudos de otimização das condições operatórias e/ou robustez do método para permitir uma otimização e harmonização da sua execução; estudo dos parâmetros característicos do método (por exemplo: campo de aplicação, exatidão, repetibilidade, precisão intermédia, reprodutibilidade, limites de deteção e quantificação, incerteza, etc.), para conhecer a qualidade dos seus resultados.

A validação direta é efetuada por determinação dos seguintes parâmetros: exatidão e tendência (bias), por comparação com referências aceites (RELACRE 2000): comparação com métodos normalizados ou de referência; comparação com padrões ou materiais de referência certificados; comparações interlaboratoriais.

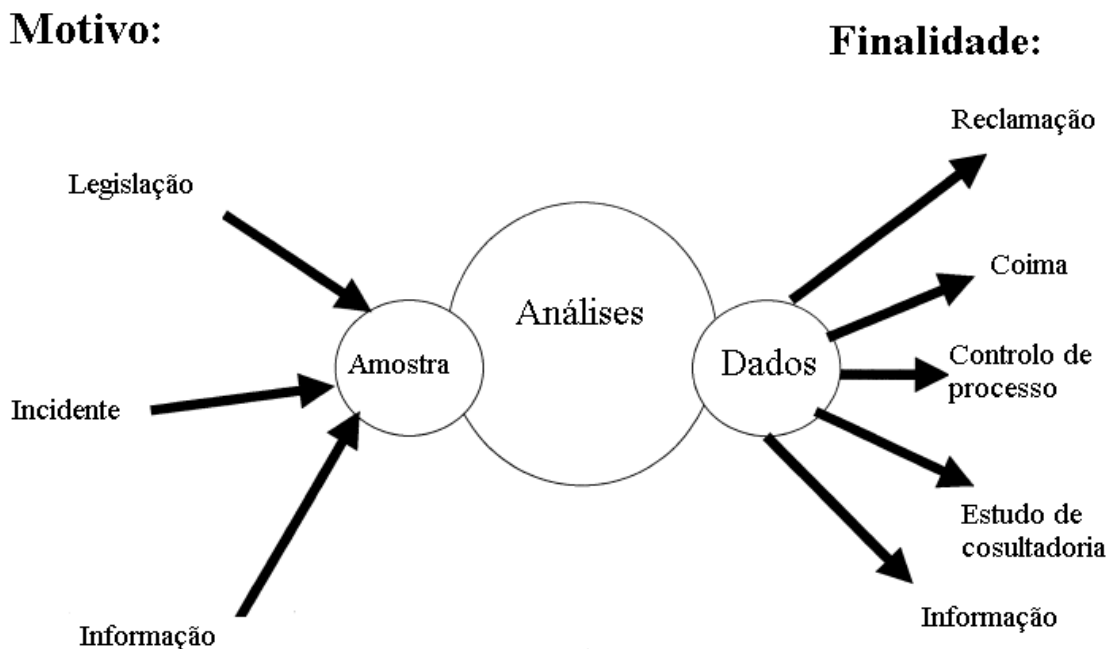
Até ao momento, a descrição da aplicabilidade da validação resume-se a dois contextos: avaliação técnica do equipamento e como exigência técnica das diversas entidades que regulamentam/coordenam o sistema da qualidade a que o laboratório pretende dar resposta. No entanto, há outros enquadramentos da aplicabilidade da validação que se prende com o facto de diariamente, milhões de análises químicas serem executadas no mundo inteiro e cada uma ser realizada com base nos requisitos próprios, desenvolvidos com o intuito de atingir um determinado objetivo, Figura 3 (Máire C 1999). A finalidade preliminar da execução de um ensaio analítico é a obtenção de uma informação relevante (nomeadamente um resultado quantificável ou não) que permitirá posteriormente tomar decisões. Para tal, é necessário que o laboratório:

Ajuste a metodologia analítica ao analito;

Obtenha um resultado analítico com qualidade;

E os dados obtidos sejam comparáveis dentro e fora do laboratório.

Para atingir os objetivos acima referidos é necessário, demonstrar que a escolha da metodologia analítica desenvolvida e aplicada é funcional e consistente.



**Figura 3.** Propósitos de uma medição analítica, adaptado de Mairé (1999).

## ***1. Avaliação dos princípios teóricos do método.***

Para cada uma das fontes emissoras, aplicam-se imposições legais definidas nas Licenças Ambientais, Decretos-lei e/ou Portarias em que se estabelecem os limiares a partir dos quais as emissões de um processo industrial devem ser avaliadas, assim como também a periodicidade da sua avaliação. Em Portugal, o regime de prevenção e controlo das emissões de poluentes atmosféricos, que fixa os princípios, objetivos e instrumentos apropriados à garantia de proteção do recurso natural ar, bem como as medidas, procedimentos e obrigações dos operadores das instalações abrangidas, com vista a evitar ou a reduzir a níveis aceitáveis a poluição atmosférica originada nessas mesmas instalações é estabelecido pelo DL 78/2004.(Decreto Lei 78/04 -Diário da República-I Série-A de 03 de Abril de 2004.)

O artigo 22.º do DL 78/2004 de 3 de abril estabelece que os métodos de medição, recolha e análise das emissões de poluentes atmosféricos por fontes pontuais, serão os fixados em Portarias regulamentares a publicar oportunamente, sem prejuízo da aplicação das normas europeias (CEN) ou nacionais. Assim, a seleção dos métodos de referência decorre das exigências das Diretivas Europeias e Métodos de Referência Europeus que são de carácter obrigatório e que deverão seguir as recomendações do documento de referência “General Principles of Monitoring”, do Bureau Europeu do IPPC, tendo como primeira referência o CEN devendo, no caso de um determinado poluente não ser contemplado com estas Normas, ser selecionados por ordem descendente, os métodos provenientes dos seguintes organismos: ASTM; AFNOR; BSI; DIN; EPA; VDI.

Para além dos requisitos anteriormente referidos, o DL nº 78/2004 obriga, no caso de fontes pontuais sujeitas à monitorização pontual ou em contínuo, à realização, de três em três anos, de uma medição recorrendo a um laboratório externo acreditado.

O IPAC criado em 2004 (DL nº 125/2004), é a entidade que reconhece a competência técnica da uma entidade/laboratório. A acreditação de um ensaio exige, para além da implementação dos requisitos de gestão e avaliação, a implementação dos requisitos técnicos estabelecidos na norma NP EN ISO/IEC 17025 e no referencial normativo do método a acreditar.

Estes referenciais normativos do método são específicos para cada poluente e para uma gama de concentração. Estabelecem linhas orientadoras para a execução da amostragem e

os critérios para sua aceitação/rejeição. Estabelecem também os procedimentos analíticos e respectivos critérios para o laboratório garantir, com 95% de confiança, o resultado obtido.

Os principais critérios que são exigidos nos referenciais dos métodos a implementar são:

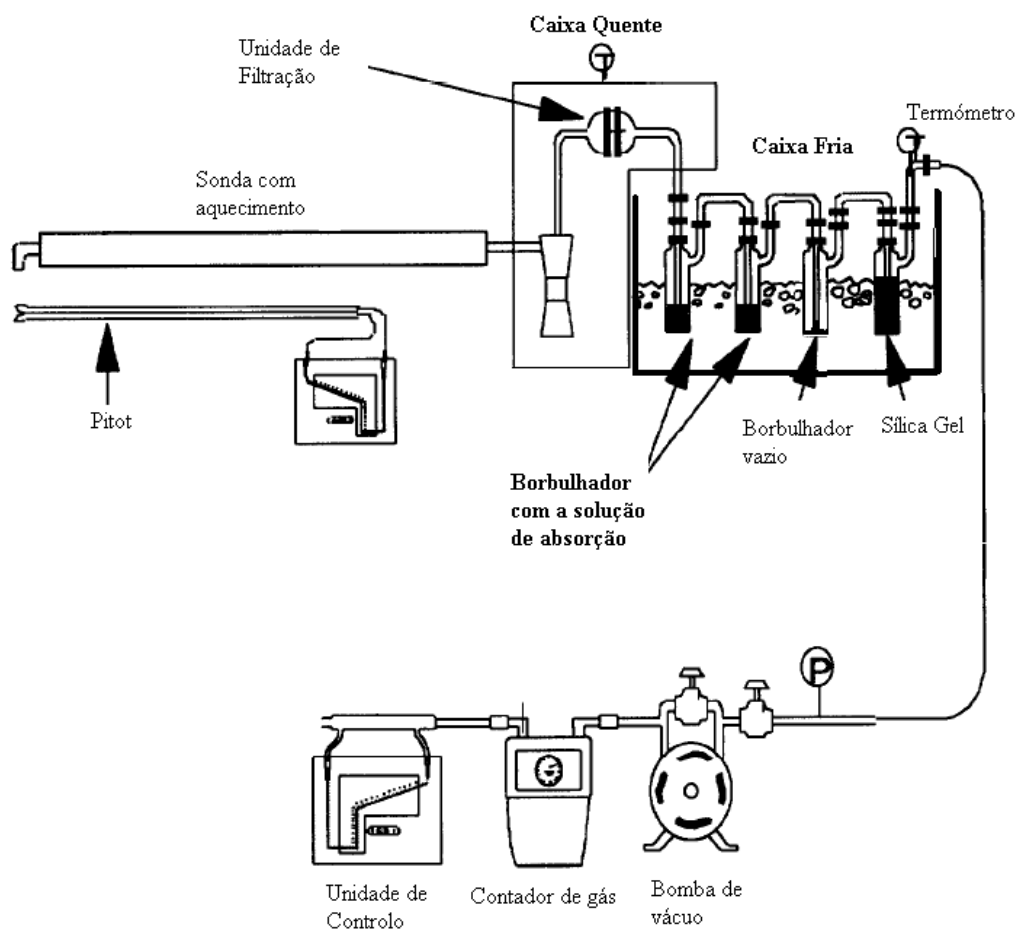
- Para as amostragens: tempo de amostragem, caudal, número de pontos de amostragem, temperatura, volume de amostra, entre outros;
- Para as metodologias analíticas: estudo da linearidade, branco analítico, duplicados, ensaios de recuperação, estimativa da incerteza, determinação do limite de quantificação, entre outros.

Os critérios indicados anteriormente permitem assegurar uma representatividade da colheita de amostras a recolher e assegurar, com uma confiança de 95 %, o teor obtido para o poluente.

Para selecionar a metodologia analítica que permitirá amostrar e quantificar o poluente atmosférico, é necessário ter em atenção que os poluentes atmosféricos se distribuem em duas fases: a fase particulada e a fase gasosa. Estas fases, para o mesmo poluente, apresentam comportamentos diferentes quer em termos de efeitos adversos ao nível da saúde humana e dos ecossistemas, quer na tecnologia associada à sua caracterização, tratamento e remoção/eliminação.

A determinação do HCl, mais precisamente de iões cloreto dissolvidos após a passagem do gás num volume conhecido de solução de absorção, é efetuada com base no referencial (EN1911 2010). A metodologia consiste na recolha de um volume conhecido de gás, que é extraído da conduta ou chaminé durante um certo período de tempo a um caudal controlado e com auxílio de uma sonda aquecida. A fração particulada, que poderá conter compostos de cloro, é retida num filtro a uma temperatura controlada (150 °C), enquanto que a fração gasosa, composta por compostos gasosos de cloro, borbulha em frascos de boro silicato (borbulhadores), a baixa temperatura, contendo um volume de solução de absorção que é 100 mL de água ultrapura. Trata-se, pois, de uma amostragem da fase gasosa em que o poluente é absorvido num meio líquido contido num borbulhador. Posteriormente, as soluções são transferidas dos borbulhadores para frascos de polietileno. A quantificação como HCl é realizada através da cromatografia iónica e os resultados são

expressos em mg de HCl atendendo a que o volume de amostra é de aproximadamente 100 mL. O sistema de amostragem ilustrado é apresentado na Figura 4 (EPA 2010).



**Figura 4.** Constituição do trem de amostragem de HCl em efluentes gasosos, adaptado de EPA (2010).

Com base no referencial EN1911 foi realizada a avaliação dos requisitos técnicos para o desenvolvimento e aplicação da cromatografia iónica como metodologia analítica, nomeadamente a seleção do sistema cromatográfico que foi âmbito de estudo no trabalho de seminário. As primeiras questões que se colocam quando se pretende selecionar uma metodologia analítica em detrimento de outra são a especificidade e a seletividade.

Apesar de definidos com pouca objetividade, ambos os termos estão relacionados com discriminação do analito relativamente a outras substâncias (Aboul-Enein 2000). Geralmente, uma amostra é constituída por analitos a serem quantificados e outros componentes que podem afetar a medição, mas que não se quer quantificar. Por conseguinte, um método diz-se específico quando a resposta obtida é para apenas um

analito presente com outros componentes, ao passo que um método seletivo produz respostas para vários analitos, distinguindo-os uns dos outros além de quantificá-los.

“Os testes de especificidade necessitam de uma pesquisa cuidadosa e do conhecimento disponível na área de aplicação, para que se encontrem todos os componentes a serem testados” (INMETRO 2007).

“Como exemplo, para técnicas cromatográficas, além das comparações visuais de cromatogramas, diferentes parâmetros devem ser calculados nos cromatogramas para descrever a especificidade do método. Os parâmetros mais importantes são: resolução, retenção relativa (fator de separação), fator de capacidade (fator de retenção), fator de simetria e número de pratos teóricos”(INMETRO 2007).

Os testes de seletividade avaliam a existência, na matriz da amostra, de interferentes que afetam o desempenho do detector selecionado, porém sem causar um sinal visível no teste de especificidade. A seletividade é avaliada realizando testes de recuperação. Para tal utilizam-se uma série de amostras, com a mesma matriz, fazendo variar a concentração do analito adicionada, ao longo de toda a gama de trabalho. As amostras poderão ser analisadas em duplicado e em condições de repetibilidade.

Um método analítico pode ser considerado aplicável quando, na prática, e após a realização do teste de recuperação, se verificarem taxas de recuperação próximas dos 100% (80-120%). Estes e outros parâmetros serão abordados nos seguintes itens.

## ***2. Performance Cromatográfica***

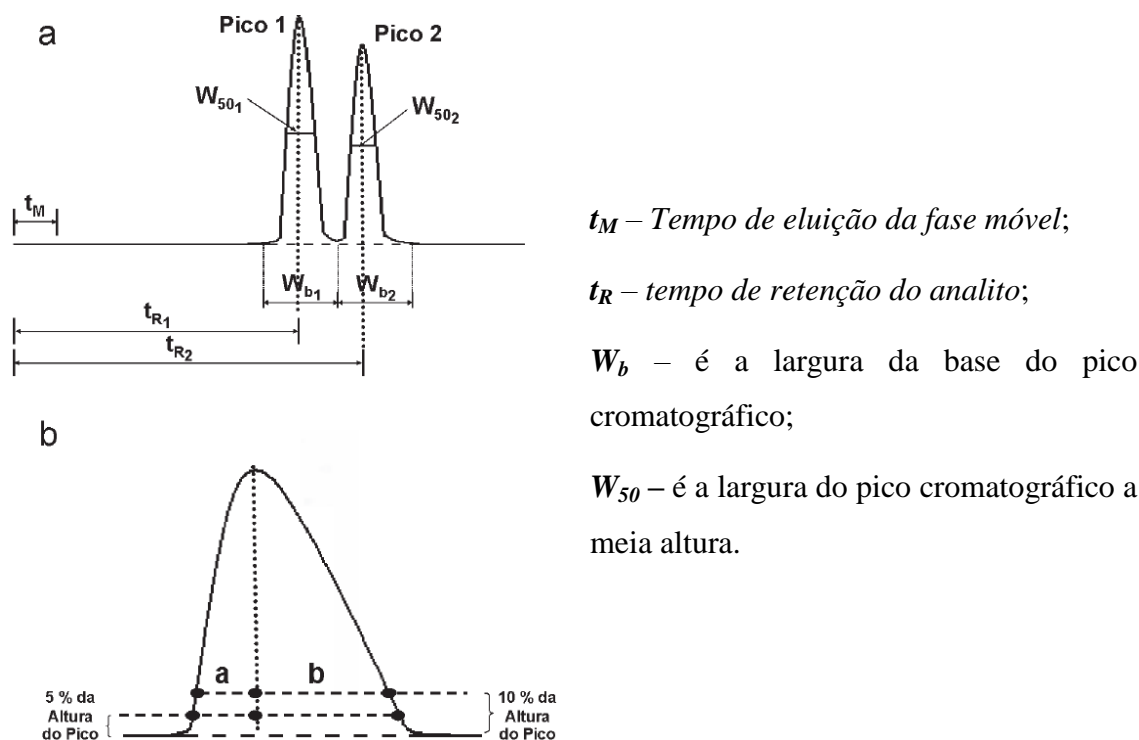
Para métodos cromatográficos e outros métodos, os critérios considerados para a definição da performance esperada têm com base o referencial normativo ISO 13530 (ISO/TS13530 2009) e no guia CITAC/EURACHEM (EURACHEM 1998). A performance é avaliada a partir dos parâmetros cromatográficos.

A eficiência de separação é avaliada cromatograficamente a partir da determinação dos seguintes parâmetros: fator de retenção ( $k$ ), fator de separação ( $\alpha$ ), resolução ( $R_s$ ), número de pratos ( $N$ ) e fator de assimetria ( $A_s$ ). Estes parâmetros são otimizados a partir de estudos ao nível de: 1) fase estacionária (diferentes colunas); 2) fase móvel, experimentando diferentes eluentes desde que compatíveis com a fase estacionária em



estudo e também para o mesmo tipo de eluente, experimentando diferentes concentrações (Sarah K 2005) (Huber 2012).

Na Figura 5 são indicados os parâmetros característicos de definição da *performance* cromatográfica:



**Figura 5.** Medidas obtidas a partir de um cromatograma, adaptado de Paschoal *et al.* 2008.

O tempo de retenção corresponde à medida de tempo, normalmente em minutos, que o analito leva a percorrer o sistema cromatográfico. O tempo de permanência efetivo do analito no sistema cromatográfico, nomeadamente na fase estacionária, é determinado a partir da seguinte relação:

$$t'_R = t_R - t_M$$

As linhas orientadoras da Diretiva 2002/657/EC (Comissão Europeia 2002) o guia AORC (AORC 2011) recomendam que o tempo de retenção efetivo do analito seja duas vezes o tempo de eluição da fase móvel. A seguir, são descritos os parâmetros cromatográficos avaliados na conformidade do sistema e suas respectivas equações (Weiss 1995, Haddad and Jackson 1990).

### 2.1 Fator de retenção ( $k$ )

Também designado por fator de capacidade, é uma medida cromatográfica obtida a partir da razão dos tempos (fator de retenção) ou dos volumes (Fator capacidade) do analito que permanece na fase estacionária ( $t'_R$ ) e na fase móvel ( $t_M$ ) (Weiss 1995).

$$k = \frac{V_R - V_O}{V_O} = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M}$$

O fator de retenção,  $k$ , pode ser determinado por uma das duas metodologias: 1) razão do volume de analito retido na fase estacionária  $V_R$  e o volume morto da coluna.  $V_O$ ; 2) a partir da razão dos tempos:  $t'_R$ , é o tempo gasto desde o momento da injeção até a detecção máxima do pico e  $t_M$  é o tempo gasto pelas moléculas não retidas a percorrer todo o sistema cromatográfico, sendo esta a forma de cálculo mais usual. Valores de  $2 < k < 10$  são considerados ideais mas aceita-se  $1 < k < 20$  (Snyder 1997a).

### 2.2 Fator de separação ( $\alpha$ )

Também designado por fator de retenção relativo ou fator de seletividade. Corresponde à separação em termos relativos de dois componentes que eluem da coluna de forma sequencial e é calculado pela razão entre os fatores de retenção dos dois picos adjacentes (Weiss 1995).

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{k_2}{k_1}$$

Sendo,  $k_2$  o fator de retenção do soluto mais retido e  $k_1$  o fator de retenção do soluto menos retido.

### 2.3 Resolução ( $R_s$ )

A semelhança do parâmetro anterior,  $R_s$  é um parâmetro a partir do qual é estimada a separação de dois componentes consecutivos, sendo calculado a partir da distância que separa os pontos máximos dos picos estimada a partir das larguras da base ou a partir da largura da base a meia altura (Weiss 1995; Haddad and Jackson 1990).

$$R_s = 2 \left( \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{b2} + w_{b1}} \right) = 1,18 \left( \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{50,1} + w_{50,2}} \right)$$

Quando  $R_s = 1$ , os dois picos são razoavelmente separados, com apenas 2 % de superposição das áreas, se as quantidades dos dois componentes forem iguais. Valores de resolução superiores a 1 indicam uma melhor separação, sendo o valor ótimo para  $R_s > 1,5$  o que indica uma separação completa. Na prática, considera-se um pico com boa resolução a partir de  $R_s=1,25$  (Fritz and Gjerde 2009).

#### 2.4 Número de pratos (N)

Corresponde a uma medida adimensional e é um parâmetro que permite avaliar a eficiência da coluna cromatográfica. Permite definir, em termos numéricos, a interação da fase estacionária com cada um dos componentes que constituem a alíquota de amostra a analisar. O cálculo é obtido para cada analito separado pelo meio cromatográfico, a partir do seu tempo de retenção e da largura do pico da linha de base ( $W_b$ ) ou da largura do pico a meia altura do pico ( $W_{50}$ ) (Haddad and Jackson 1990):

$$N = 16 \frac{t_R^2}{w_b^2} = 5,545 \left( \frac{t_R}{w_{50}} \right)^2$$

A eficiência pode ser influenciada por vários fatores, nomeadamente as condições de análise (temperatura), o tamanho da amostra (volume de injeção), o tipo de soluto (pH) e, principalmente, o comprimento da coluna, e sendo este último a componente que dificulta a comparação de  $N$  entre colunas diferentes. “Pelo que, a avaliação comparativa entre colunas é feita com base na altura equivalente a um prato ( $H$ ), que corresponde à razão entre o comprimento da coluna,  $L$ , e  $N$ , eliminando a influência dos diferentes comprimentos da coluna.” (Paschoal et al. 2008).

$$H = \frac{L}{N}$$

#### 2.5 Fator de assimetria ( $A_s$ ) e/ou de alargamento ( $TF$ )

Corresponde a um parâmetro de avaliação da performance dos picos cromatográficos. Os dois parâmetros medem a deformação relativamente a forma gaussiana do pico cromatográfico, a diferença reside na altura do pico que é avaliada a deformação nomeadamente,  $A_s$  calculado a 10% da altura pico e  $TF$  calculado a 5% da altura:

$$A_s = \frac{b}{a} \quad TF = \frac{a+b}{2a}$$

Segundo Snyder (Snyder 1997b), os valores do fator  $A_s$  devem estar compreendidos entre 0,95 e 1,3, sendo admitidos valores de até 1,5. Na Figura 5b mostra-se como é calculada a partir do pico cromatográfico o fator de a assimetria.

## 2.6 Velocidade de eluição

A relação entre a velocidade de eluição com a eficiência da coluna é avaliada pela equação de Van Deemter:

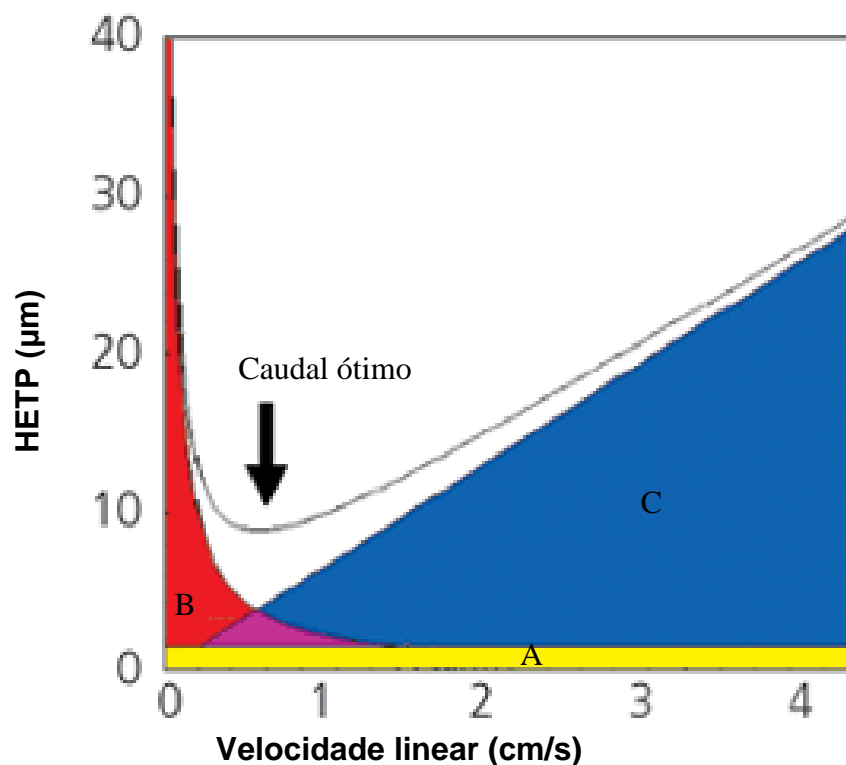
$$H = A + \frac{B}{\mu} + C\mu$$

sendo  $H$  - altura de prato (cm);  $\mu$  - velocidade linear da fase móvel, obtida pela equação:  $\mu = \frac{L}{t_M}$ ;  $A$  - coeficiente do efeito dos caminhos múltiplos;  $B$  - coeficiente de difusão

longitudinal;  $C$  - coeficiente de transferência de massa (Haddad 2008).

O termo  $A$ , refere-se ao alargamento dos picos devido aos diferentes caminhos percorridos pelas moléculas do soluto e não depende da velocidade da fase móvel. Esse termo pode ser minimizado, usando colunas com diâmetro interno reduzido bem recheadas com partículas de tamanho pequeno e uniforme. O termo  $B$ , está relacionado com a difusão molecular do soluto na fase móvel e pode ser minimizado empregando-se altas velocidades lineares da fase móvel. O termo  $C$ , coeficiente de transferência de massa, está relacionado com a facilidade de transferência das moléculas do soluto entre a fase estacionária e a fase móvel. Um fator que minimiza o termo  $C$  é a espessura do filme líquido que recobre as partículas do suporte. Quanto maior for essa espessura, maior será o termo  $C$  e menor a eficiência da coluna.

A Figura 6 (Majors 2006), representa a curva ideal obtida a partir da equação de van Deemter, assim como a contribuição de todos os termos da sua equação. A curva mostra que existe um caudal ótimo, que está relacionado com a velocidade linear da fase móvel ( $\mu$ ), para o qual  $H$  terá um valor mínimo e, conseqüentemente, correspondendo ao valor máximo de eficiência da coluna, que na prática se traduz na obtenção de um pico de eluição estreito.



**Figura 6.** Curvas da equação de van Deemter.

### ***3. Parâmetros analíticos de validação***

Para a garantia da qualidade analítica dos resultados, todos os equipamentos utilizados na validação devem estar devidamente calibrados e os analistas devem ser qualificados e adequadamente treinados. O método analítico deverá ser reavaliado sempre que houver mudanças no mesmo devendo-se, porém, considerar a natureza das mesmas (ISO/IEC17025 2005).

#### ***3.1 Curva de calibração***

O princípio de uma quantificação do analito é relacionar a resposta de um sistema de medida relativamente a uma concentração ou uma quantidade de substância conhecida.

- Processa-se, de uma forma geral, do seguinte modo: preparação de uma série de soluções padrão em que a concentração do parâmetro a dosear é conhecida.
- Medição no equipamento, nas mesmas condições das amostras a analisar. Os padrões de controlo devem ser usados entre séries de 10 amostras e no final do trabalho analítico.

- Realização do gráfico de calibração (sinal do equipamento em função da concentração).

Uma curva de calibração deve basear-se num número mínimo de três pontos experimentais e um branco, que enquadrem o intervalo de concentração da maior parte das amostras que normalmente são ensaiadas. O primeiro ponto da curva deve ter uma concentração idêntica ou próxima do limite de quantificação. Efetua-se o cálculo dos parâmetros da curva, declive ou inclinação e ordenada na origem, a partir dos pontos experimentais, usando o método dos mínimos quadráticos (IPAC2011).

Os resultados devem ser reportados apenas quando estejam dentro do intervalo de interpolação da reta / curva de calibração, admitindo-se extrapolações nos extremos para valores até 10% do intervalo de calibração, salvo se ultrapassar o Limite de Quantificação (LQ).

### **3.2 Gama de trabalho**

“Para qualquer método quantitativo, existe uma gama de concentrações do analito ou valores da propriedade no qual o método pode ser aplicado. No limite inferior da gama de concentração, os fatores limitantes são os valores dos limites de deteção e de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição. Uma gama linear é definida como a série de concentrações na qual a sensibilidade pode ser considerada constante e é normalmente expressa nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico.”(INMETRO 2007). Na prática, o intervalo de trabalho é definido com base no valor de concentração do analito que desejam analisar e depois, a partir da curva de calibração, é determinada a relação entre o sinal e a concentração.

A gama de trabalho pode ser avaliada pelo teste da homogeneidade das variâncias, para métodos que utilizam modelos de calibração lineares. Recomendam-se dez pontos de calibração, não devendo ser em número inferior a cinco, distribuindo-se de igual modo na gama de concentrações. O primeiro e o último padrão são analisados em 10 réplicas independentes (Michael Thompson 2002).

### Teste de Homogeneidade de Variâncias (ISO 8466-1 1990)

Determinam-se as variâncias associadas ao primeiro e último padrão ( $S_1^2$  e  $S_{10}^2$ ) do seguinte modo:

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1} \quad \text{sendo} \quad \bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^{10} y_{i,j}}{n_i} \quad \text{para } i=1 \text{ e } i=10,$$

Sendo: i – o número do padrão (neste caso i vai de 1 a 10); J – o número de repetições efetuadas para cada padrão.

As variâncias são testadas para averiguar se existem diferenças significativas nos limites da gama de trabalho efetuando o cálculo do valor teste PG:

$$\text{a) } PG = \frac{S_{10}^2}{S_1^2}, \text{ quando } S_{10}^2 > S_1^2 \quad \text{e} \quad \text{b) } PG = \frac{S_1^2}{S_{10}^2}, \text{ quando } S_1^2 > S_{10}^2$$

Compara-se este valor de PG com o valor tabelado da distribuição F de *Snedecor/Fischer*, para n-1 graus de liberdade:

- Se  $PG \leq F$ : as diferenças de variâncias não são significativas e a gama de trabalho está bem ajustada.
- Se  $PG > F$ : as diferenças de variâncias são significativas e a gama de trabalho deve ser reduzida até que a diferença entre as variâncias relativas ao 1º e último padrão permitam obter  $PG \leq F$ .

### **3.3 Linearidade**

Define-se como a capacidade de um método analítico em produzir resultados que sejam linearmente proporcionais à concentração do analito nas amostras, para uma dada gama de concentração. A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito (EURACHEM 2011).

A homogeneidade de variâncias não é condição suficiente para garantir a linearidade da resposta, devendo ser utilizados métodos apropriados a este fim (exemplos: coeficiente de correlação e representação gráfica ou estudo de resíduos) (IPAC 2011).

Numa primeira análise, a linearidade pode ser avaliada pela observação do gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito. Posteriormente, deve ser avaliado o modelo que melhor define a relação. O modelo mais aplicado é o da relação linear, determinado pelo método dos mínimos quadrados (ISO 8466-1 1990).

$$y = mx + b$$

Sendo:  $y$  = resposta medida (área do pico, etc.);  $x$  = concentração;  $a$  = declive/coeficiente angular = sensibilidade;  $b$  = interseção com o eixo  $y$ , quando  $x = 0$ .

O coeficiente de correlação linear ( $R$ ) é frequentemente usado para indicar o quanto a reta pode ser considerada adequada como modelo matemático, ou seja, a linearidade pode ser demonstrada pelo coeficiente de correlação da curva de calibração, que não deve ser estatisticamente diferente de 1, observando-se que a inclinação da reta seja diferente de zero. Considera-se:  $R=1$  Correlação Perfeita;  $0,91 < R < 0,99$  Correlação Fortíssima;  $0,61 < R < 0,90$  Correlação Forte;  $0,31 < R < 0,60$  Correlação Média;  $0,01 < R < 0,30$  Correlação Fraca;  $R=0$  Correlação Nula. Na prática aceitam-se retas cujo quadrado do coeficiente de correlação seja superior a 0,995.

A linearidade também é avaliada de acordo com o modelo estatístico da norma ISO 8466-1. A partir de um conjunto de pares ordenados, calcula-se a função de calibração linear, bem como os respetivos desvios padrão residuais  $S_{y/x}$  e  $S_Y^2$ .

A diferença das variâncias ( $DS^2$ ) é calculada pela seguinte equação:

$$DS^2 = (N - 2) * S_{y/x}^2 - (N - 3) * S_Y^2$$

em que  $N$  é o número  $x$  de padrões de calibração.

Calcula-se o valor teste,  $PG$ :

$$PG = \frac{DS^2}{S_Y^2}$$

Compara-se este valor  $PG$  com o valor tabelado da distribuição  $F$  de *Snedecor/Fischer*: se  $PG \leq F$ : a função de calibração é linear; Se  $PG > F$ : a função de calibração é não linear. Neste caso deve-se avaliar a possibilidade de reduzir a gama de trabalho.



Através do método dos mínimos quadrados, os coeficientes **a** e **b** da reta de regressão de y em x,  $y=a+bx$ , são dados por:

$$b = \frac{\sum_{i=1}^N [(x_i - \bar{x}) * (y_i - \bar{y})]}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad \text{e} \quad a = \bar{y} + b * \bar{x},$$

Sendo:  $x_i$  – valores individuais de concentração;  $y_i$  – valores individuais de sinal instrumental;  $\bar{x}$  - média de valores de x (concentração dos padrões utilizados);  $\bar{y}$  - média dos valores de y (sinal instrumental).

Os coeficientes a e b dão uma estimativa da verdadeira função que é limitada pela dispersão inevitável do método. A precisão da estimativa é quantificada pelo desvio padrão residual ( $S_{y/x}$ ) da reta de regressão:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [y_i - (a + bx)]^2}{N - 2}}$$

Este desvio padrão exprime a dispersão dos valores do sinal instrumental em torno da curva de calibração.

Os desvios padrão do declive **b** e da ordenada na origem **a**, são dados por:

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{e} \quad S_a = S_{y/x} * \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N x_i^2}{N * \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}}$$

e podem ser usados para calcular os limites de confiança de a e b:

$$a \pm t * S_a \quad \text{e} \quad b \pm t * S_b$$

sendo t o valor da variável de *Student* para o nível de confiança desejado e (N-2) graus de liberdade.

A utilização de *software*, como a folha de cálculo “*Microsoft Excel*”, permite calcular facilmente os parâmetros estatísticos aqui citados.

### **3.4 Sensibilidade**

“A sensibilidade é um parâmetro que fornece a variação da resposta em função da variação da concentração do analito isto é, indica quanto o método é sensível a variações nas concentrações. Se o método identificar pequenas variações de concentração do analito pode-se dizer que o método é sensível até esse nível de concentração. Matematicamente, a sensibilidade pode ser expressa pelo coeficiente angular da equação da regressão linear da curva de calibração, conforme indicada a seguir e é determinada simultaneamente com os testes de linearidade. A sensibilidade depende da natureza do analito e da técnica de detecção utilizada” (Alcaide 2011).

$$Sensibilidade = \frac{\Delta L}{\Delta C}$$

sendo:  $\Delta L$  – variação da resposta;  $\Delta C$  – variação da concentração.

### **3.5 Limites de detecção e de quantificação**

#### **3.5.1 Limite de Detecção**

As orientações estabelecidas pelo IPAC indicam que deve ser avaliada a aplicabilidade da indicação do limite de detecção (IPAC2010).

“O limite de detecção do equipamento (LDE) é considerado como a concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes a razão sinal/ruído do equipamento.”(INMETRO 2007).

“O limite de detecção do método (LDM) é definido como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero. Na determinação do LDM o branco (matriz sem analito) é sujeito ao mesmo procedimento analítico” (IPAC 2011).

“O método analítico deve ser especificado e o LDM de cada analito deve ser expresso nas unidades apropriadas, em concordância com o método analítico e identificado para a matriz da amostra.” (INMETRO 2003).

Quantitativamente o limite de detecção (LD) é obtido, para cada uma das seguintes situações, pelas equações (IPAC 2011):

#### a) Caso geral

$$LD=X_0+K*\sigma_0,$$

sendo:  $X_0$  – a média aritmética do teor medido de uma série de brancos ou padrões vestígio (entre 10 e 20 ensaios), preparados de forma independente e lidos ao longo de vários dias de trabalho isto é, reproduzindo o mais possível a situação de rotina;  $\sigma_0$  – o desvio padrão associado a  $X_0$ .

Se a lei de probabilidade de  $X_0$  é suficientemente conhecida e assumindo uma distribuição normal, então toma-se o valor  $K\approx 3,3$  para um nível de confiança de cerca de 99,7% ou  $K\approx 2$  para 95%. Logo  $LD\approx X_0+3,3*\sigma_0$  ou  $LD\approx X_0+2*\sigma_0$

b) Caso em que o método envolve a utilização de uma calibração linear

$$LD = \frac{3,3 * S_{y/x}}{b},$$

Sendo:  $S_{y/x}$  – é o desvio padrão residual da curva de calibração,  $b$  – é o declive da mesma.

Muitos laboratórios de ensaios (químicos, microbiológicos) estão também envolvidos em ensaios de monitorização ambiental. Em muitos casos, a Agência Portuguesa do Ambiente, a Direção Regional de Saúde e outras entidades, estabelecem os valores máximos admissíveis de poluentes que as amostras podem conter. Frequentemente, os resultados dos laboratórios indicam que nenhum poluente em particular foi detetado. Esta informação é inútil se o limite de deteção do método for superior ao limite estabelecido pela entidade reguladora. Por conseguinte a escolha da metodologia também deve ter em atenção este parâmetro de validação.

### 3.5.2 Limite de Quantificação (LQ)

Corresponde à menor concentração medida a partir da qual é possível a quantificação do analito (IPAC2011), com uma determinada exatidão e precisão. É determinado por:

a) Caso geral

$$LQ=X_0+10*\sigma_0$$

sendo:  $X_0$  – é a média aritmética do teor medido de uma série de brancos (entre 10 e 20 ensaios), preparados de forma independente e lidos ao longo de vários dias de trabalho, isto é reproduzindo o mais possível a situação de rotina;  $\sigma_0$  – representa o desvio padrão associado a  $X_0$ .

b) Caso do padrão vestígio, branco fortificado ou 1º padrão da curva de calibração

Poder-se-á utilizar para estimar o LQ um conjunto de padrões (vestígio, brancos fortificados ou resultados do 1º padrão da curva), independentes, testados em condições de precisão intermédia e sobre os quais são feitos estudos de exatidão/veracidade (avaliada através do erro relativo) e precisão/fidelidade (avaliada através do coeficiente de variação). Adotar-se-á como estimativa do LQ a concentração utilizada, desde que os parâmetros de controlo sejam inferior ou igual a 10%.

c) Caso em que o método envolve a utilização de uma calibração linear

$$LQ = \frac{10 * S_{y/x}}{b}$$

sendo:  $S_{y/x}$  – o desvio padrão residual da curva de calibração,  $b$  – o declive.

Este limite, após ter sido determinado, deve ser testado para averiguar se a exatidão e a precisão conseguidas são satisfatórias

Este limite é utilizado frequentemente e preferencialmente nos relatórios de ensaio, devendo ser identificado e quantificado de forma clara.

A atualização destes limites (LQ e LD) deverá ser efetuada sempre que: a) ocorram alterações de fatores de influência tais como analistas, reagentes, equipamentos, ambiente, entre outros; b) a calibração é realizada em cada secção de trabalho.

### **3.6 Precisão/fidelidade**

O estudo da precisão/fidelidade, pretende avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre a mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas (VIM 2008).

Com base no documento (Isabel Taverniers, 2004) a precisão é definida a partir do desvio padrão ( $\delta$ ) ou a partir do desvio padrão relativo (RSD) que não é mais do que o coeficiente de variação. Para a validação, a avaliação da precisão deve ser realizada, numa primeira fase, em condições de repetibilidade, isto é, ensaios realizados nas mesmas condições para a mesma alíquota de analito e, numa segunda fase, como continuidade da avaliação da metodologia, o ensaio de precisão deve ser realizado em condições de precisão intermédia.

O limite de RSD admitido depende da gama de concentração dos analitos sendo admitidos resultados entre 1 a 30 %. São considerados RSD's até 30% para concentrações vestigiais (da ordem dos ppb's) e de 1% para concentrações muito elevadas.

Em auditorias de requisitos técnicos do IPAC e para a metodologia em causa, considera-se aceitável RDS da ordem dos 10 %.

Segundo o guia de Eurachem (EURACHEM 2011) a precisão é avaliada através de repetibilidade, precisão intermédia ou reprodutibilidade. A seguir são delineados os procedimentos recomendados para cada um dos parâmetros:

### 3.6.1 Repetibilidade / Fidelidade em condições de repetibilidade

Exprime a precisão de um método de ensaio efetuado em condições idênticas, isto é refere-se a ensaios realizados sobre a mesma amostra, em condições tão estáveis quanto possíveis (mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo tipo de reagentes e curtos intervalos de tempo).

Para determinar a repetibilidade no próprio laboratório efetua-se uma série de medições sobre a mesma amostra ou amostras idênticas ( $n \geq 10$ ). Caso se justifique, este procedimento é repetido sobre uma série de amostras, em vários níveis de concentração abrangendo todo o domínio de aplicação do método.

### 3.6.2 Reprodutibilidade

Refere-se à precisão de um método efetuado em condições de ensaio diferentes, utilizando o procedimento de medição diferentes, sobre uma mesma amostra.

### 3.6.3 Precisão Intermédia / Fidelidade intermédia

Refere-se à precisão de um método efetuado em condições de ensaio diferentes, utilizando o mesmo procedimento de medição, sobre uma mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, nomeadamente: diferentes analistas, diferentes equipamentos; diferentes épocas; com ou sem verificação da calibração.

Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da dispersão dos resultados num laboratório e, como tal, indicativa da robustez do método.

Ambos os parâmetros podem se estimados a partir do desvio-padrão, variância ou coeficiente de variação (CV%) das diferentes medidas. O coeficiente de variação ou também designado por desvio padrão relativo (RDS) é o mais aplicado uma vez que traduz em termos relativos o comportamento da precisão para uma gama restrita de concentração.

$$CV\% = \frac{\delta}{X} * 100$$

Sendo:  $\delta$  - desvio padrão; X - concentração média determinada. Na prática aceitam-se CV inferiores ou igual a 10%.

#### ***4. Avaliação direta***

A avaliação direta não é mais do que avaliar a exatidão/veracidade do método de ensaio (VIM 2008). A exatidão de um método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como convencionalmente verdadeiro. A avaliação da exatidão de um método é efetuada com recurso a materiais de referência, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação.

##### **4.1 Materiais de referência certificados (MRC)**

Material de Referência (MR), segundo definição da ISO Guide 30, é um material ou substância homogênea que tem uma ou mais propriedades bem estabelecidas para ser usado na calibração de um equipamento, na avaliação de um método de medição ou atribuição de valores a materiais.

O material de referência certificado (MRC) sempre é acompanhado de certificado de análise, mencionando os valores das grandezas de interesse com as respetivas incertezas e a sua certificação é realizada utilizando metodologias primárias ou intercâmbios laboratoriais. A análise de um MRC permite avaliar o desempenho do Laboratório. O valor obtido na análise de um MRC deve ser comparado com o valor certificado, determinando-se o erro e exatidão/veracidade do resultado. Quando o valor obtido não se encontrar dentro do intervalo de incerteza indicado para o valor certificado, o laboratório deve proceder à análise de causas desse desvio e, se necessário, às subsequentes ações corretivas.

## **4.2 Ensaio interlaboratoriais**

Nos últimos 10 anos, tem sido grande a evolução no que diz respeito à harmonização dos requisitos de qualidade aplicados nos ensaios interlaboratoriais (Michael Thompson 2002). Em Portugal, a entidade que gere e executa ensaios de comparação interlaboratorial é o IPQ/RELACRE.

Com vista à uniformização dos critérios/protocolos de execução dos ensaios, a entidade IUPAC desenvolveu um protocolo ao nível do tratamento estatístico dos dados, da classificação a atribuir, do número de voltas (“rounds”) de cada ECI, entre outros, com vista a emitir um relatório com dados robustos e que vá de encontro à realidade do conjunto de laboratórios que concorrem aos ensaios.(Michael Thompson 2006).

Em Portugal o IPQ considera a participação dos laboratórios acreditados (ou candidatos) em ensaios de comparação interlaboratorial como um mecanismo importante para avaliar a respetiva competência técnica e para monitorizar a integridade dos resultados dos seus ensaios e calibrações. Assim, é obrigatória a participação dos laboratórios em exercícios de comparação interlaboratorial para a totalidade do âmbito acreditado ou a acreditar. O incumprimento deste requisito só é aceite se for demonstrada a inexistência de exercícios a nível nacional ou internacional.

São considerados os seguintes tipos de ensaios (IPAC 2011):

ECI – Exercícios de Comparação Interlaboratorial (em inglês, “Interlaboratory comparison”): “Organização, realização e avaliação de medições ou ensaios do mesmo (ou similares) item por dois ou mais laboratórios, de acordo com condições pré-definidas” (ISO/IEC 17043). Existem vários tipos de comparações (ou ensaios) interlaboratoriais, consoante os fins a que se destinam, nomeadamente:

- Ensaios de certificação, permitem fixar o “valor verdadeiro” de um material com uma determinada incerteza, nomeadamente para os materiais de referência;
- Ensaios de normalização de métodos, destina-se a estudar as características de um método de análise, nomeadamente a sua reprodutibilidade e repetibilidade. A abrangência de aplicação dos ensaios é exclusiva a uma única metodologia;
- Ensaio colaborativo, permite definir os requisitos / critérios de controlo de suporte de um método de análise;

- Ensaio comparativo, permite comparar os resultados obtidos por vários métodos de análise;
- Ensaio de consenso ou conformidade, determina o valor a utilizar como “valor verdadeiro” nomeadamente para especificações de produto.
- Ensaio de avaliação do desempenho dos laboratórios, (em inglês, “Proficiency test”): “Avaliação do desempenho dos participantes face a critérios pré-estabelecidos, por meio de comparações interlaboratoriais” (ISO/IEC 17043). Os ensaios de aptidão constituem um caso particular das comparações interlaboratoriais, em que o objetivo principal é a avaliação do desempenho dos participantes.

Resumidamente, quando o laboratório pretende avaliar a repetibilidade e a reprodutibilidade de um método, demonstrando em simultâneo que tem uma precisão/fidelidade compatível com a de outros laboratórios, pode recorrer a um ensaio do tipo de normalização. Quando tem por objetivo evidenciar a exatidão/veracidade dos seus resultados, então pode participar em ensaios do tipo de aptidão.

O IPQ reconhece como organizadores competentes:

- O ILAC e outras estruturas congregadoras de organismos de acreditação como a APLAC.
- Os organismos nacionais de acreditação e outros organismos signatários dos acordos de reconhecimento mútuo (para ensaios e calibração) da EA e do ILAC.
- Os Laboratórios Nacionais de Metrologia.
- Entidades Nacionais que a experiência demonstre fornecerem serviços adequados, nomeadamente a RELACRE.
- Outras entidades nacionais que possuam atribuições legais nesta matéria, por exemplo INSA.

O IPQ aconselha ainda a consulta da base de dados EPTIS para a pesquisa de ensaios de aptidão.

O desempenho dos laboratórios na participação nos ensaios de aptidão e nos ensaios de comparação interlaboratorial é avaliada durante as auditorias sendo exigido que os laboratórios disponham de critérios de aceitação apropriados e de procedimentos para,



atempadamente, investigar as causas de desempenho insuficiente ou inaceitável, implementar as ações corretivas associadas e o tratamento de trabalho não conforme. O laboratório deverá garantir que não utiliza o estatuto de entidade acreditada para qualquer ensaio e calibração que possam ser afetados pelas causas do desempenho insatisfatório até a implementação das ações corretivas. O IPQ nos casos em que entender que o desempenho do laboratório faz duvidar da integridade dos resultados de ensaio poderá suspender a acreditação para os itens afetados.

Como se efetua a avaliação do desempenho de um laboratório num ensaio interlaboratorial? A partir da análise dos resultados de todos os participantes é calculado o Z-Score e o erro normalizado.

#### 4.2.1 Fator de Desempenho (“Z-score”)

$$Z = \frac{(X_{lab} - X_v)}{\delta},$$

Sendo:  $X_{lab}$  – valor obtido experimentalmente (ou a média aritmética de valores obtidos);  $X_v$  – valor aceite como verdadeiro, ou seja, o valor médio de todos os participantes exceto os *outliers*;  $\delta$  – desvio padrão.

A avaliação poderá ser feita de acordo com a seguinte escala de pontuação:  $|Z| \leq 2$ : satisfatório;  $2 < |Z| \leq 3$ : questionável;  $Z < -3$  ou  $Z > 3$ : insatisfatório. O fator de desempenho é função da unidade de desvio adotada, isto é, poder-se-á utilizar outra escala de pontuação que não a citada anteriormente.

#### 4.2.2 Erro Normalizado

Caso o laboratório calcule a incerteza do seu resultado ( $U_{lab}$ ), o valor verdadeiro ( $X_v$ ) deve estar dentro do intervalo de incerteza de  $X_{lab}$ . Quando tal não acontece, este intervalo poderá estar subestimado. Nestes casos, é geralmente empregue o conceito de erro normalizado (En) para efetuar a avaliação do desempenho:

$$En = \frac{(X_{lab} - X_v)}{\sqrt{U_{lab}^2 + U_{ref}^2}}$$

sendo:  $U_{ref}$  – incerteza associada ao valor verdadeiro.

Se  $|En| \leq 1$ , então  $U_{lab}$  está bem estimada.

Sempre que nos processos de avaliação utilizados não se verificarem as condições satisfatórias, deverá ser realizada uma análise de causas e elaborado um plano de ações corretivas (se aplicável), de forma a fazer uma reavaliação do ensaio.

A periodicidade da análise de ECI's deve ser estipulada em função da frequência de análises efetuadas, de estas serem de rotina ou de carácter pontual, do grau de conhecimento das amostras, da complexidade das técnicas e do grau de confiança exigido para o resultado. O IPAC estabelece como critério mínimo de frequência (IPAC2012): uma participação representativa e satisfatória (e.g. por tipo de produto, parâmetro e técnica) do âmbito a acreditar antes da concessão (ou extensão); uma participação representativa (e.g. por tipo de produto, parâmetro e técnica) do âmbito acreditado durante cada ciclo de acreditação.

#### **4.3 Ensaio de recuperação**

A recuperação passa pela avaliação da adição a amostra de uma quantidade conhecida de analito (*spike*). O analito pode ser adicionado às amostras em pelo menos três diferentes concentrações, por exemplo, próximo do limite de deteção, próximo da concentração máxima permissível e numa concentração próxima da média da faixa de uso do método. A limitação deste procedimento é a de que o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que o presente na amostra.

O estudo de recuperação consiste na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse, seguida pela determinação da concentração do analito adicionado. É também chamado de processo de fortificação.

A quantidade percentual recuperada pelo processo pode ser calculada através da equação:

$$\frac{(\text{Concentração da amostra fortificada}) - (\text{Concentração da amostra})}{\text{Concentração conhecida adicionada}} * 100\%$$

No caso de a amostra ter um teor inferior ao limiar analítico, calcular a % de recuperação substituindo a concentração da amostra por zero e pelo limiar analítico, expressando o resultado na forma de intervalo.

O critério de aceitação para a % recuperação é de 80-120 %, (SMEWW 2010).

## 5. Incertezas

Decisões relacionadas com a produção industrial, assim como, decisões legais são muitas vezes baseadas em resultados de ensaio. Essas decisões podem envolver grandes quantias de dinheiro ou até pôr em causa a liberdade de uma pessoa. Portanto, o conhecimento da fiabilidade dos resultados de ensaio é importante, não só para o analista, como para os seus clientes e para os que têm de tomar decisões com base nos mesmos. Que confiança pode ser depositada nos resultados, que indiquem que um produto é insatisfatório ou que uma pessoa cometeu uma irregularidade? Alguns laboratórios de ensaios, não sabem qual a confiança que podem colocar nos seus resultados e por conseguinte, de uma má interpretação de diferenças não significativas resultam incorretas decisões de negócio.

Quando os analistas avaliam os resultados podem estar face a uma larga lista de possíveis fontes de variação, algumas causando desvios sistemáticos nos resultados e sendo outras de natureza aleatória. É necessário conhecer previamente a dimensão destas variações, para cada método de ensaio e para os níveis de analito mais usuais, para que o analista possa definir se o método e os resultados são adequados a uma dada utilização.

Os erros identificados devem ser corrigidos no resultado (a menos que isso não esteja convencionado para o método). As restantes componentes de variação devem ser avaliadas para que a incerteza global seja estimada.

A norma ISO/IEC 17025 (1999), define os requisitos gerais de competência para laboratórios, estabelece que “Os laboratórios de ensaio devem ter e aplicar procedimentos para estimar a incerteza da medição. Em certos casos, a natureza do método de ensaio pode excluir um cálculo rigoroso, metrológica e estatisticamente válido, da incerteza da medição. Nestes casos, o laboratório deve, no mínimo, tentar identificar todos os componentes da incerteza e fazer uma estimativa razoável, garantindo que o modo de apresentação do resultado não dê uma ideia errada da incerteza. Uma estimativa razoável deve basear-se no conhecimento do desempenho do método e do âmbito da medição e deve recorrer, por exemplo, à experiência adquirida e aos dados de validação anteriores.”

Qual o significado do termo incerteza? Segundo o documento VIM – Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM 2008) “Parâmetro associado ao resultado de medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos à mensuranda.” Considerando-se como parâmetro, por exemplo, um desvio padrão (ou um

dado múltiplo dele), ou a metade de um intervalo para um determinado nível de confiança. O termo mensuranda, é designado pelo VIM como a grandeza particular submetida à medição.

Existem publicadas, várias abordagens para a estimativa da incerteza e/ou variabilidade num ensaio. A norma ISO/IEC 17025 não especifica nenhuma abordagem em particular. Os laboratórios são encorajados a usar abordagens estatisticamente válidas. Todas abordagens que forneçam uma estimativa razoável, e que sejam consideradas válidas dentro de uma área técnica relevante, são igualmente aceitáveis e nenhuma abordagem é favorecida em detrimento de outra.

Os guias (IPAC 2007, EURACHEM/CITAC 2000 e EuroLab 2007) estabelecem como linhas orientadoras as seguintes metodologias de quantificação da incerteza:

Metodologia subanalítica consiste numa abordagem componente a componente, vulgarmente designada “passo a passo”.

Metodologia supra-analítica a abordagem é baseada nos dados de controlo da qualidade obtidos em condições de precisão intermédia.

Metodologia supra-laboratorial, a abordagem é baseada na informação obtida a partir dos dados dos ensaios interlaboratoriais.

Contudo, existe outro documento, designado por (Nordtest 2003) que estabelece como linhas orientadoras uma metodologia baseada na conjugação de dados de controlo qualidade e dados dos ensaios interlaboratoriais.

A escolha da metodologia de cálculo dependerá da informação disponível, bem como, os objetivos a serem atingidos, nomeadamente, garantias de um resultado face a uma imposição legal, ou porque não; garantia de um resultado para demarcar o laboratório numa sociedade cada vez mais concorrencial.

Para o método em causa: determinação de HCl em amostras de efluentes gasosos, a metodologia selecionada é com base nos dados de controlo qualidade. Esta abordagem consiste na combinação das incertezas associadas à fidelidade (anteriormente denominada precisão) e a veracidade da medição (anteriormente denominada exatidão) do método.

### **5.1 Incerteza associada à variabilidade/fidelidade do método de ensaio (uvar)**

A componente de fidelidade, é calculada a partir de uma das duas fontes de informação (IPAC 2007):

#### **5.1.1 Através dos padrões de controlo**

Para cada gama de trabalho aplicar a seguinte equação:

$$u_{\text{fidelidade}} = \frac{S_{\text{Padrão controlo}}}{\frac{\sqrt{n}}{\bar{x}_{pc}}},$$

Sendo  $S_{\text{padrão controlo}}$  – desvio padrão de uma série de ensaios do padrão de controlo;  $n$  - em condições de precisão intermédia será igual à dimensão do subgrupo da amostragem considerada, isto é, para valores individuais  $n=1$ ;  $n$  - em condições de repetibilidade será igual ao nº de ensaios efetuados;  $\bar{x}_{pc}$  - média experimental de uma série de ensaios do padrão de controlo.

Para o nível de concentração correspondente ao limite de quantificação:

$$u_{\text{fidelidade}} = \frac{\text{c.a.}}{\sqrt{3}},$$

Sendo c.a. = critério de aceitação do limiar analítico.

#### **5.1.2 Através dos duplicados de amostra**

Componente de variabilidade/fidelidade é calculada aplicando a seguinte equação:

$$u_{\text{var}} = \frac{\bar{R}}{d_2},$$

Sendo  $\bar{R}$  - Amplitude média relativa;  $d_2$  - 1,128 para duplicados ( $n=2$ ).

### **5.2 Incerteza associada à justeza da medição**

A metodologia utilizada para quantificar a justeza da medição do método, depende dos recursos disponíveis e do tipo de método de ensaio em causa (IPAC 2007).

### 5.2.1 Através da análise de materiais de referência certificados (MRC):

Quando a justeza da medição do método é estimada através da análise de materiais de referência certificados, a recuperação média do método,  $\overline{R}_m$  é:

$$\overline{R}_m = \frac{\overline{c}_{obs}}{c_{MRC}}$$

Sendo:  $\overline{c}_{obs}$  - concentração média de uma série de análises do MRC;  $c_{MRC}$  - valor certificado do MRC.

A incerteza padrão associada a  $\overline{R}_m$  é dada por:

$$u(\overline{R}_m) = \overline{R}_m * \sqrt{\left(\frac{s_{obs}^2}{n * \overline{c}_{obs}^2}\right) + \left(\frac{u_{c_{MRC}}}{c_{MRC}}\right)^2}$$

Sendo:  $s_{obs}$ - desvio padrão da série de análises do MRC; n - número de análises do MRC;  $u_{(c_{MRC})}$ - incerteza padrão associada ao teor certificado do MRC (referenciada no certificado do MRC).

Muitas vezes a incerteza associada ao teor do MRC é desprezável, não sendo necessário considerar o último termo da equação anterior.

Quando o laboratório tem disponíveis resultados da análise de diversos MRC, pode substituir o  $(s_{obs}^2 / n * \overline{c}_{obs}^2)$ , pela variância associada às recuperações individuais estimadas a dividir pelo número de ensaios realizados,  $(s_R^2 / n)$  que estima a variância associada à recuperação média.

### 5.2.2 Através de ensaios de recuperação

Componente de justeza da medição, calculada através dos resultados dos ensaios de recuperação sobre amostras distintas:

$$u_{\text{justeza medição}} = \frac{s}{\overline{R} * \sqrt{n}}$$

Sendo: n – N° de ensaios de recuperação; s – Desvio padrão dos n ensaios de recuperação;  $\overline{R}$  - Recuperação média de n ensaios.

### **5.3 Incerteza combinada**

$$u_c = C \sqrt{u_{fidelidade}^2 + u_{justeza}^2}$$

Sendo: C – Concentração do analito na amostra.

### **5.4 Incerteza expandida**

$$U = k u_c$$

Sendo: k - Fator de expansão (k=2, para um grau de confiança de 95% e considerando uma distribuição normal).

Quando se apresenta a incerteza da medição é recomendado que seja segundo o formato descrito no GUM, nomeadamente especificar o nível de confiança e o fator de expansão usado para calcular a incerteza expandida.

**RESULTADOS DA VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA DE  
DETERMINAÇÃO DE HCL EM AMOSTRAS DE EFLUENTES GASOSOS**



Neste capítulo são apresentados os resultados da validação do método de quantificação de HCl em amostras de efluentes gasosos.

Estabelecer um bom procedimento de validação requer um compromisso entre validar rápido, e com um número adequado de análises, sem perder a qualidade das estimativas, o que é um desafio na rotina de um laboratório devido às restrições de tempo, custo e potencial instrumental (Ribeiro 2008). Na busca deste compromisso, a existência de ferramentas que permitam a estimativa dos parâmetros de validação de maneira rápida e segura são de grande utilidade. Existem disponíveis atualmente no mercado diversos *softwares* comerciais para validação de métodos, como o *EffiValidation*, o *Method Validation Pack* da Agilent e o *Validation Manager*, entre outros.

No entanto, para o avanço deste trabalho desenvolveram-se folhas de cálculo do *Microsoft Office – Excel* como alternativa aos *softwares* comerciais. A folha de cálculo foi desenvolvida de forma a permitir a rápida estimativa dos parâmetros de validação, cabendo ao usuário apenas introduzir as informações referentes ao sinal analítico e às concentrações das espécies (Ribeiro 2008).

## **1. Sistema Cromatográfico**

As análises cromatográficas foram realizadas num cromatógrafo *Shimadzu série VP*, com pré coluna e coluna da *Dionex* com as referências *IonPac AG 14A 4\*50mm* e *IonPac AS14A 4\*250mm*, respetivamente.

O eluente  $\text{NaHCO}_3$ , 1,0 mM e  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 8,0 mM é eluído de forma isocrática, isto é, a concentração é constante ao longo do tempo de análise. Como se trata de um ácido fraco ( $\text{pK}_a < 5$ ), ao ser aplicado como eluente origina espécies iónicas de elevada condutância que camuflam a condutância baixa do ião a analisar. Esta situação é ultrapassada pela aplicação de um supressor *Dionex ASRS – ultra II 4 mm* que, por supressão química, converte os iões do eluente em espécies de condutância baixa ou nula através da passagem por contra corrente de ácido sulfúrico 50 mN.

A deteção é obtida por um detetor de condutividade – *célula CDD 6A da Shimadzu*. Estas e outras características encontram-se descritas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Condições gerais de operação do equipamento.

Componente	Características operacionais														
Bomba	Caudal: 0-9,999 ±0,02 mL/min. Pressão: 1,0-40,1 ± 0,098 MPa.														
	Pulsação:	48 para a água. 40 para o Metanol. 20 para o Hexano.													
Injetor	Válvula de 6 Vias. Volume do Loop: 50 µL.														
Colunas	Pré Coluna	Coluna													
	Dimensões: 4*50 mm Capacidade: 24 µeq	Dimensões: 4*250 mm Capacidade: 65 µeq													
	pH: 2-11. Pressão máxima de operação: 27,6 MPa (4000 psi / 276 bar). Diâmetro interno: 9,0 µm. Tamanho da porosidade do enchimento: 100 Å. Diâmetro das partículas da fase estacionária: 7 µm. Caudal máximo: 3 mL/min.														
Supressor	Dimensões: 4 mm. Temperatura: 15-35 °C. Pressão: 30-40 psi. Caudal máximo: 3 mL/min. Concentração máxima do Eluente NaHCO <sub>3</sub> / Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> : 25 mN a um caudal 1 mL/min. Regenerante H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> de 50 mN a um caudal constante ente 5 a 10 mL/min. A diferença entre a pressão a montante do supressor e a jusante do mesmo deve se inferior a 40 psi.														
Detetor	Volume da célula: 0,25 µL. Constante da célula: 25 cm <sup>-1</sup> . Background para o eluente 1,0 mM NaHCO <sub>3</sub> +8,0 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> sem supressão: 200-400 µS/cm. Background para o eluente 1,0 mM NaHCO <sub>3</sub> +8,0 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> com supressão: 60-90 µS/cm. Drift: 0,025 µS/cm/h e 0,025 µS/cm/°C. Ganho na leitura de 10; 1; 0,1 mV/µScm <sup>-1</sup> que corresponde a um sinal de 0,1; 1 e 10 µScm <sup>-1</sup> . Temperatura de leitura: a escolha da temperatura depende da temperatura de operação da coluna e da temperatura ambiente.														
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Temperatura Ambiente</th> <th>Temperatura das Colunas</th> <th>Temperatura do Detetor</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="3">10-30°C</td> <td>30°C</td> <td>33°C</td> </tr> <tr> <td>35°C</td> <td>38°C</td> </tr> <tr> <td>40°C</td> <td>43°C</td> </tr> <tr> <td>&gt; 30°C</td> <td>45°C</td> <td>48°C</td> </tr> </tbody> </table>	Temperatura Ambiente	Temperatura das Colunas	Temperatura do Detetor	10-30°C	30°C	33°C	35°C	38°C	40°C	43°C	> 30°C	45°C	48°C	
Temperatura Ambiente	Temperatura das Colunas	Temperatura do Detetor													
10-30°C	30°C	33°C													
	35°C	38°C													
	40°C	43°C													
> 30°C	45°C	48°C													

## ***2. Material e soluções de trabalho***

Todas as soluções aquosas foram preparadas com água ultra pura. O eluente  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$  foi desgasificado em ultra sons durante 5 a 10 minutos para a remoção dos gases dissolvidos (principalmente o  $\text{CO}_2$ ). As soluções padrão do analito foram preparadas através da diluição da solução mãe de 100 mg/L (*AccuSPEC*, solução rastreada a um padrão de referência da NIST, com uma incerteza de  $\pm 1\%$ ) e são preparadas em cada secção de trabalho.

O material usado no laboratório, de polietileno e/ou de vidro, é previamente lavado com detergente alcalino sem fosfato e seguidamente lavado com água da torneira. Posteriormente o material é lavado com água ultra-pura pelo menos 3 a 4 vezes. A secagem é feita ao ar ambiente tendo o cuidado de proteger o material de poeiras ambientais.

## ***3. Preparação da amostra***

A preparação de todas as amostras é realizada de acordo com o referencial EN 1911 e o referencial ISSO 5667-3, este último, define as diretrizes para a preservação e manuseamento de amostras de água.

Antes da introdução da amostra no sistema cromatográfico, esta é previamente filtrada em filtros de seringa *Nylon* (pro analysis) de porosidade de 0,2  $\mu\text{m}$ .

## ***4. Performance cromatográfica***

A primeira etapa consiste na escolha do volume de débito da bomba, para, por um lado, obter um melhor equilíbrio entre o soluto e a fase estacionária e, por outro lado, possibilitar que as pequenas flutuações do débito da bomba não influenciem a eficiência do sistema.

Como foi referido no capítulo anterior, para medir a eficiência de separação é necessário determinar o número de pratos teóricos e a altura de pratos teóricos (HETP) para diferentes velocidades de eluição. A partir da representação gráfica de HETP e da velocidade é possível definir a velocidade ótima de eluição.

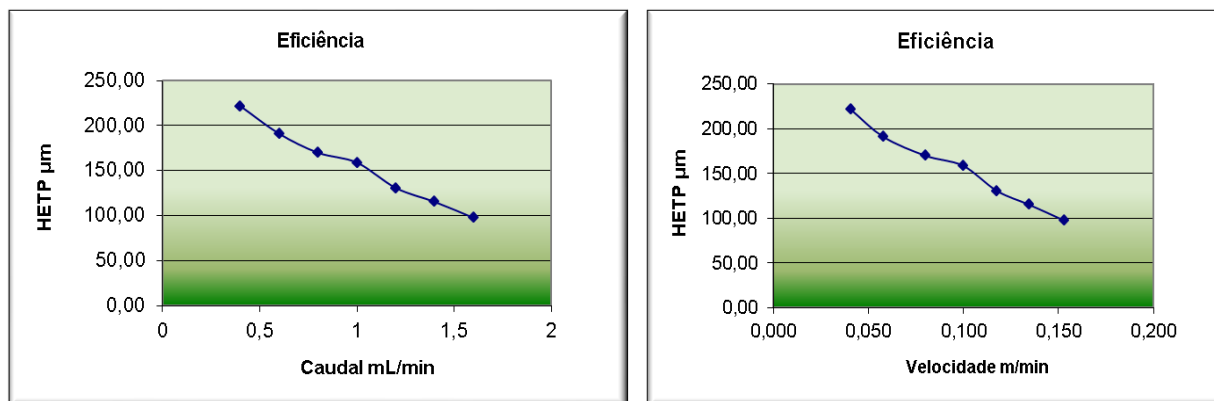
**Tabela 3.** Estudo da eficiência do sistema para a determinação de Cloretos.

Volume de débito da bomba [mL]	Pratos Teóricos/mm	HETP $\mu\text{m}$	Tempo de retenção eluente [min]	Tempo de retenção Cloretos [min]	Velocidade linear [m/min]	Fluxo [mL/min]	K'
0,4	4510,87	221,69	6,145	12,350	0,041	0,20	1,01
0,6	5238,25	190,90	4,315	8,310	0,058	0,30	0,93
0,8	5889,23	169,80	3,116	6,277	0,080	0,40	1,01
1	6296,57	158,82	2,507	5,060	0,100	0,49	1,02
1,2	7653,37	130,66	2,127	4,233	0,118	0,59	0,99
1,4	8680,72	115,20	1,858	3,710	0,135	0,67	1,00
1,6	10255,50	97,51	1,634	3,250	0,153	0,77	0,99

Coluna de 250 mm e pré coluna de 50 mm, ambas apresentam um diâmetro de 4 mm e partícula do enchimento de 7  $\mu\text{m}$   
Volume morto 2,45 mL

Teoricamente espera-se que quanto menor for o HETP, maior seja o N (nº de pratos teóricos) e conseqüentemente, se estabeleça um maior equilíbrio entre o soluto e a fase estacionária, ocorrendo uma melhor separação do analito.

Fase aos resultados obtidos, o volume de débito da bomba de forma a obter um fluxo na coluna de aproximadamente 1 mL/min (que corresponde ao menor valor para o HETP) é de 1,6 mL. Contudo, ao trabalhar com este volume, estamos a trabalhar a uma pressão muito próxima da pressão máxima (276 bar) recomendada para a coluna. De forma a encontrar o melhor compromisso entre a eficiência da coluna/pressão do sistema e tempo de análise, foi escolhido como volume de débito da coluna o valor de 1 mL, Figura 7.



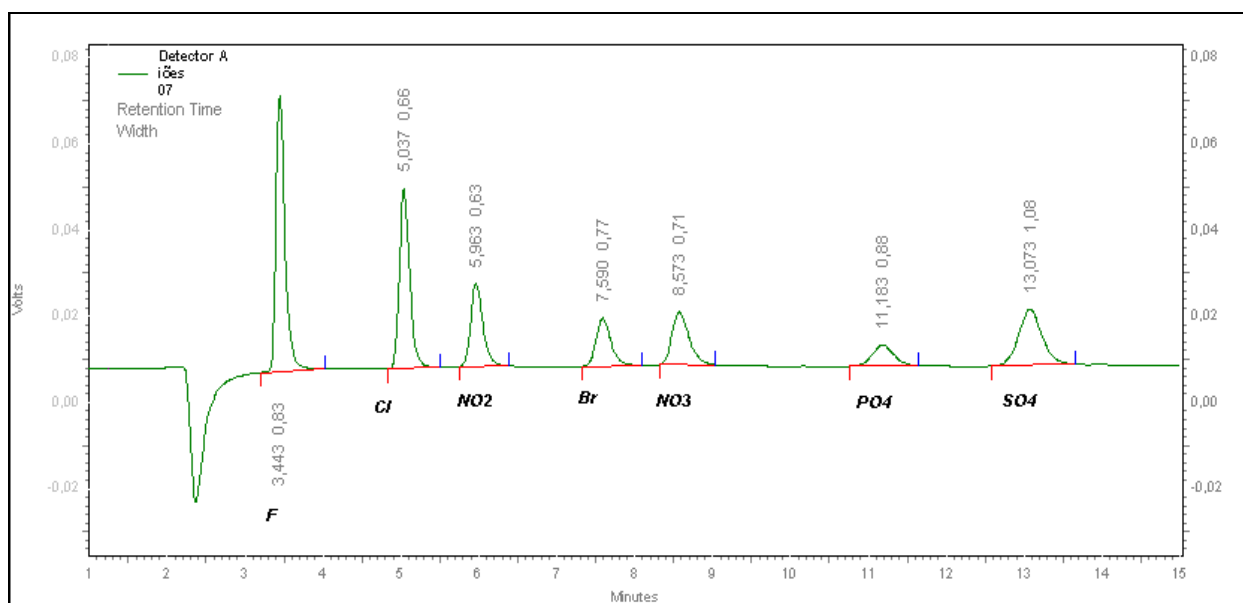
**Figura 7.** Variação de HETP em função da velocidade linear e do fluxo.

A segunda etapa corresponde à verificação da resposta analítica do cromatógrafo e da coluna para um eluente 1,0 mM NaHCO<sub>3</sub> + 8,0 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a um caudal de 1,0 mL/min, variando o volume de injeção. Os resultados obtidos são indicados na seguinte Tabela 4.

**Tabela 4.** Estudo da sensibilidade.

	Vol. Morto, (Vo)	Vol. Injeção (µL)	Vail N°	Ficheiro N°	Cloretos T <sub>R</sub> (min)	Área	Senb.
	2,528	10	1	10 ul	5,040	116412	12771
	2,499	20	1	20 ul	5,053	244124	13511
	2,484	25	1	25 ul	5,033	311681	12829
	2,499	30	1	30 ul	5,040	375825	12171
	2,574	40	1	40 ul	5,063	497536	<u>15338</u>
	2,499	50	1	50 ul	5,050	650916	
média	2,514				5,047		
desvio	0,033				0,011		
% CV	1,298				0,216		

Para volumes de injeção baixos, os picos obtidos apresentam uma fraca performance gaussiana podendo a sua deteção estar comprometida devido à influência do ruído da linha de base. Aumentando o volume da amostra e configurando o detetor para trabalhar com uma sensibilidade de 0,1 µS/cm, obtemos uma melhoria significativa na performance dos picos e observa-se uma sensibilidade cujo valor máximo é para um volume de injeção de 40 µL.



**Figura 8.** Cromatograma para um padrão multi-elementos de 1 mg/L.

Por outro lado, considerando um caudal de débito de 1 mL/min e um volume de injeção de 40 µL para a leitura de um padrão de 1 ppm obtêm-se um cromatograma, ver Figura 8, cujos picos apresentam uma resolução acima dos 1,25 (ver Tabela 5).

**Tabela 5.** Capacidade de resolução da coluna cromatográfica.

	<b>F</b>	<b>Cl</b>	<b>NO<sub>2</sub></b>	<b>Br</b>	<b>NO<sub>3</sub></b>	<b>PO<sub>4</sub></b>	<b>SO<sub>4</sub></b>
<b>t<sub>R</sub></b>	3,443	5,039	5,963	7,590	8,573	11,183	13,073
<b>Largura</b>	0,83	0,66	0,63	0,77	0,71	0,88	1,08
<b>Resolução</b>		2,1	1,4	2,3	1,3	3,3	1,9

### 5. Gama de trabalho, linearidade e limites do método

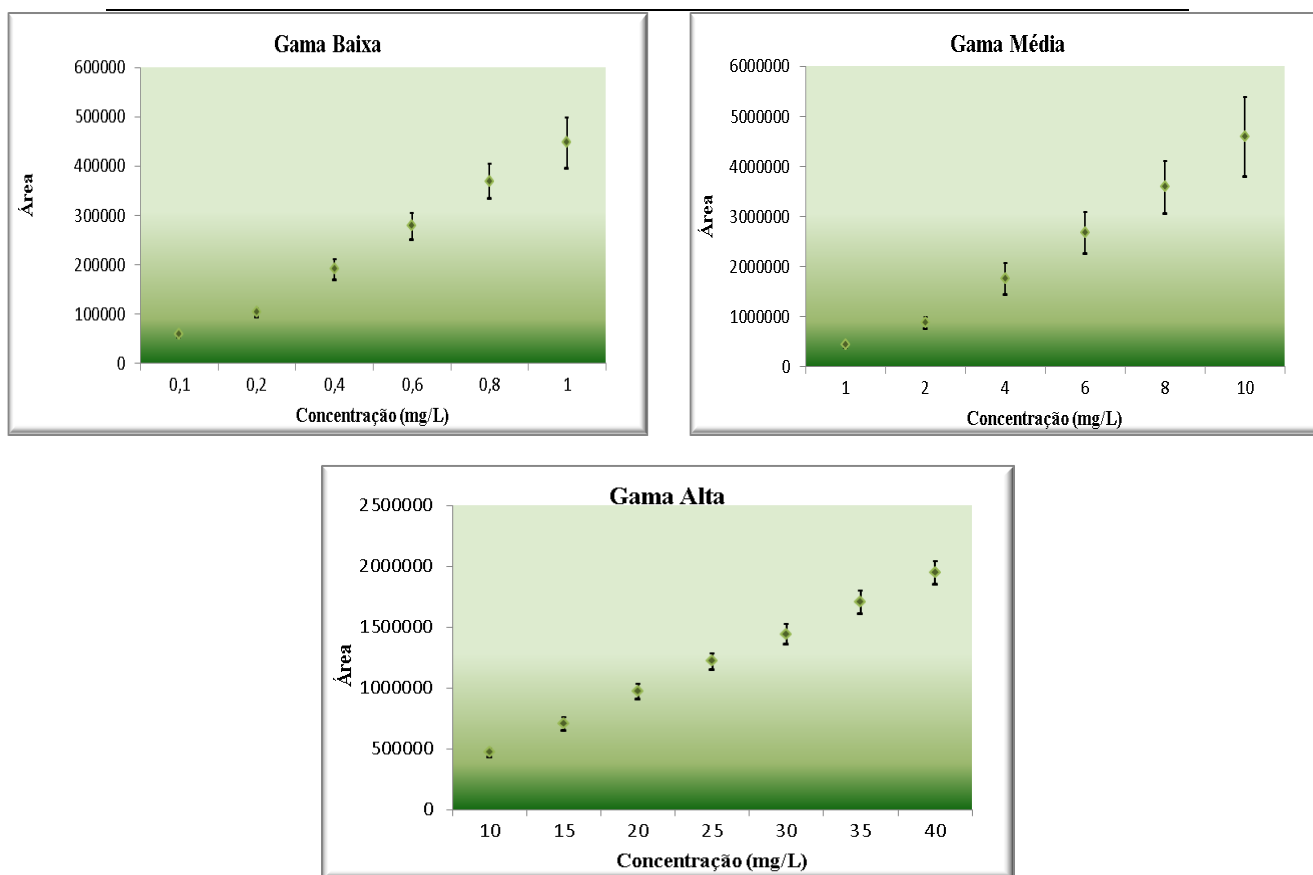
Para iniciar o processo de validação é necessário conhecer o comportamento da resposta da metodologia analítica a implementar. A primeira fase consiste em realizar várias leituras dos padrões e verificar a relação do sinal elétrico do equipamento com a variação das concentrações dos padrões de leitura.

A gama de concentração dos padrões da reta de calibração foi selecionada tendo em atenção o requisito normativo da EN1911:2010 nomeadamente, a gama de trabalho é **1 mg/m<sup>3</sup> a 5000 mg/m<sup>3</sup>**. Considerando um tempo de amostragem de 30 minutos e para um volume de amostragem é de aproximadamente 0,2 m<sup>3</sup>. Consequentemente, em termos de massa de HCl, a gama está compreendida entre 0,2 e 1000 mg. Por outro lado, sabendo que o volume de recolha da amostra é de aproximadamente 100 mL, as concentrações esperadas de HCl estão compreendidas entre 0,02 a 100 mg/L. A norma EN1911:2010 indica também que para a metodologia analítica por cromatografia iónica o limite de deteção deve estar compreendido entre **0,05 a 0,1 mg/L**. Outra informação base importante é a capacidade máxima em termos de concentração que a coluna suporta, informação indicada pelo fabricante, o qual refere que para a coluna *IonPAC 14A* a concentração máxima não deve ultrapassar os **100 mg/L**, de forma a evitar a saturação da fase estacionária.

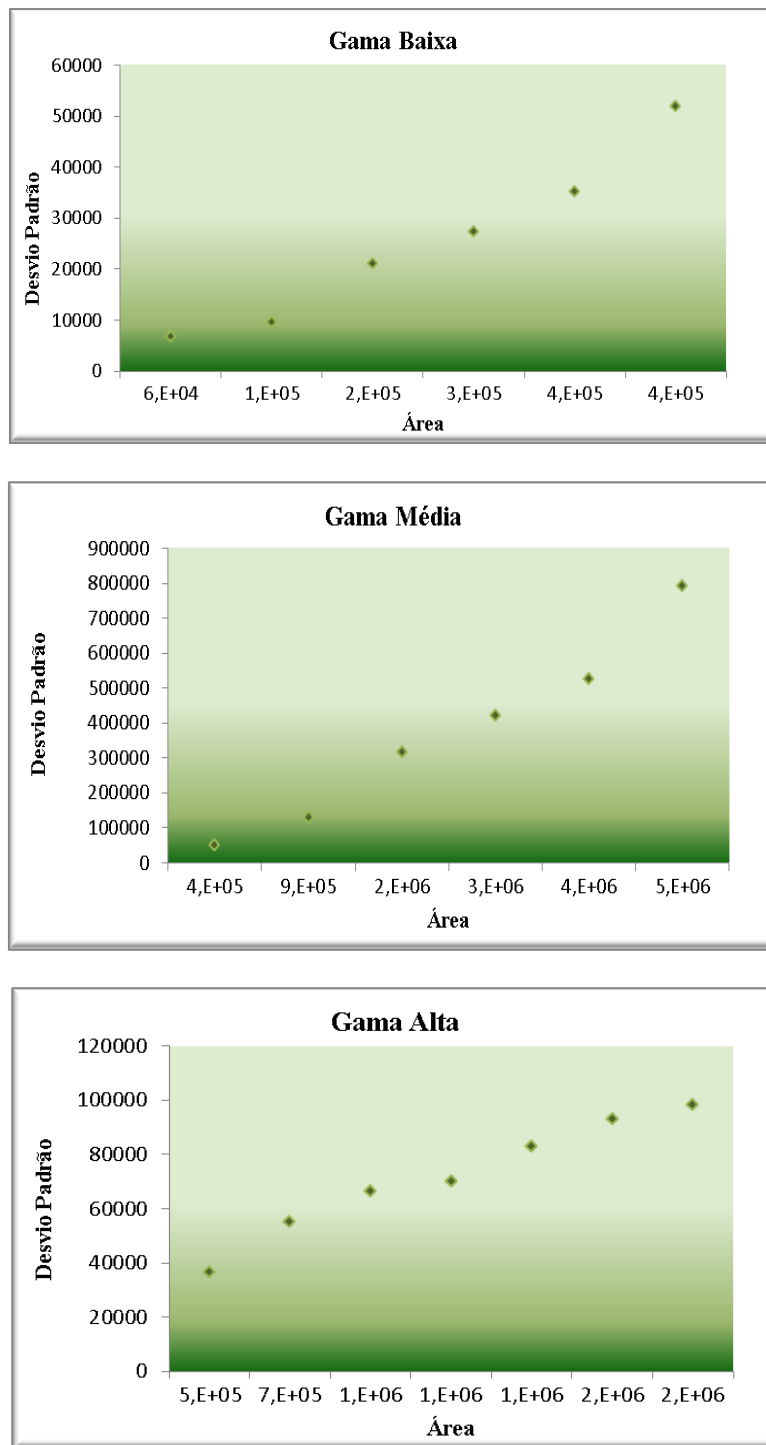
Com base na informação anterior a fase seguinte consiste em desenvolver a calibração analítica, estabelecendo um gráfico de calibração (sinal do equipamento em função da concentração) no qual será avaliada a gama de trabalho, aplicando o teste de homogeneidade de variâncias e a linearidade aplicando o teste de *Mandel*.

**Tabela 6.** Avaliação da intensidade do sinal em função da concentração.

Concentração mg/L	Área 1	Área 2	Área 3	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
0,1	52105	59943	65375	59141	6671	52470	65812
0,2	103548	93313	112495	103119	9598	93520	112717
0,4	208477	167318	196383	190726	21155	169571	211881
0,6	307321	252995	276086	278801	27265	251536	306065
0,8	404160	333669	370644	369491	35260	334231	404751
1,0	499758	395976	447160	447631	51893	395739	499524
2,0	1032018	834494	790641	885718	128583	757135	1014301
4,0	2121854	1662139	1518126	1767373	315321	1452052	2082694
6,0	3150068	2557277	2335512	2680952	421126	2259826	3102078
8,0	4173298	3461665	3149527	3594830	524716	3070114	4119546
10	5479766	4383065	3938683	4600505	793218	3807287	5393722
10	511886	442057	458711	470885	36472	434413	507356
15	770726	666078	687456	708087	55290	652796	763377
20	1048086	925414	942324	971941	66483	905458	1038424
25	1298763	1164353	1196825	1219980	70133	1149847	1290113
30	1514954	1353368	1466097	1444806	82870	1361936	1527677
35	1812529	1635856	1673415	1707267	93074	1614193	1800341
40	2058191	1866216	1926375	1950261	98191	1852070	2048452



**Figura 9.** Intensidade do sinal em função da concentração e respectivo intervalo de confiança para a gama baixa, média e alta.



**Figura 10.** Desvio padrão em função da área para a gama baixa, média e alta.

Da observação dos dados anteriores é possível constatar uma relação linear entre a área e a concentração (Figura 9) e o desvio padrão (Figura 10).

Contudo é necessário avaliar os desvios que afetam a relação entre o sinal instrumental e a concentração analítica, assim como verificar se as variâncias ao longo das gamas



são homogêneas. O estudo requer aplicação de testes estatísticos para avaliar a gama de trabalho (Tabela 7) e a linearidade (Figura 11 e Tabela 8).

**Tabela 7.** Teste de Homogeneidade de Variâncias para cada uma das gamas de trabalho.

<b>Gama Baixa</b>								
<b>Padrão 0,1</b>	<b>Padrão 1</b>							
48648	395821	<b>Teste F: duas amostras para variâncias</b>						
51718	395450							
49645	397412							
46827	391800							
47802	393936							
47530	397268							
48179	394116							
48346	394856							
50434	397378							
49296	398963							
<b>desvio</b>	1462					2121		
<b>Variâncias</b>	2138128					4496961		
						<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>	
			Média	395700	48842,5			
			Variância	4496961,111	2138128,056			
			Observações	10	10			
			gl	9	9			
			F	2,103223471				
			P(F<=f) uni-caudal	0,141646498				
			F crítico uni-caudal	3,178893105				

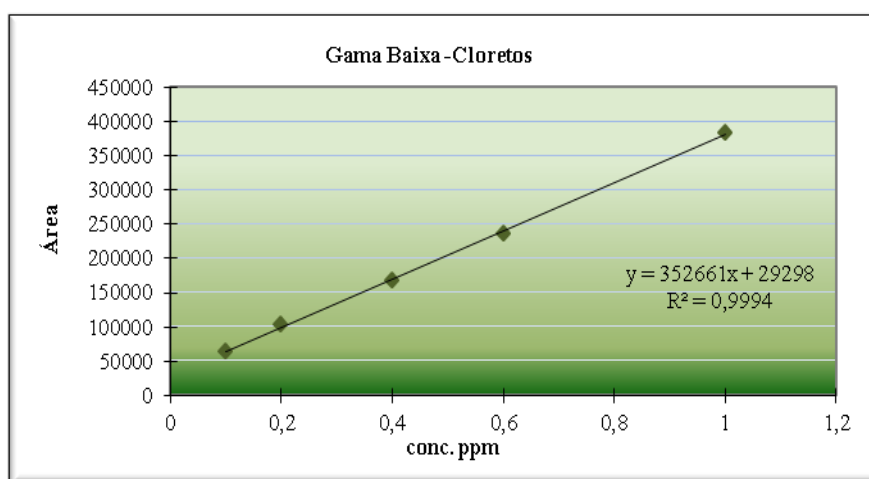
<b>Gama Média</b>								
<b>Padrão 1</b>	<b>Padrão 10</b>							
395821	416061	<b>Teste F: duas amostras para variâncias</b>						
395450	418883							
397412	424253							
391800	423238							
393936	419357							
397268	416652							
394116	415647							
394856	415934							
397378	415050							
398963	415284							
<b>desvio</b>	2120					3343		
<b>Variâncias</b>	4496961					11178427		
						<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>	
			Média	418035,9	395700			
			Variância	11178427,66	4496961,111			
			Observações	10	10			
			gl	9	9			
			F	2,485773699				
			P(F<=f) uni-caudal	0,095567099				
			F crítico uni-caudal	3,178893105				

<b>Gama Alta</b>								
<b>Padrão 10</b>	<b>Padrão 40</b>							
416061	1949353	<b>Teste F: duas amostras para variâncias</b>						
418883	1952418							
424253	1951106							
423238	1955780							
419357	1956825							
416652	1958077							
415647	1957784							
415934	1958120							
415050	1959400							
415284	1959373							
<b>desvio</b>	3343					3595		
<b>Variâncias</b>	11178428					12923393		
						<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>	
			Média	1955823,6	418035,9			
			Variância	12923393,16	11178427,66			
			Observações	10	10			
			gl	9	9			
			F	1,156101158				
			P(F<=f) uni-caudal	0,416232507				
			F crítico uni-caudal	3,178893105				

Na definição destas gamas o detetor é configurado para trabalhar com um ganho de 0,1  $\mu\text{S}/\text{cm}$  para a gama baixa e média e, para a gama alta, é configurado para 1  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

Para cada uma das gamas o primeiro e o último padrão das curvas de calibração foram analisados em 10 réplicas independentes e as suas variâncias associadas,  $S_1^2$  e  $S_2^2$ , foram calculadas a fim de se verificar a existência ou não de diferenças significativas entre elas. O valor teste, P, obtido através da razão destas variâncias, é comparado com o valor tabelado da distribuição F de *Snedecor/Fischer*. Do teste anterior conclui-se que não há diferenças significativas entre as variâncias concluindo que a gama está bem ajustada. A seguir é necessário verificar qual o modelo que melhor define a linearidade.

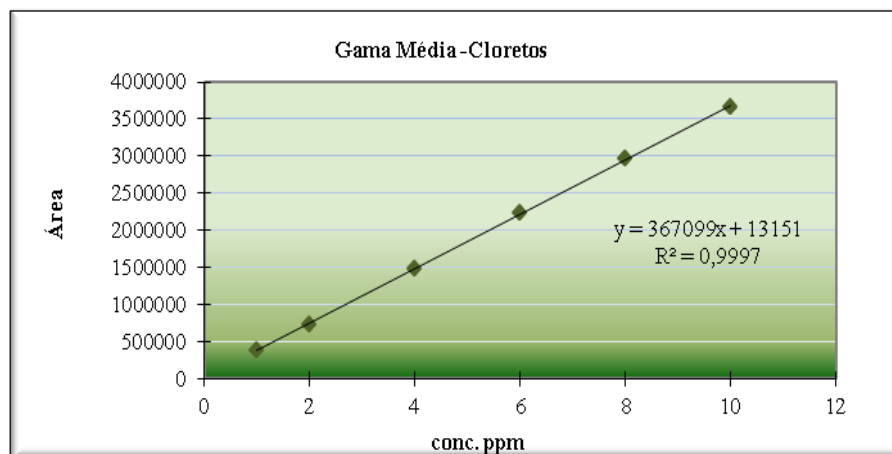
A Figura 11, representa a relação linear da área com a concentração para cada uma das gamas. Para cada gama, foi avaliado se a função de calibração linear traduz o melhor ajuste dos pontos. Para as três gamas, observa-se que a função de calibração é linear.



Área	Padrão, ppm
64105	0,1
103548	0,2
168477	0,4
237321	0,6
384160	1

$$DS^2 = (N-2) * \text{Variância } 1^{\text{a}} \text{ ordem} - ((N-3) * \text{Variância } 2^{\text{a}} \text{ ordem})$$

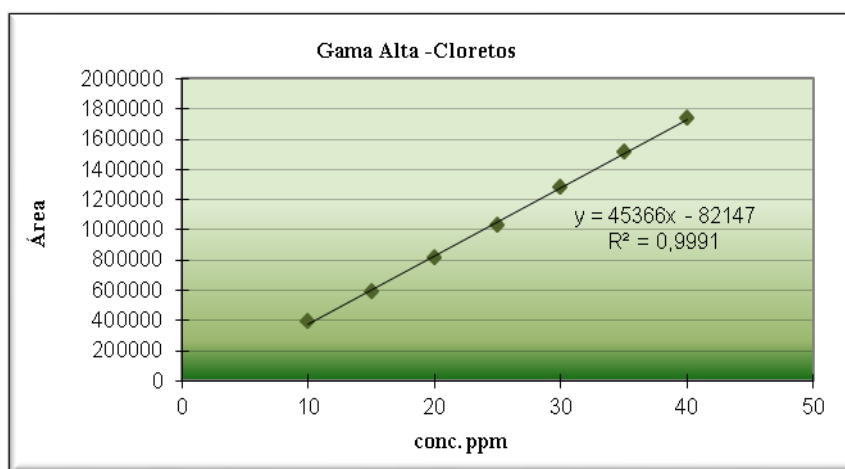
	Variância	Graus de Liberdade
<b>Erro 1ª ordem</b>	3425,5	11734187
<b>Erro 2ª ordem</b>	6288,9	39551502
<b>n</b>	5	
<b>DS<sup>2</sup></b>	-43900442	1
<b>VT</b>	-1,11	
<b>F(95%;1;2)</b>	38,5	



Área	Padrão, ppm
384160	1
724636	2
1486660	4
2231537	6
2976261	8

$$DS^2 = (N-2) * \text{Variância 1ª ordem} - ((N-3) * \text{Variância 2ª ordem})$$

		Variância	Graus de Liberdade
<b>Erro 1ª ordem</b>	24019,3	576928554	
<b>Erro 2ª ordem</b>	21467,8	460866660	3
<b>n</b>	6		
<b>DS²</b>	925114235		1
<b>VT</b>	2,0		
<b>F(95%;1;3)</b>	17,4		



Área	Padrão, ppm
396634	10
588555	15
811480	20
1034271	25
1279332	30
1510880	35
1742884	40

$$DS^2 = (N-2) * \text{Variância 1ª ordem} - ((N-3) * \text{Variância 2ª ordem})$$

		Variância	Graus de Liberdade
<b>Erro 1ª ordem</b>	16518,1	272846118	
<b>Erro 2ª ordem</b>	9699,5	94080490	4
<b>n</b>	7		
<b>DS²</b>	987908630		1
<b>VT</b>	10,5		
<b>F(95%;1;4)</b>	45,7		

**Figura 11.** Curva de calibração para o cloreto e avaliação pelo teste *Mandel* de cada gama de trabalho.

Outros parâmetros característicos da função de calibração linear são:

- Coeficiente de correlação da reta: é um bom indicativo da correlação entre os dados. Contudo, só por si não fornece informação conclusiva relativamente à linearidade. Para as retas indicadas anteriormente observa-se coeficientes acima dos 0,995, que são indicativos de uma boa correlação linear.
- Desvio padrão do método: é uma medida que permite avaliar a qualidade do trabalho do analista. Observando a Tabela 8 ambos os parâmetros ( $S_{\text{método}}$  e CV%) apresentam valores baixos e valores de CV% inferiores a 10 % são considerados aceitáveis.
- Declive da reta: é uma medida da sensibilidade do método, ou seja, da capacidade do método em distinguir pequenas diferenças de concentração do analito.

**Tabela 8.** Parâmetros da curva de calibração para cada uma das gamas.

Gama	r	$S_{\text{método}}$	CV%	Declive	$S_{y/x}$
Baixa	0,9996	0,01	2,1	352661	3426
Média	0,9998	0,07	1,3	367099	24019
Alta	0,9995	0,4	1,5	45366	16518

Os dados indicados para o parâmetro  $S_{y/x}$  exprimem a dispersão dos valores do sinal instrumental em torno da curva de calibração, sendo um dado importante para o cálculo dos limites de confiança do declive, da ordenada na origem e dos limites de deteção e quantificação do método.

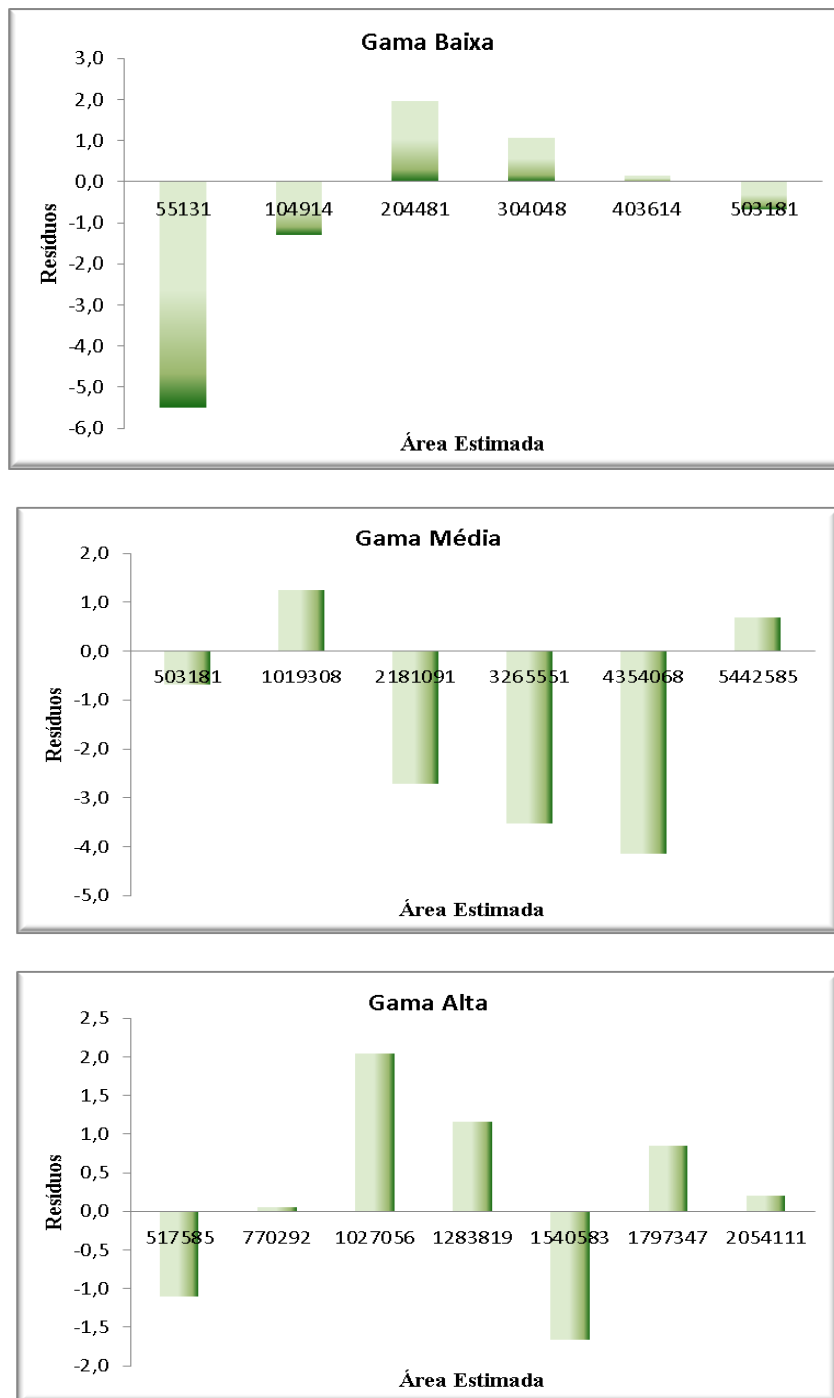
**Tabela 9.** Limites associados ao método, declive e ordenada na origem.

Gama	Declive	$S_{\text{declive}}$	Ordenda	$S_{\text{ordenada}}$	LD mg/L	LQ mg/L
Baixa	352661	8919	29298	2545	0,03	0,10
Média	367099	1605	13151	42313		
Alta	45366	8550	-82147	48043		

Analisando os resultados da Tabela 9, é de notar que o limite de quantificação corresponde ao primeiro padrão da gama baixa. Por outro lado, o limite de deteção obtido, 0,03 ppm, é extremamente satisfatório considerando que o valor indicado na norma EN1911:2010 é de 0,05 a 0,1 ppm.

Pela análise dos resíduos (diferença entre a o sinal obtidos e o sinal calculado a partir da reta) observa-se que não há uma tendência positiva ou negativa dos resultados,

observa-se uma distribuição aleatória dos mesmos e os teores estimados encontram-se abaixo dos 10%, (Figura 12).



**Figura 12.** Distribuição dos resíduos para cada uma das gamas.

## 6. Estudo da precisão

Como foi referido no capítulo anterior, a precisão permite avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. Os resultados obtidos são avaliados com o intuito de verificar a existência de valores aberrantes. Para a avaliação de valores aberrantes aplica-se o teste de *Grubbs* (ISSO 5725-2 1994), o qual consiste no cálculo da média e do desvio padrão dos valores ordenados, testando-se assim, se o valor menor e o valor maior são ou não aberrantes. Se forem encontrados valores aberrantes, os valores aberrante são eliminados e repete-se o teste com os restantes dados. Caso contrário pode-se calcular a repetibilidade, (Tabela 10, Tabela 11 e Tabela 12)

**Tabela 10.** Ensaio de repetibilidade e avaliação da presença de valores aberrante, gama baixa.

Leituras Gama Baixa	Padrões testados		Padrões testados ordenados	
	0,1	1	0,1	1
1	0,098	0,968	0,085	0,947
2	0,095	0,947	0,085	0,957
3	0,085	0,975	0,085	0,962
4	0,085	0,971	0,087	0,965
5	0,085	0,965	0,089	0,968
6	0,093	0,962	0,092	0,971
7	0,089	0,991	0,093	0,975
8	0,087	0,957	0,095	0,976
9	0,092	0,976	0,098	0,976
10	0,103	0,976	0,103	0,991
<b>Média</b>			0,091	0,969
<b>Desvio Padrão</b>			0,006	0,012
<b>CV%</b>			6,7	1,2
<b>ER%</b>			8,8	3,1
Aberrantes únicos	Resultado mais elevado	Gcal	1,9	1,8
	Resultado mais baixo	Gcal	1,0	1,8
		Gtab (5%; 10 )	2,290	2,290
		Gtab (1%; 10)	2,482	2,482
Aberrantes emparelhados		So	0,0003	0,0013
		Sn-1	0,0001	0,0007
	Resultado mais elevado	Gcal	0,33	0,50
		Gtab (5%; 10 )	0,186	0,186
		Gtab (1%; 10)	0,115	0,115
		So	0,0003	0,0013
		Sn-1	0,0002	0,0006
	Resultado mais baixo	Gcal	0,72	0,43
	Gtab (5%; 10)	0,186	0,186	
	Gtab (1%; 10)	0,115	0,115	

**Tabela 11.** Ensaio de repetibilidade e avaliação da presença de valores aberrante, gama média.

Leituras Gama Baixa	Padrões testados		Padrões testados ordenados	
	1	10	1	10
1	1,060	10,384	1,059	10,384
2	1,074	10,461	1,060	10,414
3	1,064	10,443	1,064	10,415
4	1,088	10,415	1,069	10,443
5	1,059	10,414	1,074	10,461
6	1,088	10,477	1,076	10,477
7	1,076	10,545	1,078	10,545
8	1,086	10,598	1,086	10,587
9	1,078	10,590	1,088	10,598
10	1,069	10,587	1,088	10,590
<b>Média</b>			1,074	10,491
<b>Desvio Padrão</b>			0,011	0,082
<b>CV%</b>			1,0	0,8
<b>ER%</b>			7,4	4,9
Aberrantes únicos	Resultado mais elevado	Gcal	1,2	1,2
	Resultado mais baixo	Gcal	1,4	1,3
		Gtab (5%; 10)	2,290	2,290
		Gtab (1%; 10)	2,482	2,482
Aberrantes emparelhados		So	0,0011	0,0599
		Sn-1	0,0006	0,0336
	Resultado mais elevado	Gcal	0,57	0,56
		Gtab (5%; 10)	0,186	0,186
		Gtab (1%; 10)	0,115	0,115
		So	0,0011	0,0599
		Sn-1	0,0006	0,0381
	Resultado mais baixo	Gcal	0,51	0,64
	Gtab (5%; 10)	0,186	0,186	
	Gtab (1%; 10)	0,115	0,115	

**Tabela 12.** Ensaio de repetibilidade e avaliação da presença de valores aberrante, gama alta.

Leituras Gama Alta	Padrões testados		Padrões testados ordenados	
	10	40	10	40
1	10,695	40,229	10,379	40,216
2	10,553	40,815	10,470	40,229
3	10,471	40,216	10,471	40,301
4	10,497	40,884	10,497	40,797
5	10,528	40,301	10,528	40,815
6	10,535	40,995	10,535	40,797
7	10,379	40,797	10,553	40,879
8	10,638	41,046	10,563	40,884
9	10,563	41,003	10,638	41,003
10	10,470	40,879	10,695	41,046
<b>Média</b>			10,533	40,697
<b>Desvio Padrão</b>			0,089	0,321
<b>CV%</b>			0,8	0,8
<b>ER%</b>			5,3	1,8
Aberrantes únicos	Resultado mais elevado	Gcal	1,8	1,1
	Resultado mais baixo	Gcal	1,7	1,5
		Gtab (5%; 10)	2,290	2,290
		Gtab (1%; 10)	2,482	2,482
Aberrantes emparelhados		So	0,0714	0,9247
		Sn-1	0,0252	0,6551
	Resultado mais elevado	Gcal	0,35	0,71
		Gtab (5%; 10)	0,186	0,186
		Gtab (1%; 10)	0,115	0,115
		So	0,0714	0,9247
		Sn-1	0,0379	0,3624
	Resultado mais baixo	Gcal	0,53	0,39
	Gtab (5%; 10)	0,186	0,186	
	Gtab (1%; 10)	0,115	0,115	

Observando os valores obtidos através do teste de *Grubbs*, apresentados nas tabelas 10 a 12, verificamos, para cada uma das gamas de trabalho que, quer para o padrão de concentração mais baixa, quer para o padrão de concentração mais elevada, não existem valores aberrantes. Os valores de G obtidos são inferiores ao valor tabelado no estudo de aberrantes únicos e os valores G obtidos são superiores ao valor tabelado para os ensaios de aberrantes emparelhados.



A precisão intermédia foi avaliada com padrões de controlo preparados de soluções mãe de lote diferente do lote da solução mãe dos padrões da reta. Para cada dia de análise foi elaborada a reta de calibração e o equipamento configurado para as mesmas condições definidas na Tabela 2.

**Tabela 13.** Ensaio de precisão intermédia.

<b>Data</b>	<b>Padrão 0,15</b>	<b>Padrão 0,4</b>	<b>Padrão 3,0</b>	<b>Padrão 7,0</b>	<b>Padrão 16,0</b>	<b>Padrão 36,0</b>
25-03-2010	0,150	0,38	2,83	6,50		35,01
16-04-2010	0,149		3,10	7,24		
29-04-2010	0,152	0,42	2,89			
21-05-2010	0,151		2,98	6,97		36,05
01-06-2010	0,148		2,92	6,69		34,91
23-06-2010	0,149	0,40	3,06	7,00		36,00
25-06-2010	0,149	0,41	3,03	7,11		36,78
06-07-2010	0,151	0,38	3,09	7,32		37,91
15-09-2010	0,147		2,85	6,86	16,42	
08-10-2010	0,148	0,41	2,91	6,35	16,56	
14-10-2010	0,146	0,41	2,93	7,11	15,73	
22-10-2010	0,148	0,40	2,91	6,75	16,21	36,77
04-11-2010	0,151	0,43	2,93	6,92	16,21	36,67
09-11-2010	0,151	0,39	2,97	6,82	15,70	36,79
15-12-2010	0,149	0,36	2,88	6,61	15,54	36,13
20-01-2011	0,150	0,38	2,88	6,72	15,92	35,96
21-02-2011	0,150	0,39	2,86	6,93	15,06	36,17
17-03-2011	0,151	0,41	2,77	7,07	15,97	36,94
11-04-2011	0,151	0,42	2,89	7,50	16,11	35,47
11-04-2011	0,151	0,43	2,97	7,16	16,11	35,88
12-05-2011	0,151	0,41	2,91	7,12	15,91	36,56
12-05-2011	0,150	0,43	2,96	7,13	15,89	36,50
06-06-2011	0,150	0,40			15,86	36,28
06-06-2011	0,150	0,43			15,94	36,43
07-07-2011	0,149	0,38	2,80	6,84	15,57	35,54
07-07-2011	0,149	0,39	2,72	6,66	15,90	35,67
31-08-2011	0,149	0,39	2,85	6,66	15,50	34,89
31-08-2011	0,150	0,43	2,90	6,71	15,51	35,04
19-09-2011	0,152	0,40	2,94	7,00	15,45	35,35
19-09-2011	0,154	0,39	3,01	6,87	15,49	35,41
28-10-2011	0,153	0,38	3,02	6,79		
28-10-2011	0,152	0,37	2,89	7,08		
30-11-2011	0,153	0,41	3,09	7,21		34,47
30-11-2011	0,150	0,42	3,14	7,24		35,14
22-12-2011	0,150	0,40	2,97	6,83	15,80	36,50
22-12-2011	0,149	0,43	2,92	6,73	15,82	35,60
<b>Média</b>	0,150	0,40	2,93	6,92	15,84	35,96
<b>Desvio</b>	0,002	0,02	0,10	0,25	0,34	0,78
<b>CV, %</b>	1,15	4,89	3,25	3,65	2,13	2,16
<b>ER, %</b>	0,08	0,66	2,19	1,08	0,99	0,11

Observando os dados anteriores, podemos verificar para o coeficiente de variação e o erro relativo são inferiores ao critério de aceitação estabelecido no Laboratório do IDAD, que é de 10%.

## 7. Estudo da exatidão do método.

O estudo de exatidão foi realizado a partir da análise de amostras fortificadas (Teste de Recuperação) e a partir dos dados dos ensaios de comparação interlaboratoriais.

### 7.1 Ensaio de recuperação

A Tabela 14 corresponde a um resumo dos últimos resultados dos ensaios de recuperação realizados nas amostras.

**Tabela 14.** Teor de recuperação dos ensaios de fortificação das amostras.

Data	Recup %	Data	Recup %	Data	Recup %
25-03-2010	96	21-02-2011	97	31-08-2011	99
25-03-2010	99	21-02-2011	97	31-08-2011	99
25-03-2010	111	21-02-2011	97	31-08-2011	100
16-04-2010	101	21-02-2011	96	31-08-2011	98
16-04-2010	101	21-02-2011	101	31-08-2011	99
16-04-2010	104	21-02-2011	99	31-08-2011	98
25-06-2010	106	17-03-2011	101	19-09-2011	88
25-06-2010	101	17-03-2011	101	19-09-2011	88
25-06-2010	100	17-03-2011	104	19-09-2011	92
25-06-2010	104	17-03-2011	107	19-09-2011	91
25-06-2010	98	17-03-2011	104	19-09-2011	93
25-06-2010	98	11-04-2011	97	19-09-2011	93
15-09-2010	100	11-04-2011	118	19-10-2011	98
15-09-2010	99	11-04-2011	115	19-10-2011	99
08-10-2010	96	12-05-2011	101	28-10-2011	94
08-10-2010	92	12-05-2011	100	28-10-2011	94
08-10-2010	97	12-05-2011	100	28-10-2011	94
08-10-2010	98	12-05-2011	099	28-10-2011	94
14-10-2010	110	12-05-2011	100	28-10-2011	97
14-10-2010	112	12-05-2011	103	28-10-2011	96
04-11-2010	112	06-06-2011	93	30-11-2011	91
04-11-2010	110	06-06-2011	94	30-11-2011	92
15-12-2010	118	06-06-2011	94	30-11-2011	95
15-12-2010	112	06-06-2011	95	30-11-2011	92
20-01-2011	98	06-06-2011	95	30-11-2011	90
20-01-2011	98	07-07-2011	107	22-12-2011	94
20-01-2011	105	07-07-2011	108	22-12-2011	92
20-01-2011	105	07-07-2011	104	22-12-2011	97
20-01-2011	99	07-07-2011	109	22-12-2011	97
20-01-2011	95	07-07-2011	109	22-12-2011	96
21-02-2011	97	07-07-2011	103	22-12-2011	100
<b>Média, x</b>	99	<b>Desvio, <math>\delta</math></b>	0,06	<b>Variância, <math>S=\delta^2</math></b>	0,004

Os ensaios de recuperação foram realizados em algumas amostras. O critério definido com base no *Standard Methods* (SMEWW 2010) é de 80 a 120%. Qualquer valor obtido dentro deste intervalo fornece a informação de que tanto o procedimento como

a matriz não influencia de modo significativo a detecção do analito, demonstrando que o método é capaz de identificar todo o analito presente.

### 7.2 Erros relativos

Pela avaliação dos dados contidos na Tabela 13, constata-se que os resultados obtidos da leitura dos padrões de controlo, apresentam erros relativos inferiores a 10%, critério estabelecido pelo laboratório do IDAD.

### 7.3 Ensaio de comparação interlaboratorial

Dado que o método validado consiste em determinar cloretos cuja matriz é água ultra pura, o gama de ensaios interlaboratoriais participados foram escolhidos de forma a avaliar o maior número de matrizes com vista a apreçar o comportamento do método.

**Tabela 15.** Participação nos ECI's para a determinação de cloretos/HCl.

Ano	Ensaio	Matriz		V <sub>Ref</sub>	S	V <sub>Lab</sub>	Z-score
2008	IPQ/RELACRE	Águas de Consumo	2ª Dist	23	1	23,4	0,4
			3ª Dist	18	1	19,4	1,4
			4ª Dist	3,5	0,3	3,3	-0,7
	CALITAX	Atmospheric Contamination	1ª Dist	74,6	6,24	70,5	-0,65
2009	IPQ/RELACRE	Águas de Consumo	2ª Dist	27,73	1,39		-1,5
	CALITAX	Atmospheric Contamination	2ª Dist	74,6	6,24	70,5	-0,94
2010	RTC	Água Natural	Set 2010	7,91	0,88	8	0,10
		Água Residual	Out 2010	182	9,27	174	-0,80
	IPQ/RELACRE	Águas Residuais	1ª Dist	122	8	123	0,13
	IELAB	Atmospheric Contamination	2ª Dist	84,21	3,58	83,6	-0,17
2012	IELAB	Atmospheric Contamination	2ª Dist	102,0	4,00	101	-0,23

## 8. Incertezas

As fontes de incerteza consideradas para a estimativa da incerteza global do ensaio são: para a avaliação da componente de fidelidade a partir os dados dos padrões de controlo, Tabela 17; para a componente da veracidade foram considerados os dados dos ensaios de recuperação, Tabela 16.

**Tabela 16.** Estimativa da incerteza para a componente Veracidade.

<b>Data</b>	<b>Recup mg/L</b>	<b>Data</b>	<b>Recup mg/L</b>
25-03-2010	1,06	12-05-2011	1,01
25-03-2010	1,06	12-05-2011	1,01
16-04-2010	1,03	12-05-2011	1,01
16-04-2010	1,00	12-05-2011	1,02
16-04-2010	1,07	06-06-2011	0,93
29-04-2010	1,07	06-06-2011	0,92
25-06-2010	0,85	06-06-2011	0,93
25-06-2010	1,09	06-06-2011	0,93
25-06-2010	1,09	06-06-2011	0,93
25-06-2010	0,96	06-06-2011	0,93
25-06-2010	1,01	07-07-2011	1,03
25-06-2010	0,96	07-07-2011	1,04
25-06-2010	0,93	07-07-2011	1,05
15-09-2009	0,98	07-07-2011	1,06
15-09-2010	0,96	07-07-2011	1,06
08-10-2010	0,93	07-07-2011	1,03
08-10-2010	1,03	31-08-2011	0,99
08-10-2010	1,05	31-08-2011	1,00
14-10-2010	1,08	31-08-2011	1,00
14-10-2010	1,13	31-08-2011	1,01
22-10-2010	1,00	31-08-2011	1,01
04-11-2010	1,12	31-08-2011	1,01
04-11-2010	1,12	19-09-2011	0,97
09-11-2010	0,90	19-09-2011	0,97
15-12-2010	1,10	19-09-2011	1,01
15-12-2010	1,10	19-09-2011	1,03
20-01-2011	0,93	19-09-2011	1,02
20-01-2011	0,97	19-09-2011	1,02
20-01-2011	1,03	28-10-2011	0,92
20-01-2011	1,03	28-10-2011	0,92
20-01-2011	0,94	28-10-2011	0,93
20-01-2011	0,95	28-10-2011	0,93
21-02-2011	0,99	28-10-2011	0,95
21-02-2011	1,01	28-10-2011	0,92
21-02-2011	0,94	30-11-2011	0,93
21-02-2011	0,96	30-11-2011	0,93
21-02-2011	0,99	30-11-2011	0,93
21-02-2011	0,99	30-11-2011	0,94
17-03-2011	0,89	30-11-2011	0,93
17-03-2011	0,91	30-11-2011	0,92
17-03-2011	0,87	22-12-2011	0,95
17-03-2011	0,86	22-12-2011	0,96
11-04-2011	0,90	22-12-2011	1,00
11-04-2011	0,84	22-12-2011	1,00
11-04-2011	1,10	22-12-2011	0,99
12-05-2011	1,02	22-12-2011	0,99
12-05-2011	1,01		
<b>Média, x</b>		0,99	
<b>Desvio, <math>\delta</math></b>		0,06	
<b>Variância, <math>\delta^2</math></b>		0,004	
<b>n</b>		92	
<b>Incerteza Veracidade</b>			
<b>Rexac 0,99</b>		<b>uRexac 0,01</b>	

**Tabela 17.** Estimativa da incerteza para a componente fidelidade.

<b>Padrão de Controle (mg/L)</b>						
<b>Data</b>	<b>Padrão 0,15</b>	<b>Padrão 0,4</b>	<b>Padrão 3,0</b>	<b>Padrão 7,0</b>	<b>Padrão 16,0</b>	<b>Padrão 36,0</b>
25-03-2010	0,150	0,38	2,83	6,50		35,01
16-04-2010	0,149		3,10	7,24		
29-04-2010	0,152	0,42	2,89			
21-05-2010	0,151		2,98	6,97		36,05
01-06-2010	0,148		2,92	6,69		34,91
23-06-2010	0,149	0,40	3,06	7,00		36
25-06-2010	0,149	0,41	3,03	7,11		36,78
06-07-2010	0,151	0,38	3,09	7,32		37,91
15-09-2010	0,147		2,85	6,86	16,42	
08-10-2010	0,148	0,41	2,91	6,35	16,56	
14-10-2010	0,146	0,41	2,93	7,11	15,73	
22-10-2010	0,148	0,40	2,91	6,75	16,21	36,77
04-11-2010	0,151	0,43	2,93	6,92	16,21	36,67
09-11-2010	0,151	0,39	2,97	6,82	15,7	36,79
15-12-2010	0,149	0,36	2,88	6,61	15,54	36,13
20-01-2011	0,150	0,38	2,88	6,72	15,92	35,96
21-02-2011	0,150	0,39	2,86	6,93	15,06	36,17
17-03-2011	0,151	0,41	2,77	7,07	15,97	36,94
11-04-2011	0,151	0,42	2,89	7,50	16,11	35,47
11-04-2011	0,151	0,43	2,97	7,16	16,11	35,88
12-05-2011	0,151	0,41	2,91	7,12	15,91	36,56
12-05-2011	0,150	0,43	2,96	7,13	15,89	36,50
06-06-2011	0,150	0,40			15,86	36,28
06-06-2011	0,150	0,43			15,94	36,43
07-07-2011	0,149	0,38	2,80	6,84	15,57	35,54
07-07-2011	0,149	0,39	2,72	6,66	15,90	35,67
31-08-2011	0,149	0,39	2,85	6,66	15,50	34,89
31-08-2011	0,15	0,43	2,90	6,71	15,51	35,04
19-09-2011	0,152	0,40	2,94	7,00	15,45	35,35
19-09-2011	0,154	0,39	3,01	6,87	15,49	35,41
28-10-2011	0,153	0,38	3,02	6,79		
28-10-2011	0,152	0,37	2,89	7,08		
30-11-2011	0,153	0,41	3,09	7,21		34,47
30-11-2011	0,150	0,42	3,14	7,24		35,14
<b>Média, x</b>	0,150	0,40	2,93	6,93	15,84	35,95
<b>Desvio, δ</b>	0,002	0,02	0,10	0,26	0,35	0,79
<b>Incerteza da fidelidade</b>						
<b>Gama</b>	<b>0,1</b>	<b>0,4</b>	<b>3,0</b>	<b>7,0</b>	<b>16,0</b>	<b>36,0</b>
<b>u</b> Precisão (absolutos)	0,01	0,05	0,03	0,04	0,02	0,02
<b>u</b> Precisão (relativos)	<b>1,15</b>	<b>4,90</b>	<b>3,34</b>	<b>3,72</b>	<b>2,23</b>	<b>2,21</b>

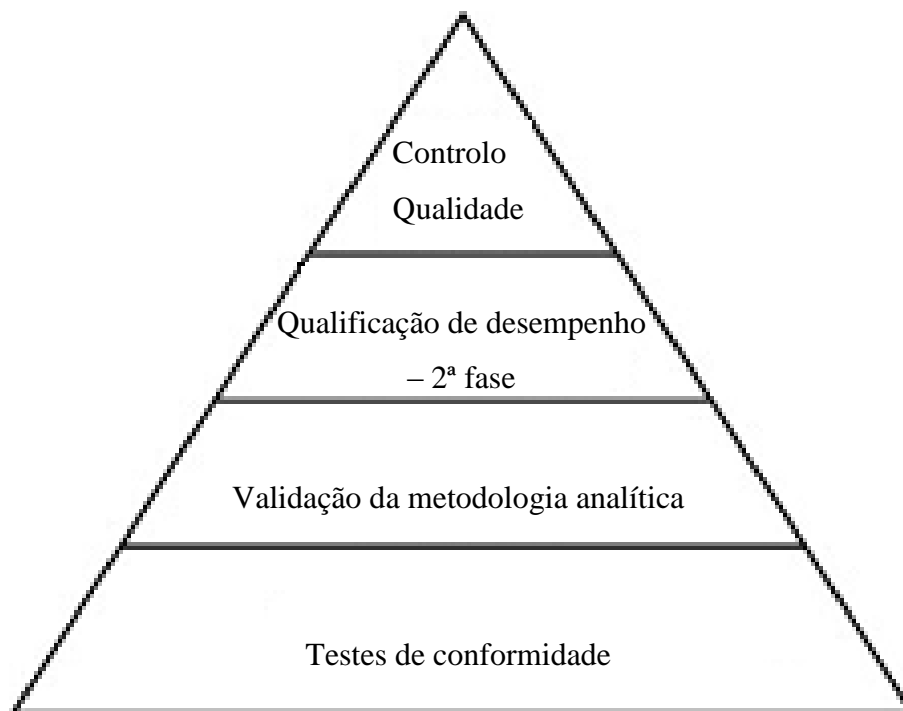
<b>Conc. mg/L Cl</b>	2
<b>Incerteza Combinada</b>	0,058
<b>Incerteza Expandida*</b>	0,233
<b>Incerteza Relativa %</b>	11,6

\* Fator de expansão=2 (95% de confiança) para n>6 e K=t (n-1;95%) para n<6

Observando o resultado final da incerteza relativa associada (12%) o valor obtido não se encontra sobredimensionado relativamente aos critérios de aceitação definidos para aceitação dos padrões de controlo (10%). Pode-se concluir que o critério de 10 % é adequado para a metodologia aplicada.

## **RESULTADOS DO CONTROLO DA QUALIDADE**

A validação de um método perdura desde que para cada um dos parâmetros estudados, os resultados obtidos cumpram os critérios estipulados. A verificação em rotina desses parâmetros corresponde ao último patamar da hierarquia associada à qualidade que um método analítico deve respeitar (Bansal et al. 2004), Figura 13. O controlo da qualidade não é mais do que a compilação e tratamento estatístico dos resultados obtidos de uma série de técnicas operacionais que permitem garantir com exatidão e precisão um resultado analítico.



**Figura 13.** Triângulo da qualidade para os dados analíticos, adaptado de Bansal et al (2004).

De acordo com os resultados obtidos no estudo de validação do método, foi alcançado o objetivo inicialmente proposto. O método satisfaz as necessidades em relação à precisão, exatidão, linearidade e homogeneidade do intervalo de trabalho, estando pronto para entrar em rotina no Laboratório do IDAD.

No sistema de qualidade para uma metodologia analítica, o controlo da qualidade é definido como toda a ação sistemática necessária para garantir, com o máximo de confiança, os resultados obtidos. Com base neste princípio para a metodologia de determinação do HCl (IDAD 2011), encontram-se definidos na instrução de trabalho do método em causa todos os requisitos inerentes ao controlo qualidade. Estes estão



resumidos a seguir sendo definidos com base nos documentos (GUIDE 2002, ISO/TS 13530 2009, Masson 2007 e IPAC 2010).

### 1. Curva de Calibração

O estudo da linearidade deve ser efetuado por cada sessão de trabalho e aplicando no mínimo três padrões. O controlo da linearidade deve ser efetuado através de: Coeficiente de correlação,  $r \geq 0,995$ . Resíduos inferiores a 10% relativamente ao valor estimado, Tabela 18.

**Tabela 18.** Avaliação dos resíduos no ensaio realizado a 21 de setembro de 2011.

Conc. Padrão (ppm)	$t_R$ (min)	Área do Pico	Resíduos %	Equação da reta		
0,15	4,83	87943	2	Gama Baixa	Declive	3,83E+05
0,2	4,827	109313	4			
0,4	4,83	177318	-2		Ordenada	2,86E+04
0,6	4,827	252995	-2			
0,8	4,823	333669	0		$r^2$	9,99E-01
1	4,827	415976	1			
1	4,827	415976	1	Gama Média	Declive	4,41E+05
2	4,827	834494	1			
4	4,827	1662139	-3		Ordenada	5,78E+04
6	4,83	2557277	-1			
8	4,837	3461665	0		$r^2$	1,00E+00
10	4,833	4383065	1			
10	4,84	442057	2	Gama Alta	Declive	4,86E+04
15	4,847	666078	-2			
20	4,843	915414	-1		Ordenada	5,09E+04
25	4,85	1174353	1			
30	4,85	1413368	1		$r^2$	1,00E+00
35	4,857	1635856	-1			
40	4,86	1896216	0			

- a. Declive da curva: aceitação com base nos limites de controlo calculados a partir da carta de controlo de indivíduos, Figura 14 a Figura 16.

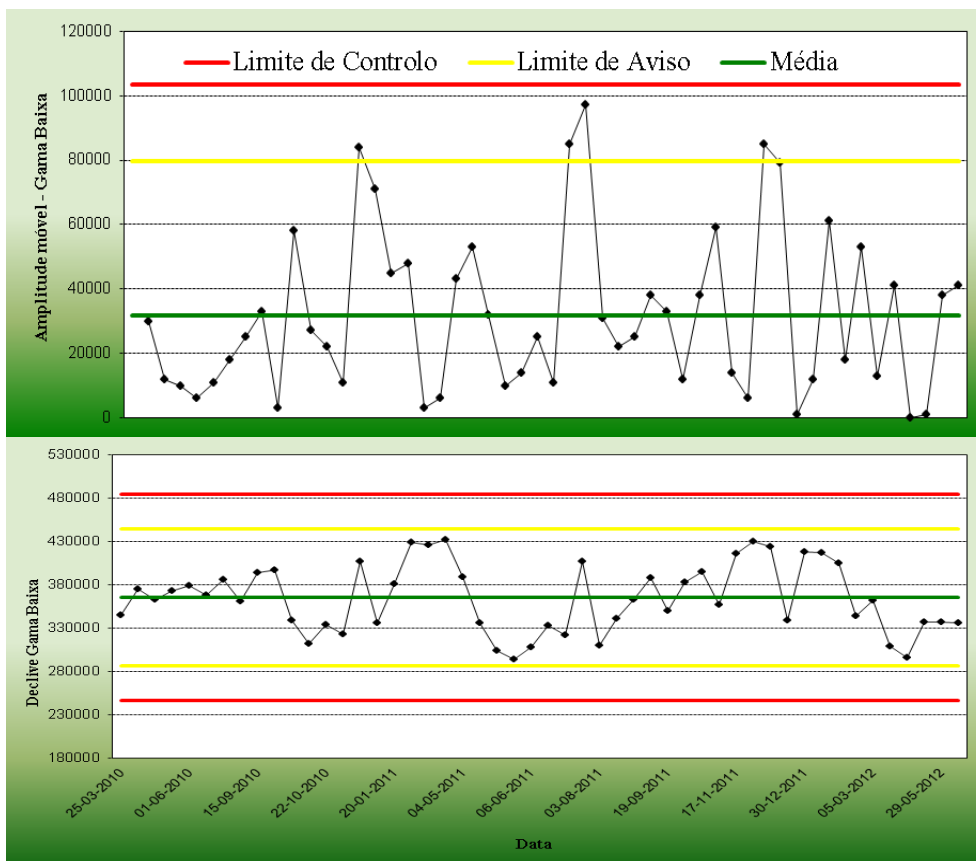


Figura 14. Carta de controlo de amplitudes e indivíduos para o declive da gama baixa.

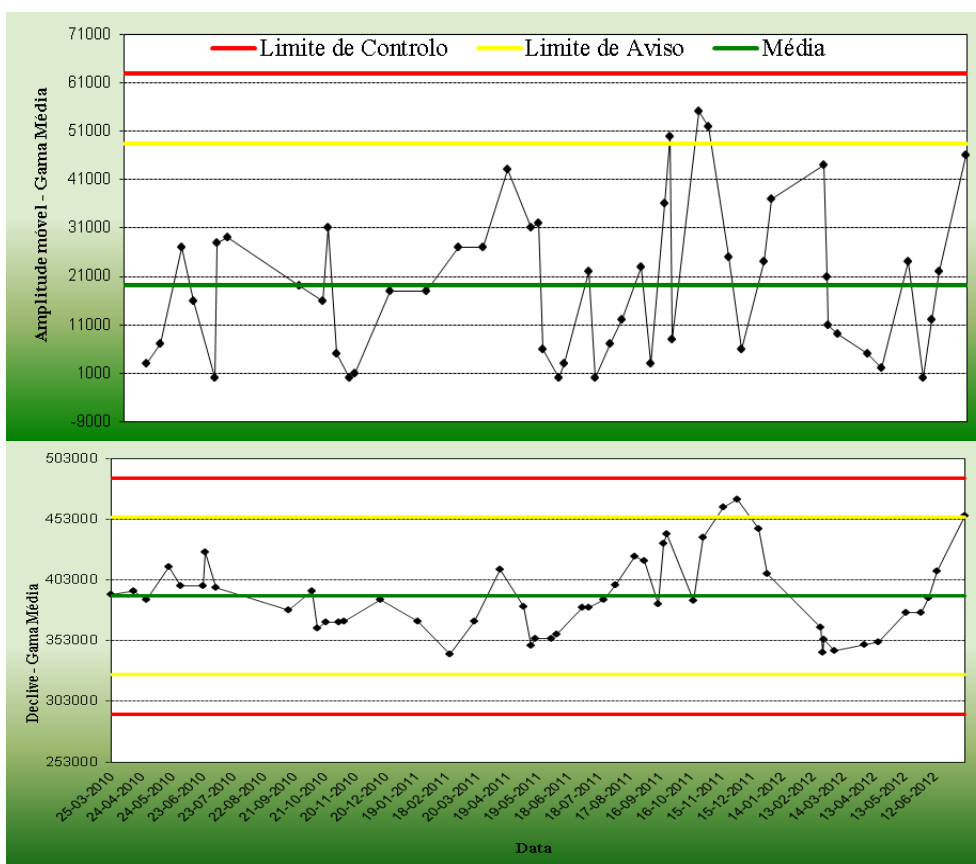
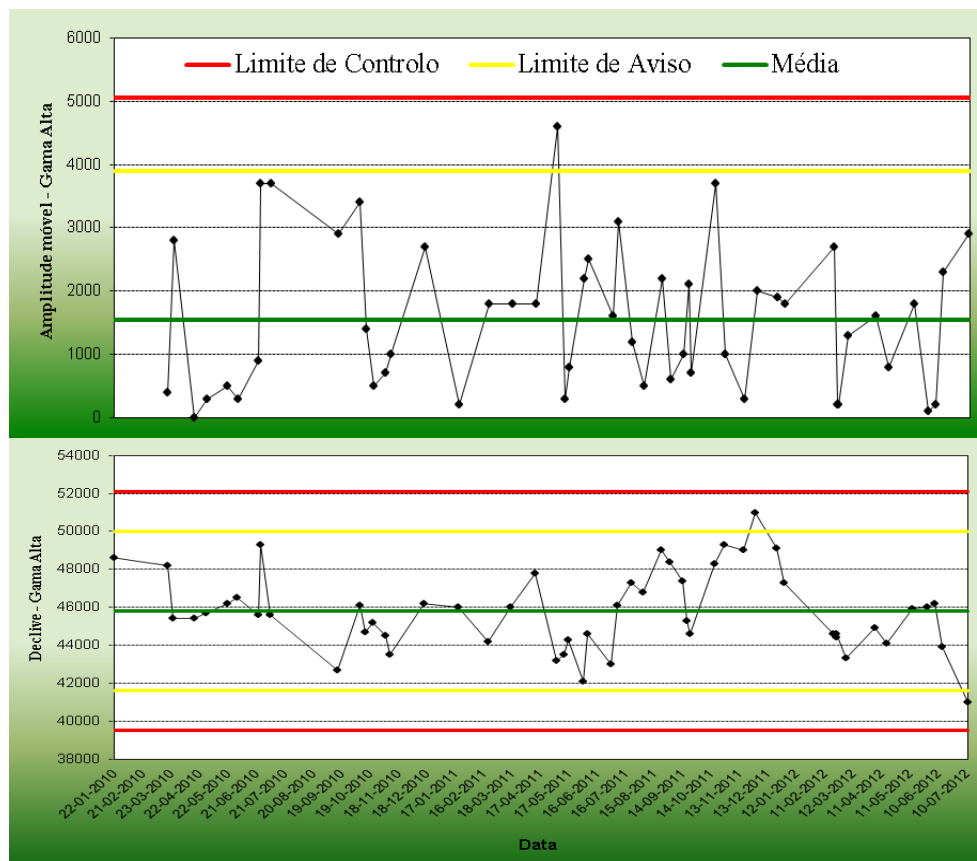


Figura 15. Carta de controlo de amplitudes e indivíduos para o declive da gama média.



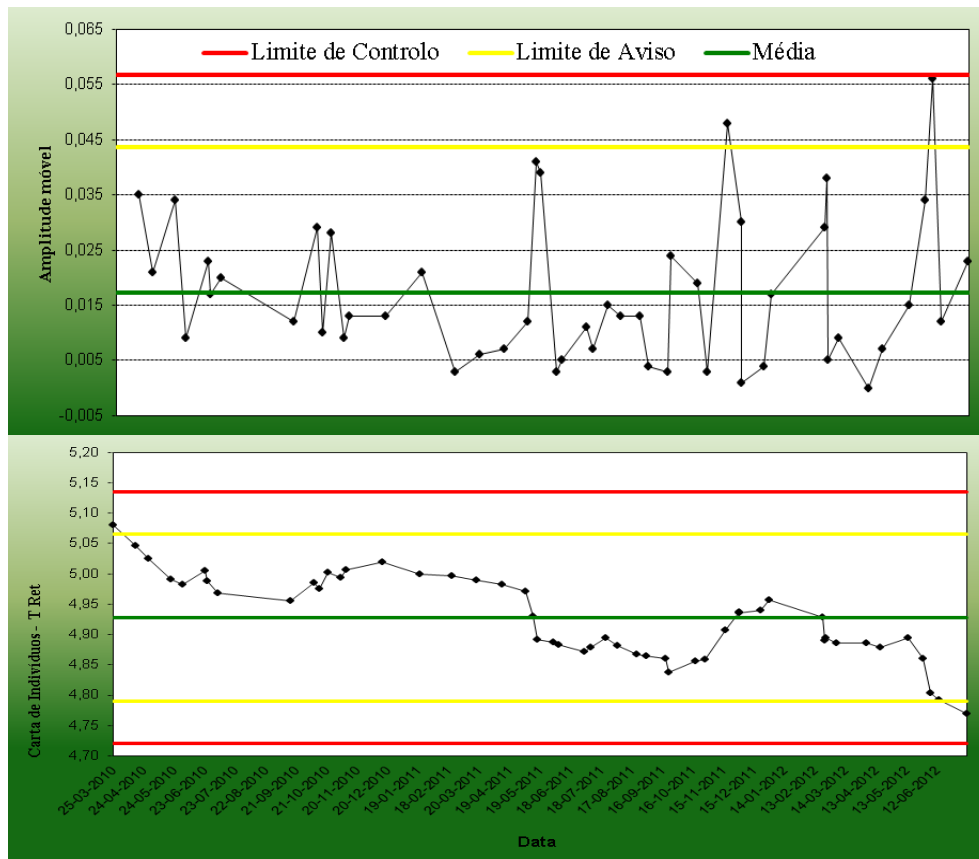
**Figura 16.** Carta de controlo de amplitudes e indivíduos para o declive da gama alta.

b. Coeficiente de variação dos tempos de retenção - deve ser inferior a 2%, Figura 17.

No caso do não cumprimento dos critérios de aceitação da curva, repetir a calibração e se necessário a preparação dos padrões de calibração.

Para análises em que a sua conclusão seja realizada no dia seguinte à preparação da curva de calibração, é possível trabalhar com a mesma curva de calibração desde que:

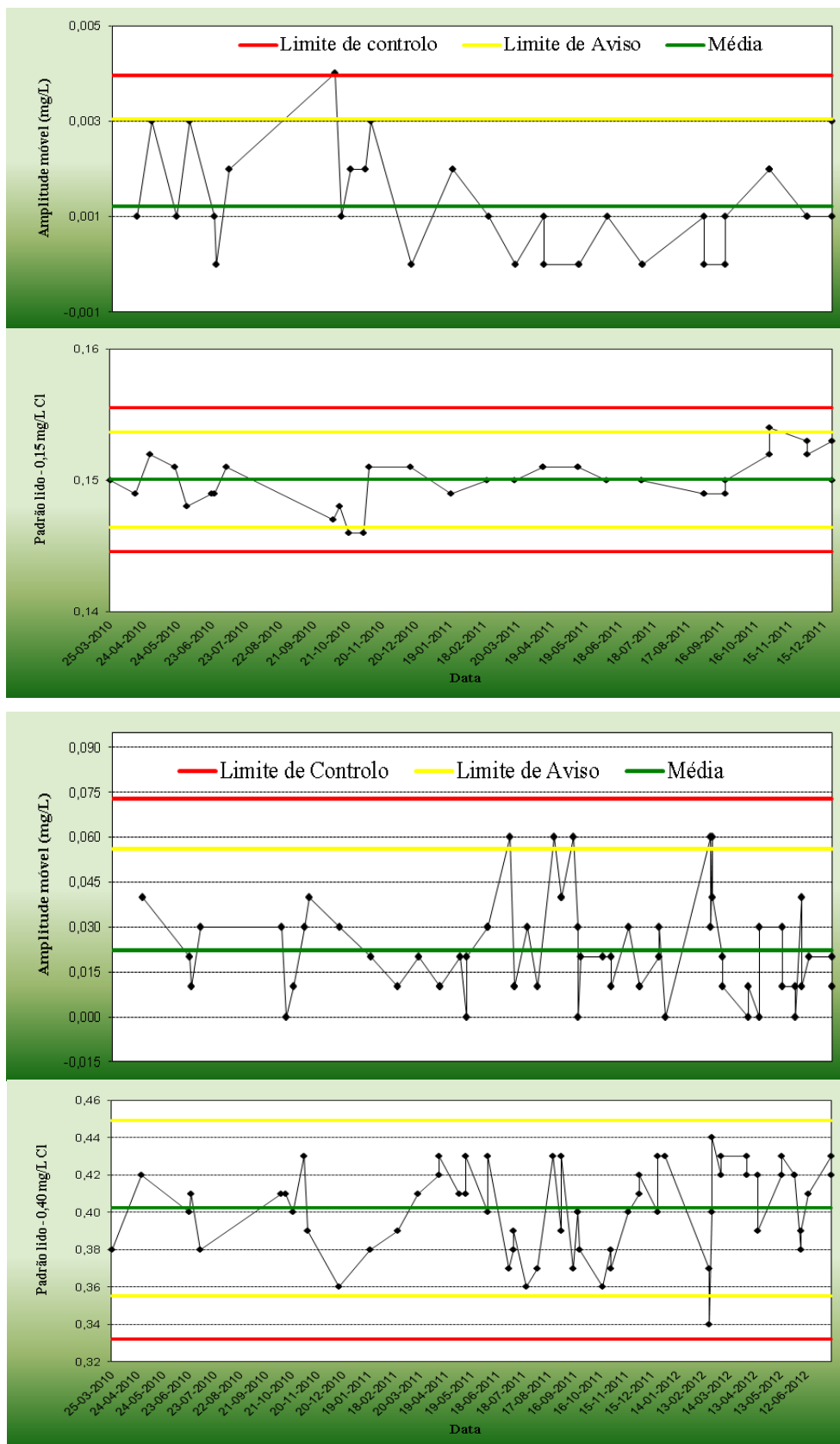
- a. Seja verificada a validade da calibração em vigor, isto é, devem ser analisados os 2 pontos extremos da reta para cada gama e deve-se observar se o declive obtido está compreendido nos limites de controlo calculados.
- b. O branco no caso de gama baixa seja inferior ou igual ao LD.
- c. Os tempos de retenção apresentem um desvio até 5 % face ao dia anterior, Figura 17.
- d. As amostras de matrizes sejam conhecidas.
- e. A análise dos padrões de controlo cumpra os requisitos estabelecidos no item indicado a seguir.



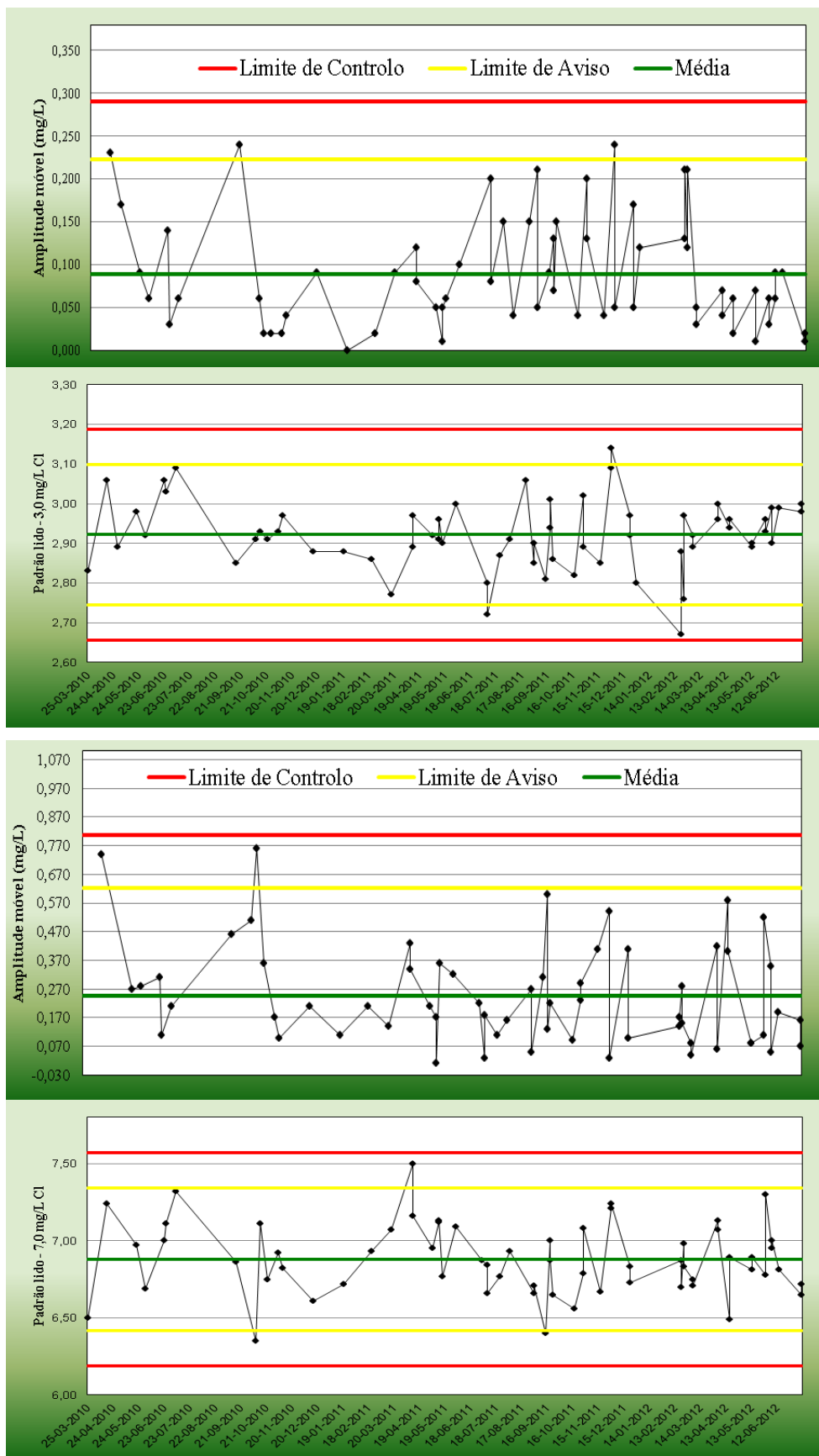
**Figura 17.** Carta de Controlo de Amplitudes e Indivíduos para o tempo de retenção para o ião cloreto.

## 2. Padrões de Controlo

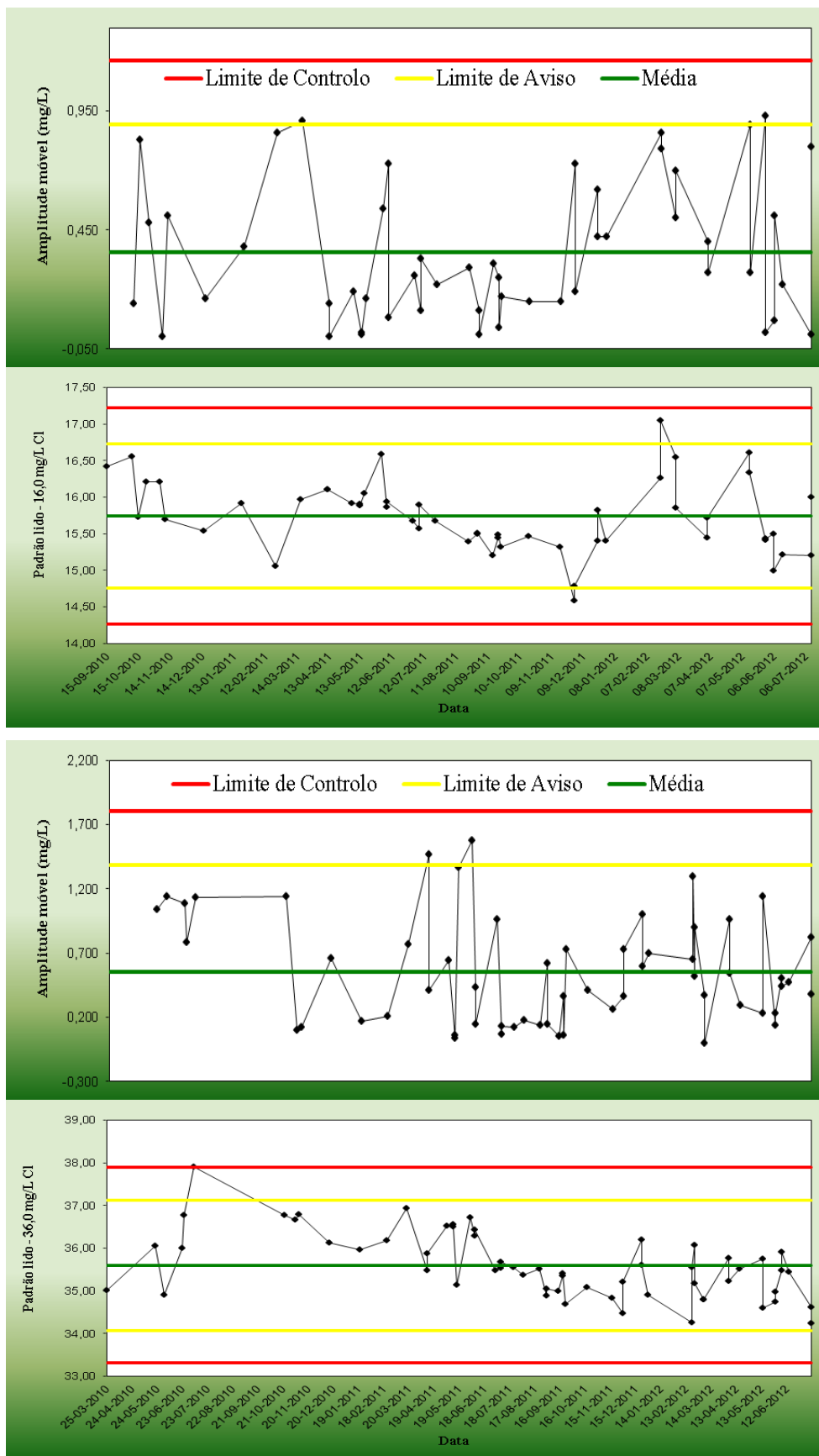
Os padrões de controlo são preparados a partir de soluções adquiridas de 100 mg/L e de lote diferente do das soluções utilizadas na construção da reta de calibração. Devem-se analisar os padrões de controlo por cada série de 15 amostras. O Critério de Aceitação é de 10% do valor esperado. No caso de todos os resultados obtidos não cumprirem o critério de aceitação estabelecido, realizar novas soluções padrão. Pontualmente é avaliada a tendência das leituras, Figura 18 a Figura 20.



**Figura 18.** Tendência da leitura do padrão de controlo de verificação do limite de quantificação (0,15 mg/L CI) e o padrão intermédio da gama baixa (0,40 mg/L CI).



**Figura 19.** Tendência da leitura do padrão de controlo da gama média (3,0 e 7,0 mg/L Cl).



**Figura 20.** Tendência da leitura do padrão de controle da gama alta (16,0 e 36,0 mg/L Cl).

Do estudo do histórico das leituras dos padrões de controlo, é possível estabelecer o critério de apresentação dos resultados analíticos em termos de casas decimais. As casas decimais são definidas a partir do algarismo incerto obtido da avaliação de 2 vezes o desvio padrão da leitura dos padrões em condições de reprodutibilidade.

**Tabela 19.** Definição das casas decimais.

<b>Data</b>	<b>Padrão 0,15</b>	<b>Padrão 0,4</b>	<b>Padrão 3,0</b>	<b>Padrão 7,0</b>	<b>Padrão 16,0</b>	<b>Padrão 36,0</b>
<b>Média</b>	0,15	0,40	2,93	6,92	15,84	35,96
<b>Desvio</b>	0,002	0,02	0,10	0,25	0,34	0,78
<b>CV, %</b>	1,15	4,89	3,25	3,65	2,13	2,16
<b>ER, %</b>	0,08	0,66	2,19	1,08	0,99	0,11
<b>2*<math>\delta</math></b>	0,003	0,04	0,2	0,5	0,7	1,6
<b>Casas decimais</b>	3	2	1	0	0	0

Os resultados serão apresentados com uma casa decimal para a gama baixa e média e sem casa decimal para resultados obtidos a partir da gama alta.

### **3. Branco**

Realizar no mínimo um branco por cada série de 15 amostras analisadas. O valor obtido em concentração deve ser inferior ao limite de deteção.

No caso do não cumprimento dos critérios de aceitação, realizar novo branco. Se se continuar a obter concentrações acima do limite, deve-se avaliar a pertinência de subtrair o valor do branco às amostras. Discutir o procedimento a adotar com o responsável do laboratório. Informar o cliente sobre os procedimentos adotados.

### **4. Duplicados**

Realizar no mínimo 1 amostra em duplicado por cada 15 amostras analisadas ou um duplicado por sessão de trabalho. Para amostras na gama entre o limite de deteção e 10 vezes o limite de deteção, o critério de aceitação (diferença relativa dos duplicados) é inferior ou igual a 20%. Para amostras na gama compreendida entre o valor superior a 10 vezes o limite de deteção e o maior padrão da gama de trabalho, considerar como critério de aceitação (diferença relativa dos duplicados) o valor inferior ou igual a 10%, Figura 21. Quando houver um histórico de dados suficiente, o critério de aceitação será estabelecido com base nos limites de controlo. Para amostras em que o teor em analito seja inferior ao LQ, realizar o ensaio de duplicado com a amostra fortificada.



O resultado final da amostra analisada em duplicado é a média aritmética dos dois resultados obtidos, desde que a diferença entre eles cumpra os critérios de aceitação definidos. No caso de a diferença não cumprir os critérios de aceitação definidos, repetir a análise em duplicado.

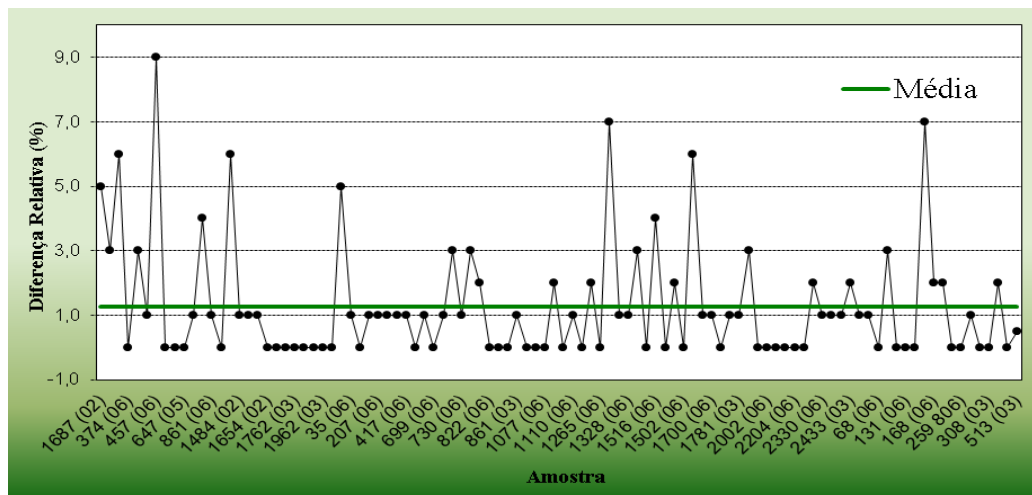


Figura 21. Diferença relativa de duplicados de amostras (período de Janeiro de 2010 a Julho de 2012).

### 5. Limiar analítico

O limite de quantificação é calculado com base no primeiro padrão da curva de calibração com avaliação da precisão (através do coeficiente de variação, CV, expresso em percentagem) e da exatidão (através do erro relativo, ER, expresso em percentagem) de um conjunto de pelo menos 10 leituras desse padrão.

Ambos os parâmetros de avaliação (ER e CV) devem ser  $\leq 10\%$ .

Pelo menos uma vez por ano, deve-se avaliar se existem tendências ao nível do LQ, Figura 18. A partir da verificação prática do LQ, é possível determinar o Limite de Detecção do Método (LDM) (Schibler 2007).

$$LDM = t\delta$$

Sendo: t – valor t-student para 95% e n-1 graus de liberdade;  $\delta$  – desvio padrão da análise das réplicas.

**Tabela 20.** Limite de detecção do método.

<b>Data</b>	<b>Conc. Obtida (mg/L)</b>
25-03-2010	0,150
16-04-2010	0,149
29-04-2010	0,152
21-05-2010	0,151
01-06-2010	0,148
23-06-2010	0,149
25-06-2010	0,149
06-07-2010	0,151
08-10-2010	0,147
14-10-2010	0,148
22-10-2010	0,146
04-11-2010	0,148
09-11-2010	0,151
15-12-2010	0,151
20-01-2011	0,149
21-02-2011	0,150
17-03-2011	0,150
11-04-2011	0,151
11-04-2011	0,151
12-05-2011	0,151
12-05-2011	0,151
06-06-2011	0,150
07-07-2011	0,150
07-07-2011	0,150
31-08-2011	0,149
31-08-2011	0,149
19-09-2011	0,149
19-09-2011	0,150
28-10-2011	0,152
28-10-2011	0,154
30-11-2011	0,153
30-11-2011	0,152
22-12-2011	0,153
22-12-2011	0,150
<b>n</b>	34
<b>Média</b>	0,150
<b>Desvio</b>	0,002
<b>t</b>	2,035
<b>LDM</b>	<b>0,003</b>

## **6. Ensaio de Recuperação**

Realizar no mínimo uma amostra fortificada por cada série de 15 amostras analisadas.

O procedimento de fortificação deve obedecer aos seguintes critérios: adicionar concentrações do analito entre 2 a 5 vezes a concentração presente na amostra; para amostras em que não se observa o analito, a fortificação não deve ser superior a 5 vezes o limite de detecção do método. Para amostras concentradas, diluir a amostra para que a

sua fortificação se encontre na gama de trabalho. Sempre que possível, limitar a adição do padrão a 5%, ou menos, do volume da amostra. No caso de a amostra ter um teor inferior ao limiar analítico, calcular a % de recuperação substituindo a concentração da amostra por zero e pelo limiar analítico, expressando o resultado na forma de intervalo. O critério de aceitação para a % de recuperação é de 80-120 %. Quando a percentagem de recuperação falha o critério de aceitação e a performance do laboratório para o analito está sob controlo, pode-se concluir que a matriz tem influência nos resultados da amostra e o valor obtido deve ser corrigido. Caso contrário, repetir o procedimento de modo a cumprir o critério definido.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A validação é um processo base para avaliar se o método a implementar é adequado aos objetivos a que se destina, tendo em vista a obtenção de resultados confiáveis e reproduzíveis noutros laboratórios. Por outro lado, a validação permite o conhecimento dos limites e da garantia dos resultados das análises.

Dependendo do objetivo da metodologia e dos meios disponíveis do laboratório, alguns dos parâmetros apresentados podem deixar de ser avaliados. Contudo, as linhas orientadoras estabelecidas pelas entidades e em particular pelo IPAC, estabelecem que a exatidão e a precisão do método devem ser sempre avaliados, exceto para métodos com objetivos apenas qualitativos. Deve-se ressaltar que o método pode ser considerado validado mesmo que alguns dos parâmetros não se enquadrem nos requisitos estabelecidos, no entanto deve-se sempre avaliar a *performance* do método.

Neste trabalho efetuou-se o estudo da validação dos métodos de análise de HCl em amostras de efluentes gasosos. O estudo consistiu na determinação de diversos parâmetros tais como gama de trabalho, limites de quantificação e deteção e exatidão.

Os dados obtidos permitem concluir que o método é seletivo e específico para o analito em causa, ião cloreto. O limite de deteção está de acordo com o referencial normativo EN1911 de 2010. Por outro lado, a metodologia apresenta precisão dentro dos critérios estabelecidos (%CV igual a 10) e pelos ensaios interlaboratoriais o desempenho da metodologia/laboratório é satisfatório, sendo o Z-Score inferior a 3 para qualquer matriz.

O método em rotina continua a comportar-se dentro dos critérios estipulados inicialmente, o que permite concluir, face a condições aleatórias como por exemplo erros associados na preparação de padrões de calibração, variação da temperatura do laboratório com implicações ao nível da viscosidade do eluente comprometendo a performance da eluição, que o método é robusto.

Embora os custos associados para a implementação e manutenção de uma metodologia analítica como a cromatografia iónica sejam elevados quando comparado com outras metodologias que permitem determinar o mesmo analito, nomeadamente a titulometria e potenciometria. O preço do fator qualidade do resultado supera o peso da sustentabilidade económica, nomeadamente em termos de seletividade e sensibilidade da técnica instrumental. Cabe ao laboratório arranjar estratégia de rentabilização da metodologia implementada. Na sequência deste objetivo, o mesmo sistema instrumental

(equipamento e coluna) aplica-se hoje em dia em amostras para além dos efluentes gasosos, nomeadamente águas residuais (pouco contaminadas), água natural e amostras de ar ambiente exterior.

Considero que a principal conclusão do trabalho é o seguinte princípio: "A garantia da qualidade de uma metodologia analítica passa, sem dúvida, pelo conhecimento exaustivo do método a aplicar sendo, para isso, necessário realizar a Validação".

## **BIBLIOGRAFIA**

Aboul-Enein, H. Y. 2000. Selectivity versus specificity in chromatographic analytical methods. *Accreditation and Quality Assurance: Journal for Quality, Comparability and Reliability in Chemical Measurement* 5 (5):180-181.

Alcaide, R. L. M., and Forti, M. C. 2011. *Validação de métodos analíticos do laboratório de aerossóis*

AORC 2011. *Guidelines for the Minimum Criteria for Identification by Chromatography and Mass Spectrometry*.

Bansal, S. K., T. Layloff, E. D. Bush, M. Hamilton, E. A. Hankinson, J. S. Landy, S. Lowes, M. M. Nasr, P. A. St. Jean, and V. P. Shah. 2004. *Qualification of analytical instruments for use in the pharmaceutical industry: A scientific approach*. *AAPS PharmSciTech* 5 (1).

CDER 1994. Validation of Chromatographic Methods. *Center for Drug Evaluation and Research*.

Comissão Europeia. 2002. *Jornal Oficial das COUNIDADES Europeias*, 8-36.

Decreto Lei 78/04 -*Diário da República-I Série-A* de 03 de Abril de 2004.

EN 1911 2010. *Stationary source emissions - Determination of mass concentration of gaseous chlorides expressed as HCl - Standard reference method*, edited by C.-C. E. d. Normalisation: CEN, 1-46.

EPA 2010. *Pollutants in Ambient Air*.

EURACHEM 2011. *Terminology in Analytical Measurement - Introduction to VIM 3*.

EURACHEM 1998. The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics.

EURACHEM/CITAC 2000. Guide CG 4: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement.

EuroLab 2007. Technical Report No. 1: Measurement uncertainty revisited: Alternative approaches to uncertainty evaluation.1-62.

Fritz, J. S., and D. T. Gjerde. 2009. *Ion Chromatography*: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, I-XV.

GUIDE, C. E. 2002. *Guide to Quality in Analytical Chemistry - An Aid to Accreditation*.1-57.

Haddad, P. R., and P. E. Jackson. 1990. *Ion Chromatography principles and applications*. edited by R. H. Paul. Vol. Volume 46: Elsevier.



Haddad, P. R. N., Pavel N. Buchberger, Wolfgang. 2008. *Recent developments and emerging directions in ion chromatography*. *Journal of Chromatography A* 1184 (1-2): 456-473.

Hoolihan, D. D. 1999. *The Evolution of Guide 25 into ISO Standard 17025 Compliance Engineering* 1999 Annual reference guide.

Huber, D. L. *Laboratory Equipment Qualification and System Validation* 2012 [cited. Available from <http://www.labcompliance.com/tutorial/aiq/default.aspx>].

Huber, L. 2010. *Validation of Analytical Methods*. Agilent Technologies.

Hubert, P., P. Chiap, J. Crommen, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Mercier, S. Bervoas-Martin, P. Chevalier, D. Grandjean, P. Lagorce, M. Lallier, M. C. Laparra, M. Laurentie, and J. C. Nivet. 1999. *The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory*. *Analytica Chimica Acta* 391 (2):135-148.

Hubert, P., J. J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P. A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L. Valat, and E. Rozet. 2007. *Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal – Part II*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 45 (1):70-81.

IDAD 2011. IT921 - Determinação de HCl em efluentes gasosos.

INFARMED 2008. *Normas orientadoras sobre Boas Práticas de Fabrico Medicamentos para uso Humano e Veterinário inspeção-fabricantes: Eudralex*.

INMETRO 2007. *Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos*. DOQ-CGCRE-008.

IPAC 2007 OGC007: *Guia para a quantificação de incerteza em ensaios químicos*.

IPAC 2010 OGC001: *Guia para a aplicação da NP EN ISO/IEC 17025*.

IPAC 2011. OGC002: *Guia para a Acreditação de Laboratórios químicos*.

IPAC 2012 DR005: *Procedimento para acreditação de laboratórios*.

Isabel Taverniers , M. D. L., Erik Van Bockstaele. 2004. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends in Analytical Chemistry* 23 (8):535-552.

ISO 5725-2. 1994. *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method*.

ISO 8466-1. 1990. *ISO8466-1 Water Quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics*, 1-12.

ISO/IEC 17025, N. E. 2005. *Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração*: IPQ - Instituto Português da Qualidade, 1-40.

ISO/TS 13530. 2009. *Water quality - guidance on analytical quality control for chemical and physicochemical water analysis*. Switzerland, 1-38.

Kaminski, L., M. Degenhardt, J. Ermer, C. Feußner, H. Höwer-Fritzen, P. Link, B. Renger, M. Tegtmeier, and H. Wätzig. 2010. *Efficient and economic HPLC performance qualification*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51 (3):557-564.

Máire C, W. 1999. *Moving from official to traceable methods*. *Trac Trends in Analytical Chemistry* 18 (9–10):616-623.

Majors, R. E. 2006. *Fast and Ultrafast HPLC on sub-2 µm Porous Particles LC GC Europe* 19 (6).

Masson, P. 2007. *Quality control techniques for routine analysis with liquid chromatography in laboratories*. *Journal of Chromatography A* 1158 (1–2):168-173.

Michael Thompson, R. W. 1995. *Harmonized guidelines for internal quality control in analytical chemistry laboratories* *Pure and Applied Chemistry* 67 (4):649-666.

Michael Thompson, S. L. R. E. a. R. W. 2002. *Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report)*. *Pure and Applied Chemistry* 74:835-855.

Michael Thompson, S. L. R. E., Roger Wood. 2006. *The International Harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories*. *Pure Appl. Chem* 78 (1):145-196.

Nordtest. 2003. *Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories*.1-52.

Papadoyannis, I. N., and V. F. Samanidou. 2005. *Validation of HPLC Instrumentation*. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 27 (5):753-783.

Paschoal, J. A. R., S. Rath, F. P. d. S. Airoidi, and F. G. R. Reyes. 2008. *Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos*. *Química Nova* 31:1190-1198.

Q2(R1)-Guideline. 2005. *Validation of analytical procedures: text and methodology*. *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use*:1-13.

RELACRE 2000. *Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*: RELACRE nº 13.

Ribani, M., C. B. G. Bottoli, C. H. Collins, I. C. S. F. Jardim, and L. F. C. Melo. 2004. *Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos*. *Química Nova* 27:771-780.

Ribeiro, F. A.; Ferreira, M. M.; Morano, S. C.; Silva, L. R.; Schneider, R. P. 2008 *Planilha de validação: Uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados*. *Química Nova*, 31:164-171.

Sarah K, B. 2005. Guidelines from the International Conference on Harmonisation (ICH). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 38 (5):798-805.

Schibler J.; Moore D.; and Borba B. 2007. *Setting Meaningful Detection and Quantitation Limits for Chromatography Methods*. Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA.

Silva, A. d. P., and M. C. C. Alves. 2006. Como iniciar a validação de métodos analíticos. *Congresso e Feira da Qualidade em Metrologia, ENQUALAB 2006*. São Paulo.

SMEWW. 2010. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* edited by 21th. Vol. 1020 B. Quality Control.

Smith, P. 2007. *Trends in analytical Instruments Qualification*. *BioProcess International*, 30-38.

Snyder, L. R. 1997a. Modern Practice of Liquid Chromatography: Before and after 1971. *Journal of Chemical Education* 74 (1):37.

Snyder, L. R., Kirkland, J.J., Glajch, J.L. 1997b. *Practical HPLC Method Development*. edited by 2: New York: Wiley.

Swartz, I. K. a. M. 2002. *Operational and Performance Qualification*. *LC GC North America* 20 (4):356-362.

VIM. 2008. *Vocabulário Internacional de Metrologia. Guia ISO/IEC 99: IPQ*.

Weiss, J. 1995. In *Handbook of Ion Chromatography*: Wiley-VCH Verlag GmbH.

WHO. 1992. *Technical Report Series*.

## **ANEXO I – COMPOSIÇÃO DO SISTEMA DE QUALIDADE EM PORTUGAL**

Os principais requisitos do SPQ incluem a credibilidade, adesão voluntária, abertura, aplicação geral, não exclusividade, gestão integrada e descentralização. Estruturalmente, o SPQ está organizado em três subsistemas: Qualificação, Metrologia e Normalização.

A entidade que gere o sistema da qualidade é o IPQ, sendo este responsável pela gestão de laboratórios de calibração e de ensaio, pela gestão do sistema de acreditação de organismos de certificação e de inspeção, pela gestão de verificadores ambientais, BPL, etc.

O subsistema de Acreditação consiste no reconhecimento formal, por um organismo autorizado – IPAC, da atribuição da competência a uma entidade para efetuar uma determinada atividade de caráter técnico, no âmbito dos requisitos técnico e de gestão.

O subsistema Certificação consiste no desenvolvido de um processo de gestão com vista a garantir, com credibilidade, a conformidade de um produto, processo ou serviço, com os requisitos especificados em documentos de referência no âmbito dos requisitos de gestão. Neste âmbito enquadram-se as seguintes categorias: Qualidade, Gestão ambiental, Gestão da segurança, Produtos, Serviços e Pessoas. No âmbito da metrologia legal, o IPQ é responsável pela gestão de um sistema de avaliação e acompanhamento dos organismos de verificação metrológica, nomeadamente o Laboratório Central de Metrologia e o Serviço de Metrologia Legal. Coordena também outros laboratórios primários, verifica o cumprimento das cadeias hierarquizadas de padrões (rastreadibilidade), sendo ainda o representante nacional da metrologia científica e industrial perante a comunidade científica internacional. O IPQ coordena o subsistema de normalização definindo, nomeadamente, o Programa Anual de Normalização, responsável por designar peritos nacionais para a formação de grupos de trabalho, cujo objetivo é o de debaterem e desenvolverem as linhas orientadoras da normalização europeia e internacional, para a votação de documentos normativos e para a aprovação das normas.

O subsistema da Normalização consiste na elaboração de normas portuguesas e outros documentos normativos, no âmbito nacional, europeu e internacional. O IPQ gere as comissões técnicas de normalização e coordena organismos com funções de normalização sectorial. As diferentes comissões técnicas são identificadas como:

CNQ 1 - Normas Portuguesas. Regras Gerais para a sua apresentação.

CNQ 2 - Comissões Técnicas Portuguesas de Normalização. Criação e funcionamento.

CNQ 3 - Normas Portuguesas. Procedimentos para a sua aprovação ou adoção.

CNQ 4 - Organismos com funções de normalização sectorial. Reconhecimento da qualificação.

Por outro lado, o IPQ presta a sua colaboração, em conjunto com os organismos sectoriais de normalização, na qualificação de peritos nacionais e na participação nos trabalhos dos comités técnicos do CEN/CENELEC e ISO/IEC

**ANEXO II – QUALIFICAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS PARA FINS  
ANALÍTICOS**

A aplicabilidade dos diferentes níveis avaliação (Qualificação de Design (QD); Qualificação da Instalação (QI); Qualificação Operacional (QO); Qualificação de Desempenho (QD)) depende do tipo de instrumento. O documento 1058 da USP, divide os equipamentos em três categorias:

Grupo A: equipamentos simples por exemplo, agitadores;

Grupo B: equipamentos de leitura direta, como por exemplo: balanças, termômetros, medidores de pH, entre outros;

Grupo C: equipamentos sofisticados, a maioria dependentes de dispositivos periféricos como os computadores, encaixando-se nesta categoria a cromatografia, absorção atômica, etc.

### Qualificação de Design

São ensaios/testes realizados pelo fabricante de forma a documentar as características do sistema desenvolvido com base nos objetivos que pretende atingir (tipo de ensaios, amostras, especificações das normas) e as respectivas comparações com diversos produtos existentes no mercado. É uma etapa inteiramente da responsabilidade do fabricante, mas em que o utilizador não deve ignorar a informação fornecida com vista a seleccionar o equipamento para a finalidade pretendida (Kaminski et al. 2010).

### Qualificação de Instalação

Esta fase de qualificação corresponde à etapa para a qual o instrumento é recebido, verificado e instalado no ambiente laboratorial. O utilizador, após a receção do equipamento, deve proceder às seguintes verificações (Papadoyannis and Samanidou 2005):

A ordem de compra vai de encontro ao produto rececionado;

O equipamento é acompanhado dos diversos documentos de suporte (manuais);

É acompanhado pelo dispositivo de instalação do *software*;

É acompanhado pelos acessórios de instalação;



A instalação do equipamento, *hardware*, *software* e periféricos são feitos pelo técnico da marca;

É feita a configuração do *software*;

É realizado um *back-up* do *software*;

### Qualificação Operacional

Corresponde à etapa de testes para demonstrar que o sistema como um todo funciona de acordo com as especificações funcionais indicadas pelo fabricante. É um processo que se repete sempre que há intervenção durante as manutenções e que pode ser realizado pelo utilizador ou pelo técnico de manutenção (Papadoyannis and Samanidou 2005).

### Qualificação de desempenho

Corresponde à etapa de testes e verificações do instrumento realizadas antes e durante o seu uso rotineiro do equipamento, de forma a assegurar que todo o sistema gera resultados válidos. Esta avaliação é alcançada com ensaios experimentais para os quais é avaliada a exatidão e a precisão dos resultados.