USP - Universidade de São Paulo

Sergio Pereira da Costa

Aplicação de ferramentas da qualidade no desenvolvimento de métodos multiresíduos.

São Carlos

2012

Aplicação de ferramentas da qualidade no desenvolvimento de métodos multiresíduos.

Sergio Pereira da Costa

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos, da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências (Química Analítica).**

Orientador: Prof. Dr. Igor Renato Bertoni Olivares

São Carlos

2012

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO OU PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

DEDICATÓRIA

À minha família que me deu suporte em todas minhas decisões e nunca deixaram de confiar em mim. Dedico a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para que este trabalho fosse realizado da melhor forma possível.

AGRADECIMENTOS

- A minha família por sempre apoiar minhas iniciativas de aprendizado e meus projetos de vida;
- Ao Prof. Dr. Igor Renato Bertoni Olivares pelo apoio e paciência;
- A todos meus amigos que participaram diretamente ou indiretamente deste projeto, em Especial ao Rodrigo N. Padovan e a Daniela Cordeiro;
- Um agradecimento Especial para o Prof. Dr. Vitor H. P. Paces, pelos conselhos concedidos e para a Prof(a) Dr(a) Ana Maria G. Peplis pelo auxílio financeiro no início do projeto;
- Aos Funcionários que me auxiliaram e tiveram uma enorme paciência em todas minhas dúvidas, Shirley, Andréia, Silvia, Gustavo, Marcos, Vanessa e Jeferson;
- Aos técnicos dos laboratórios do Instituto de Química pelas ajudas concedidas, Valdecir, Renata, Cida e Guto;
- A equipe da Oficina Mecânica e Vidraria;
- A toda equipe da biblioteca, em especial para a Bernadete.
- Ao Prof. Dr. Eduardo Bessa, Prof. Dr. Marcos Lanza e a Prof(a) Dr(a) Eny Maria pelo espaço e equipamentos concedidos para desenvolvimento do projeto, assim como para a Equipe do Lanagro - Campinas;
- A CAPES e a FAPESP pelo apoio financeiro, ao IQSC e a USP pelo apoio institucional;
- A todos que colaboraram, direta ou indiretamente, com este trabalho.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Ciclo da garantia da qualidade analítica. (adaptado de Olivares e Antunes, 2012).

Figura 2: (A). Fluxograma da Técnica QuEChERS desenvolvida por Anastassiades e Colaboradores em 2003. (B). Fotos ilustrativas do procedimento.

Figura 3: Gráficos da relação massa/recuperação com o volume de trabalho para analito com $K_{O/W} = 6,0$.

Figura 4: Esquema de refrigeração da fibra e sua aplicação em Cromatografia gasosa. (GHIASVAND; HOSSEINZADEH; PAWLISZYN, 2006).

Figura 5: Ciclo PDCA.

Figura 6: Etapas para realização de um ensaio em um laboratório enfatizando a parte que será desenvolvida no trabalho. Adaptado de Olivares, 2009.

Figura 7: Diagrama de Ishikawa para planejamento experimental da técnica QuEChERS.

Figura 8: Fluxograma do processo de trabalho para aplicação das ferramentas da qualidade.

Figura 9: (A) Extração da matriz pré-fortificada nas concentrações da faixa de trabalho; (B) Extração da matriz limpa com posterior fortificação do extrato com as concentrações na faixa de trabalho.

Figura 10: Diferença entre repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial para análise de precisão.

Figura 11: Gráfico (A): rampa de aquecimento da coluna inicia a 80°C/ 1,5 min., taxa de 40°C/min. até temperatura de 170°C, taxa de 6,5°C/min. até temperatura de 220°C/7,0 min., taxa de 15°C/min. até temperatura de 245°C e por fim taxa de 50°C/min. até temperatura de 265°C/4 min. Gráfico (B) fluxo do gás de arraste de 0,8 mL/min.

Figura 12: Cromatograma do método cromatográfico da melhor condição para separação dos 14 compostos organoclorados; tempo de retenção: HCB, 8,017 min.; LIN, 8,410 min.; ALD, 10,817 min.; HPX, 11,722 min.; tCLD, 12,350 min.; cCLD, 12,810 min.; ppE, 13,440 min.; DLD, 13,575 min.; PCB118, 14,723 min.; ppD, 14,990 min.; opT, 15,218 min.; ppT, 16,847 min.; PCB 180, 20,383 min.; MRX, 21,153 min.

Figura 13: (A) Curva analítica para o analito Antraceno; (B) Cromatograma representativo.

Figura 14: Chromatoprobe Varian – (A) Esquema do Chromatoprobe utilizado para dessorção térmica dos analitos da barra sortiva para o cromatógrafo; (B) Posicionamento da barra sortiva no Chromatoprobe; (C) Acoplamento do Chromatoprobe com a barra sortiva ao cromatógrafo.

Figura 15: Projeto para confecção do Molde. (A.) Suporte de teflon com o tubo oco de aço; (B.) suporte de teflon agregado ao molde de teflon; (C.) Esquema da barra de SBSE ou RSE com suas dimensões para utilização em PROBE; (D.) vista do molde com seus dois lados juntos; (E.) molde já com o sistema de travas para confecção das barras. Adaptado de Grossi, 2009.

Figura 16: Molde já finalizado: (a) Dois lados do molde e suporte de teflon; (b) Suporte com barra ou tubo oco de aço; (c) suporte de teflon agregado ao molde; (d) vista lateral do conjunto; (e) vista superior do conjunto; (f) Suporte com a barra de RSE já revestida com PDMS; (g) barra de RSE.

Figura 17: Sistema RSE. (A) Tubo oco revestido com a fase PDMS no suporte de teflon; (B) Suporte de Teflon do vial Headspace com o tubo de RSE; (C) Vial de headspace com braços laterais, suporte e tubo de RSE; (D) Sistema RSE acoplado com sistema de refrigeração; (E) Sistema RSE com aquecimento de 85°C em agitador magnético; (F) Sistema RSE com vapor na fase de headspace.

Figura 18: Sistema de refrigeração da fase sortiva - (A) Cilindro de Gás; (B) Misturador de gases (*homemade*); (C) Conexão com o misturador de gases e mangueiras; (D) Esquema com a refrigeração da barra conectado a linha de gás; (E) Vial de headspace pronto para a extração; (F) Sistema completo.

Figura 19: Exemplo de pontos significativos e insignificativos, trabalhando com uma distribuição normal com a tabela de probabilidade Z score para observação dos pontos a um nível de confiança de 95%.

Figura 20: Gráfico dos efeitos de um planejamento 2^3 para o analito Mirex realizado em análise multiresíduo plotado em tabela Z-Score.

Figura 21: Gráfico de Pareto mostrando os efeitos para cada fator e suas interações para o analito Mirex.

Figura 22: Gráfico do quadrado dos fatores PSA e C18 para o Mirex, mostrando a melhor condição de trabalho para obter maior ganho de recuperação. Valores obtidos em duplicatas em um nível de confiança de 95%.

Figura 23: Efeitos de um planejamento 2^3 para o Conjunto Multiresíduo realizado pela função de Desejabilidade plotado em tabela Z-Score.

Figura 24: Gráfico de Pareto mostrando os efeitos para cada fator e suas interações para o Conjunto Multiresíduo.

Figura 25: Gráfico do quadrado dos fatores PSA e C18 para o Conjunto Multiresíduo, mostrando a melhor condição de trabalho para obter maior ganho de recuperação. Valores obtidos em duplicatas em um nível de confiança de 95%.

Figura 26: Cromatograma representativo das 10 amostras de pescado.

Figura 27: Sobreposição de amostra branca com amostra fortificada em 1 LMR: Linha amarela representa a matriz e a linha azul representa os analitos de trabalho.

Figura 28: Cromatograma da melhor condição do planejamento experimental.

Figura 29: Proposta de fluxograma para análise da linearidade da curva.

Figura 30: Curva de calibração do método com analito Antraceno com 7 pontos.

Figura 31: Gráfico de efeito contra probabilidade Z. Considerando como resposta o fator recuperação/massa PDMS.

Figura 32: Gráfico de pareto evidenciando os efeitos das interações de 1º, 2º e 3º ordem.

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Equação do coeficiente de partição PDMS/água.

Equação 2: Fórmula para cálculo da exatidão.

Equação 3: Fórmula para cálculo da constante de variação (CV).

Equação 4: Fórmula para cálculo da desejabilidade.

Equação 5: Fórmula para cálculo da incerteza da curva analítica.

Equação 6: Fórmula para cálculo da incerteza da recuperação.

Equação 7: Fórmula para cálculo da incerteza da precisão.

Equação 8: Fórmula para cálculo da incerteza combinada.

Equação 9: Fórmula para cálculo da incerteza expandida.

Equação 10: Fórmula para equação da curva linear.

Equação 11: Fórmula para cálculo do coeficiente de determinação.

Equação 12: Fórmula para cálculo dos resíduos da curva analítica.

Equação 13: Fórmula para cálculo de outlier – Teste de Grubbs.

Equação 14: Fórmula para cálculo da homoscedasticidade – Teste de Cochran.

Equação 15: Fórmula para cálculo a adequação do modelo linear – Teste da falta de ajuste.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Crescimento de laboratórios acreditados no sistema ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005.

Tabela 2: Parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio.

Tabela 3: Propostas para análise dos parâmetros da validação.

Tabela 4: Métodos Multiresíduos.

Tabela 5: Evolução das técnicas de headspace.

Tabela 6: Limites e níveis de tolerâncias de alguns países e normas como a EPA e a FDA para os Organoclorados de maior impacto em pescados.

Tabela 7: Avaliação da seletividade segundo a DOC-CGCRE-008 do INMETRO.

Tabela 8: Compostos organoclorados estudados.

Tabela 9: Proposta enviada a CCRC (Coordenação e Controle de Resíduos e Contaminantes).

Tabela 10: Dados de trabalho para os níveis do planejamento experimental da confecção da fase de extração em PDMS.

Tabela 11: Aleatorização dos experimentos pelo Software Statistica 7.

Tabela 12: Rampa de aquecimento proposta para a coluna DB-5 da Agilent.

Tabela 13: Planejamento experimental com os níveis baixos e altos distribuídos aleatoriamente para análise.

Tabela 14: área das recuperações da amostra branca fortificada sem a interferência da matriz.

Tabela 15: Recuperação dos 14 organoclorados de interesse realizado sobre a técnica QuEChERS e injetado em GC-ECD.

Tabela 16: tabela dos fatores para o composto Mirex (MRX) em nível baixo (-1) e nível alto (+1) com suas respectivas recuperações para cada experimento realizado aleatoriamente, foi disposto o experimento em ordem para melhor visualização dos dados.

Tabela 17: Cálculo dos efeitos de primeira (1,2 e 3), segunda (12,13 e 23) e terceira ordem (123).

Tabela 18: Condições de trabalho para os fatores PSA e C18.

Tabela 19: Analitos e significância de seus efeitos para um nível de confiança de 95% em ordem decrescente em módulo (Gráficos e Figuras ver Apêndice B).

Tabela 20: Desejabilidade (d_i) dos 14 organoclorados.

Tabela 21: Fatores em nível baixo (-1) e nível alto (1) com suas respectivas Desejabilidade para o experimento multiresíduo.

Tabela 22: Efeitos de primeira (1,2 e 3), segunda (12,13 e 23) e terceira ordem (123).

Tabela 23: Amostras de pescado para teste de seletividade.

Tabela 24: Resultados para Curva analítica utilizando métodos dos mínimos quadrados simples.

Tabela 25: Recuperações do dia 1, 2 (triplicata) e 3.

Tabela 26: Recuperação média e desvio padrão dos analitos de trabalho:

Tabela 27: Valores do Coeficiente de Variação (CV) para análise da precisão da técnica QuEChERS.

Tabela 28: Incerteza padrão combinada e expandida para a técnica QuEChERS.

Tabela 29: Avaliação das curvas analíticas lineares do método QuEChERS.

Tabela 30: Recuperação de 8 barras de SBSE.

Tabela 31: Cálculo dos efeitos de primeira (1,2 e 3), segunda (12,13 e 23) e terceira ordem (123).

Tabela 32: Resultados de MEV dos 8 experimentos realizados. Com ampliação de 150, 1000 e 5000 vezes.

LISTA DE ABREVIACÕES

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANA – Agência Nacional de Águas
ANOVA – Analyse of Variance
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC – Association of Analytical Communities
BPL – Boas Prática de Laboratório
BTX – Benzeno, Tolueno e Xileno
CCRC – Coordenação e Controle de Resíduos e Contaminantes
C18 – Octadecilsilano
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
CV – Coeficiente de Variação
dSPE – dispersive Solid Phase Extraction
DOE – Design of Experiment – Planejamento Experimental
Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPA – Environmental Protection Agency
FDA – Food and Drugs Administration
GC-ECD – Gas Chromatography – Electron Capture Detector
GC-MS – Gas Chromatography – Mass Spectrometry
HPA – Hidrocarboneto Poliaromático
IBAMA – Instituto Brasileiro de Meio Ambiente
IEC – International Electrotechnical Commission
INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ISO – International Organization for Standardization
IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry
Lanagro – Laboratórios Agropecuários
LD – Limite de Detecção
LLE – Liquid-Liquid Extraction
LMR – Limite Máximo de Resíduos
LQ – Limite de Quantificação
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MRC – Material Reference Certificate

NaCl – Cloreto de Sódio

OCPs – Organochlorines Pesticides

OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development

PDCA – Plan – Do – Check - Act

PDMS – PoliDimetilSiloxano

PSA – Primary-Secondary Aminne

QFD – Quality Function Deployment – Desdobramento Função Qualidade

QuEChERS – Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (Rápido, Fácil, Efetivo, Robusto e Seguro)

RBC – Rede Brasileira de Calibração

RBLE – Rede Brasileira de Laboratório de Ensaios

RCRA – Resource Conservation and Recovery Act

RSD – Relative Standard Deviation

RSE – Refrigerated Sorptive Extraction

SBSE – Stir Bar Sorptive Extraction

SMA – Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo

SPME – Solid Phase MicroExtraction

VIM – Vocabulary International Metrology

VOCs – Volatile Organic Compound

WHO – World Health Organization

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A: Declaração de treinamento no Laboratório Nacional Agropecuário – Lanagro – Campinas – SP.

Apêndice B: Figuras e gráficos para os analitos de extração individuais e para o conjunto multiresíduo no método QuEChERS.

Apêndice C: tabela de resíduos das curvas analíticas para os 14 analitos com a técnica QuEChERS.

RESUMO

O presente trabalho estuda a aplicação de ferramentas da qualidade em dois métodos multiresíduos, sendo utilizados como instrumento para desenvolvimento de novos métodos e otimização de métodos existentes. As ferramentas utilizadas foram o planejamento experimental, a validação de métodos e o cálculo de incerteza de medição, as quais foram aplicadas no método QuEChERS, já bem difundido na literatura, e no método RSE (Refrigerated Sorptive Extraction), técnica miniaturizada de extração. Foi aplicado planejamento experimental no método QuEChERS visando a otimização do processo de extração de organoclorados (14 no total, sendo 12 Organoclorados e 2 PCBs) em pescado, em que obteve-se valores de recuperação satisfatórios dentro da faixa de 70 a 120 % como é exigido pelo protocolo de validação SANCO 12495:2011. Neste processo foi otimizado as quantidades de sais de trabalho como NaCl, C18 e o PSA, fatores que interferem diretamente no resultado final de recuperação. A mesma ferramenta de planejamento experimental foi utilizada na otimização da fase de PDMS (fase extratora do sistema RSE desenvolvido) visando obter a melhor condição de trabalho, atuando com os fatores de temperatura e tempo de mufla, além do tempo de exposição ao meio ambiente para resfriamento entre a pré-cura e a pós-cura. O processo de validação e cálculo de incerteza de medição foi realizado para o método QuEChERS avaliando parâmetros primordiais para demonstrar que o método é adequado ao uso pretendido. Foi estudado o parâmetro linearidade, pelo coeficiente de determinação, resíduos e incerteza da curva, além da aplicação de metodologia de investigação na adequação da curva analítica linear, com testes como outlier, homoscedasticidade e modelo. Os dados apresentados foram satisfatórios, observando resultados dentro do que foi planejado, inexistência de outliers pela utilização do teste de Grubbs (foi encontrado valores perto do limite máximo do valor crítico para os compostos ppE e ppD), teste de Cochran para análise de homoscedasticidade nos resíduos em torno da curva (todos se apresentaram homogêneos com o teste utilizado) e o teste de modelo com o teste de falta de ajuste, em que foi averiguado se o modelo linear é o mais adequado para metodologia. Além da linearidade, também foram avaliados os parâmetros seletividade, precisão (com CV abaixo dos 20%) e recuperação (valores entre 70 e 120%), fatores primordiais para o processo de validação, considerando que alguns destes também influenciam diretamente na incerteza do resultado final. Desta maneira foi possível avaliar a aplicabilidade do planejamento experimental no desenvolvimento de novos métodos de

extração, como no caso do RSE, bem como na otimização de métodos já bem fundamentados, como no caso do método QuEChERS, se demonstrando como ferramenta primordial em ambos os casos. Quanto ao método QuEChERS, também foi possível avaliar a adequação do método quanto aos requisitos de validação e incerteza, os quais são essenciais para confiabilidade dos resultados analíticos.

ABSTRACT

The paper studies the application of quality tools in two multiresidue methods, being used as a tool for developing and optimization methods. The tools used were the experimental design, method validation and measurement uncertainty, which were applied in the QuEChERS method, already widespread in the literature, and the RSE method (Refrigerated Sorptive Extraction), miniaturized extraction technique. Experimental design was applied in the QuEChERS method in order to optimize the extraction process of organochlorines (14 in total, 12 Organochlorines and 2 PCBs) in fish, which gave satisfactory recovery values within the range of 70 to 120% as is required by the validation protocol SANCO 12495:2011. This process was optimized the quantities of salts as NaCl, C18 and PSA, factors that directly affect the final outcome of recovery. The same experimental design tool was used in the optimization of extraction phase (PDMS extraction phase system developed to RSE) to obtain the best working condition, leading with the factors as time and temperature on the muffle, and the time of exposure to the environment to cooling between pre-cure and post-cure. The process of validation and measurement uncertainty was conducted to evaluate the method QuEChERS parameters to show that the method is suitable for the purpose. We studied the linearity parameter, the determination coefficient, residues and uncertainty of the linear curve, and the application of a methodology to observe the adequacy of the linear calibration curve, with testing as an outlier and homoscedasticity model. The data presented were satisfactory, no outliers was identified by the Grubbs test (values was found near the upper limit of the critical value for compounds PPE and PPD), Cochran test for analysis of homoscedasticity in the residue around the calibration curve (all performed with homogeneous assay) and the test model with the lack of fit test, where it was examined whether the linear model is the most appropriate for methodology. Besides linearity, were also evaluated parameters as selectivity, precision (CV below 20%) and recovery (values between 70 and 120%), important factors for the validation process, whereas some of these also has influenced of the final results of uncertainty. In this way it was possible to evaluate the applicability of the experimental design to develop new extraction methods, as in the case of RSE, and the optimization of the method QuEChERS demonstrating an important tool in both cases. For the QuEChERS method was also possible to assess the adequacy of the method for the requirements validation and uncertainty, which are essential for reliability of analytical results.

SUMÁRIO

1. Introdução	01
1.1. Gestão da qualidade em laboratórios	01
1.2. Ferramentas da qualidade	04
1.2.1. Planejamento experimental	05
1.2.2. Validação de métodos	06
1.2.3. Cálculo da incerteza	16
1.3. Métodos multiresíduos	17
1.3.1. Método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Efficient, Rugged and Safe)	19
1.3.2. Método RSE (Refrigerated Sorptive Extraction)	21
1.3.3. Aplicação de métodos multiresíduos	25
1.3.3.1. Análise de organoclorados em pescado	25
2. Objetivo	28
3. Parte experimental	29
3.1. Método QuEChERS	29
3.1.1. Ferramentas da qualidade aplicadas no desenvolvimento, validação e cálculo de incerteza para análise de organoclorados em pescado utilizando o método QuEChERS	29
3.1.1.1. Desenvolvimento do Planejamento Experimental – Otimização QuEChERS	32
3.1.1.2. Parâmetros para validação	34
3.1.1.2.1. Recuperação/Exatidão	35
3.1.1.2.2. Linearidade/Sensibilidade	37
3.1.1.2.3. Seletividade	38
3.1.1.2.4. Precisão	39
3.1.1.3. Cálculo da Incerteza	40
3.1.1.4. Método para análise de organoclorados em pescado (QuEChERS)	42
3.1.1.4.1. Padrões e reagentes	44
3.1.1.4.2. Materiais e equipamentos	44
3.1.1.4.3. Preparação das amostras e padrão	44
3.1.1.4.4. Método Cromatográfico	46
3.2. Método RSE	49
3.2.1. Desenvolvimento do planejamento experimental – Otimização da fase extratora	

RSE_____	49
3.2.1.1. Padrões e reagentes_____	51
3.2.1.2. Materiais e equipamentos_____	52
3.2.1.3. Preparação das amostras e padrão_____	52
3.2.1.4. Método cromatográfico_____	52
3.2.2. Desenvolvimento do método RSE_____	52
4. Resultados e discussão_____	57
4.1. Aplicação das ferramentas da qualidade no desenvolvimento, validação e cálculo da incerteza para análise de organoclorados em pescado pelo método QuEChERS _____	57
4.1.1. Planejamento experimental_____	57
4.1.1.1.Tratamento dos dados – MIREX (MRX)_____	60
4.1.1.2. Fatores de influência no Conjunto Multiresíduo_____	65
4.1.1.3. Função de Desejabilidade_____	66
4.1.2. Validação do método_____	71
4.1.2.1. Seletividade_____	71
4.1.2.2. Linearidade/Sensibilidade_____	73
4.1.2.3. Recuperação/Exatidão_____	75
4.1.2.4. Precisão (Repetibilidade)_____	77
4.1.3. Cálculo de incerteza_____	78
4.1.4. Desenvolvimento de modelo para avaliação da curva de calibração_____	83
4.1.4.1. Aplicação da metodologia proposta_____	88
4.2. Aplicação de ferramentas de qualidade no desenvolvimento do método RSE para análise de organoclorados em pescado _____	93
4.2.1. Planejamento Experimental_____	93
5. Conclusão_____	98
6. Referências Bibliográficas _____	110

1. Introdução

Um dos temas em crescente expansão nos laboratórios das universidades e de empresas privadas é a aplicação de sistemas de gestão da qualidade para garantir a confiabilidade e rastreabilidade dos resultados gerados. Porém em laboratórios universitários, a implantação de um sistema de gestão da qualidade, a primeira vista, não se mostra vantajoso, já que para implantação e manutenção são necessários investimentos frequentes, os quais muitas vezes não estão facilmente disponíveis, como em laboratórios privados (que obtêm seus recursos pela prestação de serviços de rotina). No entanto, segundo Olivares (2009), a implantação destes sistemas, é uma garantia de formação dos alunos de pós e de graduação, para que estes estejam inseridos em condições reais durante sua formação, melhorando assim seu desempenho no mercado de trabalho atual. Este conceito já é discutido na literatura (FERNANDES et al., 2006; SANTOS et al., 2011; FERREIRA E SILVA, 2011), por ser um sistema já bem difundido em laboratórios privados, mas ainda em processo de crescimento em laboratórios de ensino.

O conceito de qualidade vem ganhando espaço em todos os setores de produção, com a concretização da influência deste sistema para garantia dos processos e produtos. O sistema ISO (International Organization for Standardization) sendo o mais conhecido mundialmente, contém sistemas para vários ramos de produção, como no setor empresarial com a ISO 9001, a ISO TS 16949 para o setor automobilístico, a ISO 14001 para o meio ambiente entre outros que vem com o objetivo de manter uma produção controlada e viavelmente econômica.

Assim os sistemas de gestão se mostram eficazes nos processos, e todos os órgãos que necessitam de garantia de seus produtos recorrem por certificações em algum tipo de sistema da qualidade, o que ocorre também para laboratórios privados, sejam eles de ensaio ou calibração, e laboratórios de ensino que buscam transferir a realidade do mercado aos seus alunos.

1.1. Gestão da Qualidade em Laboratórios

Atualmente o mercado se apresenta cada vez mais competitivo levando a necessidade em oferecer produtos e serviços cada vez melhores, que atendam as necessidades e exigências dos clientes, desta maneira a qualidade aparece como ferramenta primordial para as empresas

sobreviverem e se desenvolverem. Empresas como a Honda e a Ford, que tiveram suas vendas em queda no ano de 2003 (WILEY, 2012) perceberam que uma forma de alavancar suas vendas e relações de comércio, é o melhor enquadramento na gestão da qualidade visando à satisfação do cliente. Pode-se citar também a entrada de sistemas da qualidade em laboratórios, como o que ocorreu no Ministério da Agricultura no ano de 2003 depois de uma missão veterinária da união européia (COSTA, 2010). Neste ano o país sofreu embargo na exportação do mel, o que acarretou prejuízo ao mercado e uma má imagem frente aos países importadores (PEREZ, 2007). Com isso, tem-se que os sistemas de gestão da qualidade, além de promover estrutura de garantia para os processos, estabelecem também rastreabilidade, evidenciando assim a competência dos analistas do laboratório com tal sistema.

Como citado anteriormente, a adesão a sistemas de gestão da qualidade é um fator de extrema importância devido à exigência dos clientes e confiabilidade nos processos. Órgãos do governo como MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) entre outros, exigem dos laboratórios parceiros que estes implementem um sistema de gestão de qualidade, como a ISO/IEC 17025 e realizem manutenção deste sistema (OLIVARES, 2009).

Este requisito é fundamental para estabelecer os controles exigidos pelos clientes. No ano de 2010 o país foi visitado por uma missão do serviço norte-americano para verificação do sistema de segurança alimentar do Brasil, em que os inspetores brasileiros foram avaliados e designados aptos a realizar auditorias e por obter um sistema de inspeção organizado, além de visita nos laboratórios nacionais agropecuários (Lanagro – Laboratórios Nacionais Agropecuários) de Campinas - SP e Porto Alegre - RS. Este fato ocorreu depois da identificação de Ivermectina acima dos limites estabelecido nos EUA (BELTRÃO, 2010).

Assim como no MAPA e na ANVISA, esta exigência está presente em outros órgãos como o ANA (Agência Nacional de Águas), IBAMA (Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) e SMA (Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo). Os laboratórios atuam com sistemas da qualidade para garantir as exigências locais e estar compatíveis com que as normas internacionais demandam. Exemplos de normas adotadas devido a sua influência e abrangência são as normas da EPA (Environmental Protection Agency) dos Estados Unidos que orienta, por exemplo, atividades analíticas na área de meio ambiente e as normas da FDA (Food and Drugs Administration) relacionadas ao monitoramento da qualidade dos alimentos. Logo, com o crescimento das exigências, o número de laboratórios acreditados em ISO/IEC 17025 e BPL (Boas Práticas de Laboratório)

vêm aumentando gradualmente no decorrer dos anos, distribuídos em todo território nacional (INMETRO, 2012).

Tabela 1: Crescimento de laboratórios acreditados no sistema ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005.

Ano	Tipo de Acreditação		
	ISO/IEC 17025 (RBC)	ISO/IEC 17025 (RBLE)	BPL
2005	264	150	15
2009	236	294	17
2011	281	424	33

Adaptado de: SCHIAVON, 2011.

Os sistemas de gestão supracitados estabelecem diferentes diretrizes, com destaque na aplicação de ferramentas da qualidade (como a validação e cálculo de incertezas) a qual se faz imprescindível para garantia da confiabilidade de um resultado. Desta maneira, a gestão de qualidade em química aparece como uma nova área de pesquisa (FERNANDES et al., 2006), visando aumentar a garantia da confiabilidade dos laboratórios, envolvendo sistema de gestão às ferramentas da qualidade aplicadas para avaliação de novas metodologias, a qual recebe grande destaque no monitoramento de resíduos e contaminantes em alimentos e na área ambiental (OLIVARES, 2009).

O monitoramento de resíduos e contaminantes em alimentos destaca-se como uma necessidade notória devido à importância do agronegócio e as exigências cada vez maiores do mercado internacional. Esta necessidade levou a criação, através da Portaria Interministerial Nº 902 de 22 de Setembro de 2008, de uma rede de laboratórios para análise de resíduos de contaminantes em produtos de origem animal e vegetal a qual aproveita da grande experiência de monitoramento dos Lanagro, a vivência do desenvolvimento de pesquisa da Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) somadas ao conhecimento teórico, acadêmico e de pesquisa de renomados centros de pesquisa e universidades brasileiras.

Nesta rede, destacam-se os Lanagro, Laboratórios Oficiais do MAPA, que desde 1979 são os responsáveis maiores pelo monitoramento de resíduos e contaminantes em produtos de origem animal no país (OLIVARES, 2009). Atualmente estes laboratórios além de apresentarem técnicos e equipamentos atualizados visando atender a demanda analítica frente à análise de resíduos de contaminantes, também buscam a garantia da confiabilidade dos

resultados analíticos através da aplicação de Sistemas de Gestão da Qualidade internacionalmente reconhecidos, principalmente em relação a ISO/IEC 17025, atendendo além de uma pressão de mercado, também a pressão nacional e internacional quanto à conformidade com esta norma.

Desta maneira, é inegável a importância da aplicação de Sistemas de Gestão da Qualidade, bem como suas ferramentas, para análise de resíduos de contaminantes, análises estas de grande destaque tanto por ser ação prioritária para a avaliação da exposição humana através da cadeia alimentar, como para a manutenção dos mercados interno e externo (PAYÁ et al., 2007). Devido ao interesse em se analisar um grande número de resíduos e contaminantes nos alimentos, lista esta frequentemente atualizada devido a exigências nacionais e internacionais, a aplicação de métodos multirresíduos adequadamente validados, e com suas incertezas estimadas, se mostram como uma excelente ferramenta.

1.2. Ferramentas da qualidade

Dentre as várias formas de controle de processos dentro de um laboratório, algumas ferramentas se mostram úteis para manutenção e reprodutibilidade do processo (ou análise) estudado e desenvolvido. Ferramentas como validação e cálculo de incerteza que são parâmetros da norma ISO/IEC 17025:2005 são requisitos obrigatórios para a manutenção do sistema e exigidos pelos órgãos de acreditação. Estes requisitos são confirmações objetivas para a metodologia aplicada, para observar se à aptidão do método e do resultado analítico, com o que é exigido, seja pelo cliente, seja por uma legislação.

Há também ferramentas de qualidade para controle de processo que é mais utilizada na área de engenharia, como método Seis Sigma, Desdobramento da Função Qualidade (QFD), planejamento experimental ou na sigla em inglês DOE (Design Of Experiment) (JUNIOR, 2008). O planejamento experimental também se mostra uma ferramenta útil para desenvolvimento de metodologias na área da química, já que este discute os fatores que influenciam no processo. Essas ferramentas entre outras são fundamentais para estabelecer um trabalho de qualidade dentro de um laboratório.

Olivares e Lopes, 2012 propõe uma forma de manter a qualidade dentro do ambiente de um laboratório através de um ciclo, que foi denominado de Ciclo da Garantia da Qualidade Analítica, que mantém conexões entre os requisitos da qualidade e a importância de um com o outro (garantia da qualidade, validação e cálculo da incerteza), como peças cruciais para

manutenção de resultados de qualidade. Sabendo que o analista está sempre influenciado por fatores como validação de métodos, acreditação, rastreabilidade, teste de proficiência, material de referência, tal procedimento é fundamental para garantia da qualidade, como apresentado na Figura 1.

Figura 1: Ciclo da garantia da qualidade analítica. (adaptado de Olivares e Lopes, 2012).

1.2.1. Planejamento Experimental

Segundo Neto (2010) a metodologia de planejamento experimental é um termo geral para designar o conjunto de técnicas utilizadas para experimentação sistemática além de afirmar que o uso desta ferramenta é a aplicação de “*Bom Senso*”, pois se sabe que todas as respostas são dependentes de seus fatores, e assim devem ser investigados com eficácia.

Esta metodologia pode ser utilizado por cientistas ou engenheiros para otimização de processos, podendo assim aumentar rendimento, minimizar tempo de processos etc. Com isso, observa-se que apesar de ser uma ferramenta aplicada na área de engenharia, adéqua-se muito bem a metodologia laboratorial, em fase de preparação de métodos para se atingir um ponto ótimo, independente do tipo de análise que está se realizando. Alguns métodos de planejamento se destacam, sendo apropriado para certos estudos, como planejamento experimental completo para quando há poucos fatores, planejamento experimental fracionário para quando há vários fatores (ferramentas úteis para estudos preliminares), além de outros processos como Box-Behnken (KHAJEH, 2009) e Doehlert (SKARTLAND et al., 2011).

Um grande problema observado nesta área de planejamento experimental é quando se observa várias respostas para uma metodologia, como por exemplo, em um método multiresíduo em que temos várias respostas de recuperação. Desta maneira é necessário

avaliar estes dados da melhor forma possível, com intuito de buscar um ponto ótimo para todos os fatores independentes e que tenham ainda assim a melhor resposta para todas as recuperações. Harrington propôs um método para análise destes problemas e denominou de Função de Desejabilidade (HARRINGTON apud ISLAM, 2009) que se mostrou adequado para métodos com várias respostas. A função de Desejabilidade é uma técnica popular e bem estabelecida para determinação simultânea do ponto ótimo de um conjunto de variáveis que pode determinar a melhor performance de uma resposta ou mais.

A função de desejabilidade vem sendo utilizado em alguns campos da química como, produção de biohidrogênio (WANG; WAN, 2009), otimização de múltiplas respostas na determinação de cloroanisóis e clorofenóis (PIZARRO; GONZÁLEZ-SÁIZ; PÉREZ-DEL-NOTARIO, 2006), determinação de hidroquinona (RUEDA et al., 2003) entre outras aplicações.

Desta maneira, para otimização de processos analíticos, a ferramenta estatística de planejamento experimental se mostra promissora, assim como procedimentos de validação e cálculo de incerteza são primordiais para condução de um trabalho de qualidade na área laboratorial.

1.2.2. Validação de Métodos

As ferramentas da qualidade visam controlar, identificar e quantificar a qualidade de um resultado analítico através de processos estatísticos, fornecendo informações pertinentes para que desvios ou erros possam ser corrigidos ou minimizados. Estes processos estatísticos compreendem os estudos de Validação e Cálculos de Incerteza das metodologias analíticas.

Estas ferramentas se apresentam em Sistemas de Gestão da Qualidade para laboratórios e cada vez mais se destacam nos laboratórios de pesquisa, uma vez que a publicação em revistas científicas requer a apresentação de resultados consistentes, os quais podem ser obtidos através da aplicação de ferramentas da qualidade, como por exemplo, relacionados à validação de metodologias e cálculos de incerteza dos resultados.

A validação deve ser realizada para toda metodologia não normalizada, criada ou desenvolvida pelo próprio laboratório, ou para metodologias normalizadas que forem utilizadas fora de seu escopo, ampliadas ou modificadas (entende-se por metodologia normalizada, aquelas editadas por agências reguladoras ou de normalização como ABNT, FDA, EPA, OECD entre outras) (OLIVARES, 2006a).

Os protocolos de validação geralmente são desenvolvidos para determinado tipo de análise, gerando uma diversidade de protocolos nacionais, como destacado anteriormente, e até internacionais, como por exemplo, no desenvolvimento de metodologias analíticas ambientais para análise de poluentes em resíduos sólidos que, nos Estados Unidos apresenta um protocolo específico estabelecido pela EPA (Environmental Protection Agency) (EPA, 2006). Alguns protocolos internacionais muitas vezes são aplicados no Brasil devido a exigências específicas, como no caso do monitoramento de resíduos de contaminantes em alimentos realizado pelo Ministério da Agricultura, através dos Laboratórios Analíticos Agropecuários (Lanagro), que devido à pressão da comunidade europeia adota critérios de validação internacionais (COMUNIDADE EUROPEIA, 2002; SANCO, 2007).

Segundo orientação DOC-CGCRE-008 do INMETRO (INMETRO, 2011), para confirmar que o método é apropriado, o laboratório deve validar métodos não normalizados, métodos criados/desenvolvidos pelo próprio laboratório, métodos normalizados usados fora dos escopos para os quais foram concebidos e ampliações e modificações de métodos normalizados. A Tabela 2 apresenta os parâmetros de validação de acordo com o tipo de ensaio.

Tabela 2: Parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio.

Parâmetros	Tipo de ensaio			
	Qualitativo	Determinação do componente (ou analito) em maior teor (1).	Análise de elementos menores e traços (2)	Propriedades físicas
Precisão		√	√	√
Seletividade	√	√	√	√
Recuperação		√	√	√
Robustez	√	√	√	√
Sensibilidade/linearidade		√	√	√
Limite de detecção	√		√	
Limite de quantificação			√	

Fonte: Documento DOC CGCRE-008 (INMETRO, 2011).

(1) Dependendo da faixa de concentração do analito pode não ser necessária a determinação dos limites de detecção e de quantificação, como por exemplo: determinação de sacarose em balas e determinação do teor de gordura em carnes. por exemplo componentes maiores com concentração entre 1 a 100%,

(2) São considerados como de menor teor concentrações entre 0,01 a 1% e elementos traços, os elementos em concentração abaixo de 0,01%.

A aplicação de medidas para assegurar a qualidade dos dados analíticos é cada vez mais discutida, devido à importância das decisões que são tomadas frente aos resultados de uma análise, como por exemplo, análises forenses; potabilidade de água; bioequivalência de produtos farmacêuticos; diagnósticos de áreas contaminadas entre outros. Lembrando que não há uma receita pré-estabelecida para validação de metodologias, o analista deve utilizar a melhor forma, ou guia que melhor se adeque ao seu tipo de trabalho, A Tabela 3 abaixo apresenta algumas abordagens de validação baseada em diferentes referências.

Tabela 3: Propostas para análise dos parâmetros da validação.

Referência	(INMETRO, 2011)	(EPA, 2006)	(SANCO, 2012)	(LEITE, 2008)
Metodologia		Método 8081 (inseticidas organoclorados para GC/ECD).		
Seletividade	Fazer a análise com a amostra e materiais de referência pelo método em estudo e outros métodos validados. Analisar amostras contendo vários interferentes suspeitos na presença do analito de interesse.		Resposta no branco e controle de amostra, menor que 30% do LQ	Tem como objetivo garantir a identidade do ativo que se deseja determinar. De uma forma geral podemos conceituar a seletividade como a medida da indiferença de método a presença, na amostra, de espécies que poderiam interferir na determinação do analito.
Linearidade	Verificar até que ponto a faixa de concentração do analito coincide com a faixa dinâmica linear. Serão necessários vários níveis de concentração, no mínimo cinco, para construir a curva analítica. Aplicação de testes estatísticos para		Análise pela curva de calibração com resíduos menores que 20%	Com objetivo de obter proporção direta entre a concentração de analito e sinal obtido, confecciona uma curva analítica de resposta. A variação dos pontos (massas ou concentrações distintas) numa curva, como proposta ideal, deve ser de 20% para o menor valor, e 15% para os demais pontos.

	verificação dos dados obtidos.			Uma curva deve conter, no mínimo, 5 pontos distintos. A curva pode ser construída de duas formas, por diluição de uma solução mãe ou ponto a ponto.
Exatidão			Determinar a recuperação média para os níveis fortificados, de 70 a 120%.	
Precisão		A repetibilidade de uma medida a longo termo, por exemplo, semanalmente, a precisão, com instrumentos calibrados e usando padrões comparáveis e em dias diferentes não deve variar mais que 15%.	Determinar a repetibilidade dos desvios padrões relativos, determinar para os níveis fortificados, menor ou igual a	O primeiro passo para a verificação da confiabilidade de uma análise é investigar se a mesma se repete quando operada sequencialmente.

			20%	
Recuperação	<p>Os processos normalmente utilizados para avaliar a tendência de um método são, entre outros:</p> <p>uso de materiais de referência certificados (MRC), participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação.</p> <p>A tendência pode ser expressa como recuperação analítica, definida como</p> $\frac{\text{valor observado}}{\text{valor esperado}} \times 100\%$	<p>A porcentagem do analito do interesse para um intervalo de recuperação na maioria dos métodos desenvolvidos é entre 80 e 120%.</p>	<p>Recuperação média para cada analito representativo é na faixa de 70 a 120% com um RSD menor que 20%.</p>	<p>A recuperação deveria ser executada diretamente na matriz, mas o estado físico da amostra pode interferir na seletividade e no limite de quantificação. Tendo em vista este problema é necessário isolar os analitos da amostra. Sobre um branco, adicionamos a nossa espécie ou analito, e promovemos a extração sem interferentes.</p>
Robustez			Pode ser obtido no decorrer do método/verificar	

			pela recuperação média estabelecida e o desvio padrão relativo.	
Limite de Quantificação	<p>Branco da amostra.</p> $LQ = \bar{x} + 10s$ <p>Branco com adição de concentrações variadas do analito, próximas ao LD. Medir, uma vez cada replicata independente, a cada nível de concentração.</p>	O desenvolvedor deve gerar estimativas de métodos de quantificação e métodos de limite de detecção dos analitos de interesse na matriz de interesse.	<p>Por definição: o nível mais baixo no qual tenha sido demonstrado que os critérios de exatidão e precisão foram cumpridos, menor ou igual ao limites máximos de resíduos (LMR)</p>	<p>Será o valor obtido em confiabilidade de precisão aceitável. Para o limite de quantificação, considera-se que não se atingiu o limite da técnica/método ou do equipamento. Faz-se necessário ter a condição analítica definida, em que as espécies estejam dentro dos parâmetros normais do equipamento ou da técnica. Fazer um branco para determinar interferência na região analítica, causada pelo meio reacional, interferência do ambiente, manipulação, equipamento. Logo após dilui-se a amostra com a analito em ¼ do teor do analito e se observa a repetitividade, se não for a desejada</p>

				diminui a diluição. Se verificar repetitividade, já esta estabelecido um valor para o limite de quantificação.
Limite de detecção	<p>Branco da amostra.</p> $LD = \bar{x} + t_{(n-1, 1-\alpha)} \cdot s$ <p>Branco da amostra com adição da menor concentração aceitável do analito.</p> $LD = 0 + t_{(n-1, 1-\alpha)} \cdot s$ <p>É recomendado um mínimo de 7 replicatas para a determinação do LD. Por exemplo, no caso de se analisar 7 alíquotas, temos 7-1 = 6 graus de liberdade de uma matriz de branco da amostra com adição da menor concentração aceitável do analito. Para esses graus de liberdade, o valor de t unilateral, para 99% de confiança é 3,143. O LD será igual a 3,143 vezes o desvio</p>	O desenvolvedor deve gerar estimativas de métodos de quantificação e métodos de limite de detecção dos analitos de interesse na matriz de interesse.		É calculado como correspondente a concentração que produziria um valor do sinal medido 3 vezes maior que o nível de ruído médio, medido com a solução de controle ou branco, conforme recomendado por norma IUPAC.

	padrão amostral.			
Efeito da matriz		<p>Os elementos prévios no processo de desenvolvimento do método envolvem o uso de padrões conhecidos ou matrizes limpas dopadas. Uma vez que o novo método passou por todos os testes prévios, estar pronto para o mais importante demonstração de todo o processo de desenvolvimento do método, ou seja, como este irá atuar na matriz real com o que é pretendido a ser usado.</p> <p>O método deve ser adequado para a variação do tipo de matrizes.</p>	Comparação da resposta do solvente padrão e matriz escolhida	
Sensibilidade do instrumento		É influenciado por alguns fatores, limite de detecção do instrumento, limite de		Considere a espécie química ou analito, numa solução ideal, isenta de interferentes e na melhor condição de

		quantificação do método e requerimentos regulatórios da aplicação proposta.		análise. A menor quantidade dessa espécie, detectada pelo sistema analítico, em confiabilidade.
Efeitos de interferentes		Definição de falso negativo é a resposta negativa para uma amostra que contenha o analito de interesse ou acima do estado do nível de ação do método. Um procedimento candidato deve produzir não mais que 10% de falsos positivos. Definição de falso positivo é a resposta positiva para uma amostra que contenha o analito de Interesse abaixo do estado do nível de ação.		

t = número de Student, *n-1* = graus de liberdade, *1-α* = nível de confiança. $\bar{X}$ = média, *s* = Desvio padrão

De maneira mais abrangente, uma das medidas adotadas para garantir a confiabilidade e rastreabilidade de um resultado analítico pode ser a aplicação de um Sistema de Gestão da Qualidade, e de forma mais pontual a validação da metodologia. Porém, apenas a validação da metodologia não garante a concordância dos resultados analíticos entre diferentes laboratórios, uma vez que os erros de cada laboratório podem ser diferentes, pois podem estar relacionados aos equipamentos e instalações, assim o cálculo da incerteza também se faz necessário, além dos procedimentos internos de controle.

1.2.3. Cálculo de Incerteza

Quando uma mesma amostra é analisada por diferentes laboratórios, com diferentes metodologias, é esperado que os resultados analíticos apresentem concordância entre si. No entanto, cada resultado é influenciado por diferentes fontes de incerteza durante a análise, que variam para cada laboratório e metodologia, e alteram o resultado final. Assim, dois laboratórios que analisem a mesma amostra por duas metodologias oficiais diferentes podem chegar a diferentes resultados (OLIVARES, 2006a). Segundo o guia Eurachem, a incerteza é um parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão de valores que poderiam ser razoavelmente atribuídas ao mensurando (EURACHEM, 2000).

O cálculo da incerteza irá expressar o quanto se pode confiar em um resultado analítico, considerando para isto todas as possíveis fontes de incerteza da metodologia, somando-as, e finalmente demonstrando a faixa de variação aceitável do resultado final. Desta maneira, a incerteza atribuída a um resultado garante a faixa de confiança do mesmo, demonstrando com maior precisão o grau de concordância entre resultados obtidos em diferentes laboratórios.

Não existe um consenso em relação à forma de realizar o cálculo da incerteza de uma medição, uma vez que cada metodologia apresenta diferentes fontes de incerteza, existindo apenas alguns guias que orientam o cálculo, como no caso do Guia Eurachem/Citac adotado pela Sociedade Brasileira de Metrologia (EURACHEM, 2000).

Ferramentas da qualidade como validação e cálculo de incerteza são obrigatórias para laboratórios que apresentam um Sistema de Gestão da Qualidade, e atualmente cada vez mais exigidas na pesquisa devido à necessidade em apresentar dados consistentes para publicação em revistas científicas (GONZÁLEZ; ÁNGELES, 2007). Entre os diferentes campos da química, a química analítica, notoriamente tem aplicado amplamente a gestão da qualidade através de normas específicas como a ISO/IEC 17025, necessário, por exemplo, no

desenvolvimento e aplicação de métodos multiresíduos, muito aplicado hoje em dia devido sua facilidade de manuseio e capacidade em avaliar simultaneamente uma grande gama de analitos para diferentes matrizes.

1.3. Métodos Multiresíduos

Com o desenvolvimento das técnicas de análises no decorrer dos últimos anos, a busca por um método que analise não apenas um analito, mas vários ao mesmo tempo, é uma rota permanente, pois minimiza o trabalho do analista e consequentemente a utilização de mão de obra e solventes orgânicos. Esta abordagem se encontra atualmente em vários campos de pesquisa, na área ambiental, na investigação de contaminantes em alimentos e água, com os mais diversos analitos. Assim com o aumento do rigor na fiscalização dos órgãos responsáveis, utilizar métodos que abrangem uma maior gama de analitos se torna tendência. Com este pensamento surgiu um novo termo, designado “Green Methods”, que é a utilização consciente dos recursos, gerando o menor impacto possível, seja na metodologia ou no descarte, com isso surgiu novas técnicas de extração, as técnicas miniaturizadas, que dispensam a utilização de grandes quantidades de solventes, e são relativamente técnicas rápidas de serem aplicadas (OLIVARES, 2006b).

Desta forma, a inovação na área de extração se torna foco com várias técnicas miniaturizadas, ou técnicas com incidência de tecnologia que aumenta o poder extrativo, mas que por outro lado são técnicas relativamente caras. Assim pode-se utilizar a forma mais adequada com o respectivo analito de interesse, seja ele na área ambiental, ou na análise de contaminantes em alimentos, como demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4: Métodos Multioresíduos.

Técnica	Analitos	Referência
SPE (Solid Phase Extraction)	Produtos farmacêuticos, Pesticidas, Morfina.	(AZZOUZ, BALLESTEROS, 2012; SASANO et al., 2000; AHADI et al., 2011)
ASE (Accelerated Sorptive Extraction)	PHA, PCB, Hidrocarbonetos, Organoclorados semi- voláteis.	(RICHTER et al., 1996; HE et al., 2009)
GPC (Gel Permeation Chromatography)	Pesticidas.	(BEIZHEN et al., 2008;
MAE (Microwave Assisted- Extraction)	Produtos farmacêuticos.	(AZZOUZ, BALLESTEROS, 2012;)
MSPD (Matrix Solid Phase Dispersion)	Multi-toxinas.	(RUBERT, SOLER, MAÑES, 2011)
SFE (Supercritical Fluid Extraction)	Isoflavonas	(KLEJDUS et al., 2010)
QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Efficient, Rugged and Safe)	Inseticidas organofosforados, herbicidas.	(SINHA, VASUDEV, RAO, 2012)
SPME (Solid Phase Microextraction)	Contaminantes emergentes.	(WANG et al., 2011)
SBSE (Stir Bar Sorptive Extraction)	Diclofenaco.	(KOLE, MILLERSHIP, MCELNAY, 2011)
RSE (Refrigerated Sorptive Extraction)	BTEX.	(CARMI et al., 2009)
Rotating Disk Extraction Sorptive	Pesticida, nonilfenol.	(GIORDANO, RICHTER, AHUMADA, 2011)
HS-SPME (Headspace – Solid Phase Microextraction)	Organoclorados	(OLIVARES, 2006b)
u-SPE (Micro Solid Phase Extraction)	Hidrocarbonetos poliaromáticos PAH,	(HUANG, ZHOU, XIE, 2011)

Entre estas técnicas de extração, algumas vêm se destacando tanto em rotina de laboratórios como em órgãos que promovem processos de extração, como a AOAC, que vem popularizando a técnica QuEChERS. Assim como, em técnicas miniaturizadas, como a RSE, que se mostram promissoras para o campo de extração e que se adaptam bem a sistemas de qualidade e tem boas respostas com as ferramentas aplicadas.

1.3.1. Método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Efficient, Rugged and Safe)

Com a conscientização ambiental que todos vêm desenvolvendo em todos os campos de trabalho, os laboratórios vêm se adaptando também com essa atual realidade, assim formas que impactem o mínimo possível estão sendo desenvolvidas, para atender a ideais como a do “Green Methods”. A busca por este ideal fez com que surgissem novas propostas de extração no decorrer do tempo, como a técnica QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Efficient, Rugged and Safe), apresentada na Figura 2, que foi desenvolvida pela primeira vez por Anastassiades et al. (2003), a qual surgiu da junção da extração líquido-líquido LLE (Liquid-Liquid Extraction) e da dSPE (Dispersive Solid Phase Extraction) com uma fase de Clean-up para obtenção dos analitos.

A proposta inicial foi desenvolver esta técnica para extração de pesticidas em frutas e vegetais, matriz que tem poucos interferentes. Com o decorrer do tempo a técnica se mostrou promissora para outros tipos de matrizes e analitos, e foi modificada conforme os interesses da análise, assim várias propostas estão presentes na literatura atual, sendo aplicada para quase todos os tipos de analitos possíveis, e sendo já comercializada por algumas empresas, que fornecem kits prontos para aplicação (RESTEK, 2012), além da popularização em órgãos reguladores, tornando-se técnica oficial como na AOAC (AOAC, 2007).

A técnica é relativamente simples, pois não necessita de trabalho árduo para sua realização, é barato, já que utilizam componentes simples e de fácil acesso, é rápido quando comparado com outras técnicas aplicadas em rotina. Segura, pois possui boa reprodutibilidade e atende o que é pedido hoje quando se fala em uso de componentes prejudiciais a saúde e ao meio ambiente. A técnica se estabelece em uma fase de extração líquido-líquido com um solvente orgânico, inicialmente realizado com acetonitrila, mas que no decorrer do tempo foi se modificando para atender apropriadamente os trabalhos envolvidos, assim como a aplicação dos sais. Algumas modificações já estão bem esclarecidas na literatura, como o uso do metanol para extração de pesticidas em repolho e rabanete na fase de extração líquido-

líquido (NGUYEN et al., 2008), ácido acético 1% em acetonitrila para análise de produtos veterinários em leite (COSTA, 2010), análise de clorotolanil com acidificação, pois este depende do pH (EURL, 2011), entre várias outras propostas.

(A)

(B)

Figura 2: (A). Fluxograma da Técnica QuEChERS desenvolvida por Anastassiades e Colaboradores em 2003. (B). Fotos ilustrativas do procedimento.

1.3.2. Método RSE (Refrigerated Sorptive Extraction)

As formas de preparação da amostra para análise, aplicadas em diferentes laboratórios atualmente, aborda várias técnicas já bem difundidas. Neste preparo de amostra é de extrema importância a obtenção de um sinal analítico adequado e é reconhecido a necessidade de métodos analíticos rápidos e mais eficientes. Desta maneira a evolução neste campo se fez necessário para obter limites de detecção cada vez menores, seja de amostras ambientais (OLIVARES, 2006b), análises de drogas de controle (MELO et al., 2009), entre outros campos. Este fator é importante, devido às exigências de órgãos nacionais e internacionais, por um controle rígido para estabelecer limites máximos de diferentes contaminantes.

Assim como técnicas já bem difundidas como o QuEChERS, novas técnicas de extração vem surgindo com o decorrer dos anos. Técnicas que utilizem menos solventes são promissoras para a área analítica, assim os chamados “Green Methods” se tornam tendência, e as formas de extração miniaturizadas acompanham este avanço.

Tabela 5. Evolução das técnicas de headspace.

Período desenvolvido	Técnica	Observações	Referências
Meados de 1965	Headspace Estático	Piores limites de detecção por amostrar diretamente o gás do headspace.	(WANG; MCCAFREY; NORWOOD, 2008)
	Headspace dinâmico “purge-and-trap”	Melhores limites de detecção que Headspace Estático por concentrar o gás em um trap.	(WANG; MCCAFREY; NORWOOD, 2008)
1990	Headspace-SPME	Melhora limites de detecção por concentrar analitos do headspace na fibra seguido de injeção direta ao cromatógrafo.	(PAWLISZYN; ARTHUR, 1990; BELTRAN; LÓPEZ; HERNÁNDEZ, 2000)
1999	Headspace-SBSE	Melhora limites de detecção, pois a SBSE apresenta mais fase sortiva que a SPME para concentração dos analitos em headspace.	(BALTUSSEN et al., 1999)
2006-2007	Headspace-SPME com refrigeração	Apesar de menos fase sortiva que a SBSE, a aplicação da SPME com refrigeração em headspace desloca o equilíbrio da sorção dos analitos, concentrando estes na fibra, atingindo assim menores limites de detecção.	(GHIASVAND; SETKOVA; PAWLISZYN, 2007; CHEN et al., 2007; CARSEK, CUDJOE e PAWLISZYN, 2007; CARASEK, PAWLISZYN, 2006; GHIASVAND, HOSSEINZADEH e PAWLISZYN, 2006).

Como evidenciado na Tabela 5, a análise de amostras em headspace já é utilizada a um longo período. Com os avanços no decorrer do tempo com o uso de fases extratoras iniciadas por Pawliszyn e Arthur nos anos 90, foi observado que a técnica do uso de uma fase compatível com o analito de interesse, ou seja, polaridade similar, poderia se obter maiores níveis de extração, aumentando assim a eficiência dos processos. Desta forma, várias outras técnicas surgiram como a SPME e a SBSE em headspace, assim como a SPME com refrigeração, e como consequência o aumento dos níveis de extração. Sendo uma área promissora, vários outros métodos multiresíduos com fase extratora surgiram como demonstrado na Tabela 4. Estas técnicas baseiam-se em constante de partição do analito em solução e a fase extratora, chamado de $K_{\text{pdms/água}}$ que segundo a literatura tem relação com o $K_{\text{octanol/água}}$, sendo assim passível de cálculo.

$$K_{O/W} \cong K_{PDMS/W} = \frac{C_{SBSE}}{C_W} = \frac{m_{SBSE}}{m_W} \cdot \frac{V_W}{V_{SBSE}}$$

Equação 1: Equação do coeficiente de partição PDMS/água.

Onde $K_{O/W}$ é a constante de equilíbrio Octanol/água, o $K_{PDMS/W}$ é a constante de equilíbrio PDMS/água, m_{SBSE} é a massa do analito na fase extratora, m_W é a massa de analito na solução, V_W é o volume da solução e V_{SBSE} é o volume da fase extratora.

A relação dos volumes é também conhecida como fator β e quanto menor, melhor será a relação, ou seja, quanto menor o volume de solução e maior o volume da fase, maior será a recuperação do método, como exemplificado na Figura 3.

Figura 3: Gráficos da relação massa/recuperação com o volume de trabalho para analito com $K_{O/W} = 6,0$.

Desta forma, observa-se no decorrer das pesquisas que se houver uma forma de resfriar a fase como realizado com a SPME, haverá uma otimização do processo, pois sabe-se que com o resfriamento da fase, a extração seria favorecida termodinamicamente, pois trata-se de uma adsorção exotérmica. Assim surgiram pesquisas com o resfriamento da fase de SPME por um capilar, onde se passa um gás refrigerante, CO_2 (GHIASVAND; HOSSEINZADEH; PAWLISZYN, 2006). Com o surgimento da SBSE, com um volume de fase maior e consequentemente uma recuperação melhor, Carmi et al. (2009) desenvolveu-se um mecanismo para realizar a refrigeração da SBSE e obter melhor resposta que a SPME, assim surge a técnica denominada RSE (Refrigerated Sorptive Extraction), que baseia-se nos mesmos mecanismos da SPME obtendo ótimas respostas como demonstrado em trabalhos recentes (GROSSI, 2009).

Figura 4: Esquema de refrigeração da fibra e sua aplicação em Cromatografia gasosa. (GHIASVAND; HOSSEINZADEH; PAWLISZYN, 2006).

1.3.3. Aplicação de métodos multiresíduos

1.3.3.1. Análise de Organoclorados em Pescado

Contaminantes orgânicos presentes no meio ambiente são resultado de diferentes fontes de poluição oriundas de atividades antrópicas como processos industriais, aplicações agrícolas entre outros (BARREAK et al., 2009). Devido às características físico-químicas destes contaminantes, o que oferece a eles grande persistência ao meio ambiente, e seu uso extensivo, é possível encontrá-los na água, solo, podendo ainda promover sua acumulação em tecidos adiposos, gerando grande preocupação por se tratar de um risco potencial para os ecossistemas (BARREAK et al., 2009).

Entre estes, os Contaminantes Orgânicos Voláteis (VOCs) em água tem aumentado significativamente, devido ao seu extenso uso em países industrializados, se tornando uma preocupação ambiental e para saúde pública (LIN; LI, 2010).

Estes contaminantes são frequentemente encontrados em solos e águas subterrâneas devido ao vazamento de tanques de combustíveis (AMARAL et al., 2010). No Brasil destaca-se que vazamentos de tanques de combustíveis compreendem a 79% dos casos de contaminação de solos apenas no Estado de São Paulo, correspondendo a 2.279 áreas, os quais apresentam principalmente contaminantes como Benzeno, Tolueno e Xileno (BTX) (CETESB, 2009).

Além de Contaminantes Voláteis, os Semi-Voláteis também são de grande preocupação ambiental. Entre estes, os pesticidas organoclorados (OCPs), em particular, tem o potencial de trazer sérios efeitos tóxicos ao meio ambiente devido a sua resistência biológica, química e a fotodegradação. Os pesticidas organoclorados não apresentam efeito tóxico apenas nos organismos aquáticos como os peixes, mas eles podem se bioacumular e biomagnificar na cadeia alimentar exercendo efeitos carcinogênicos nos animais e seres humanos (MMUALEFE et al., 2009). Devido à diversidade, toxicidade e mobilidade dos contaminantes voláteis e semi-voláteis no meio ambiente, estes necessitam ser monitorados para verificar a conformidade da concentração destes frente a diferentes limites preconizados pela legislação visando promover segurança ao meio ambiente e a saúde pública.

No Brasil é possível destacar diferentes legislações que controlam a concentração de contaminantes voláteis e semi-voláteis para lançamento de efluentes e enquadramento dos corpos de água superficiais (CONAMA 357/2005) (CONAMA, 2005); contaminação de

águas subterrâneas (CONAMA 396/2008) (CONAMA, 2008); contaminação de solos (CONAMA 420/2009) (CONAMA, 2009); classificação de sedimento dragado (CONAMA 344/2004) (CONAMA, 2004). Estas legislações também são um reflexo de leis internacionais, que controlam além destas matrizes algumas outras de importância ambiental como sedimento, estabelecido, por exemplo, pelo órgão de controle ambiental do Canadá (CCME, 2002).

Como mencionado anteriormente, alguns contaminantes semi-voláteis, como os pesticidas organoclorados, podem bioacumular e biomagnificar na cadeia alimentar sendo necessário seu monitoramento nos alimentos. O monitoramento destes contaminantes em peixes, por exemplo, é utilizado como indicador ambiental e também para fins de saúde pública, por se tratar de um alimento, sendo definidos critérios de tolerância por diferentes países como Suíça (SWISS CONFEDERATION, 1995), Holanda (CBI, 2010), Japão (MINISTRY OF HEALTH, LABOUR AND WELFARE, 2006), Estados Unidos (EPA, 2000).

Estes limites são estabelecidos devido à toxicidade destas substâncias. De acordo com a organização mundial da saúde (WHO) e a agência de proteção ambiental do meio ambiente dos Estados Unidos (EPA), há evidências suficientes, baseados em estudos de animais e em humanos, mostrando que alguns VOCs têm efeitos carcinogênicos e mutagênicos em organismos vivos (LIU et al., 2009).

Tabela 6: Limites e níveis de tolerâncias de alguns países e normas como a EPA e a FDA para os Organoclorados de maior impacto em pescados.

Organoclorado	(EPA, 2000) (ppm) Nível de tolerância.	(EPA, 2000) (ppm) CSF-diário	(SWISS CONFEDERATION, 1995) (ppm)	(CBI, 2010) (ppm)	(MINISTRY OF HEALTH, LABOUR, AND WELFARE, 2006) (ppm)	(FAO/WHO, 2012) (ppm) (mamíferos marinhos)
Chlordane	0,3	0,35		0,02	0,05	0,05
Total DDT	5,0	0,34	1,0	0,5	3,0	5,0
Dieldrin	0,3	16,0	0,05	0,05	0,1	0,2
Heptaclor	0,3	9,1	0,05	0,02	0,05	0,2
Mirex	0,1					
PCBs	2,0	2,0				
Aldrin	0,3		0,05	0,05	0,1	0,2
Benzene Hexacloride	0,3	1,6	0,1	0,05	0,1	
2,4-D	1,0				1,0	
Lindane					1,0	0,1
HCH			0,1	0,02		
Endrin				0,02	0,005	
Simazine	12,0				10,0	

É importante ressaltar que no país até o momento não há padrões de controle e LMR's estabelecidos para estes compostos em peixe, desta maneira estes dados podem servir de proposta aos órgãos competentes. Estes dados como valores máximos de resíduos, mostram a importância e a urgência em estabelecer valores de controle de certos compostos nas matrizes de importância financeira para o país.

2. Objetivo

Considerando a notória importância na aplicação das ferramentas da qualidade como planejamento experimental, validação e cálculo de incertezas na área da química analítica, e também considerando que nesta área os métodos multiresíduos têm sido amplamente aplicados, este trabalho se propõe como objetivo geral a aplicação de ferramentas da qualidade no desenvolvimento de métodos multiresíduos. Para atendimento deste objetivo, foram traçadas as seguintes metas:

- Desenvolvimento e otimização de métodos multiresíduos (QuEChERS) para análise de compostos organoclorados em pescado avaliando a aplicação de ferramentas de qualidade: Planejamento experimental, Validação e cálculo de incertezas;
- Desenvolvimento de técnica analítica (RSE) para análise de compostos organoclorados em pescado com aplicação de ferramentas da qualidade;
- Desenvolvimento de ferramentas da qualidade – método para avaliação do parâmetro de validação linearidade.

3. Parte experimental

3.1. Método Quechers

3.1.1. Ferramentas da qualidade aplicadas no desenvolvimento, validação e cálculo de incerteza para análise de organoclorados em pescado utilizando o método QuEChERS.

O tema qualidade vem sendo aplicado em vários setores, inclusive nos laboratórios. As ferramentas utilizadas no âmbito do sistema de gestão laboratorial constituem também elementos úteis para controle e avaliação dos processos relativos aos métodos de ensaio. Como mencionado nos objetivos, o presente trabalho consiste em aplicar as ferramentas da qualidade para avaliar a metodologia estudada. É importante lembrar que a qualidade e a gestão dos laboratórios, são baseadas no que é designado nas normas ISO/IEC 17025 (Sistema de gestão laboratorial) e as bases de controle e procedimento da ISO 9001 (Sistema de gestão da qualidade). Assim propõe-se formular procedimentos condizentes e que assegurem as análises apropriadas para metodologia de trabalho, identificando as melhores situações e possíveis resoluções dos possíveis problemas encontrados.

Dos procedimentos e ferramentas já bem difundidas no âmbito da qualidade, julga-se que um planejamento deve ser realizado com o intuito de atingir a meta proposta. Sabendo também que o planejamento deve possuir estrutura flexível para que haja possibilidade de adaptação às situações que eventualmente surgirem. Assim o ciclo de Deming, ou seja, a ferramenta PDCA (Figura 5) é de fundamental importância em gestão da qualidade para otimização do que é esperado da metodologia.

Figura 5: Ciclo PDCA.

Com base na ideologia do ciclo, a proposta do trabalho foi desenvolver o método QuEChERS para análise de organoclorados em pescado. Desta forma deve-se avaliar quais são os parâmetros que pretende-se analisar e consequentemente observar se estes atendem o que o cliente exige ou o que a norma vigente estabelece, devendo se atentar sempre ao tipo de analito e ao tipo de matriz de trabalho, para que não ocorra má interpretação do que é exigido. Para análise da matriz pescado e os analitos organoclorados, observa-se que há normas bem estabelecidas, como na União Européia através da norma SANCO 12495/2011, que estabelece procedimentos para análise de pesticidas em alimentos com trabalhos realizados em laboratórios acreditados. É importante ressaltar que validação é um ato documentado que atesta que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, operação ou sistema realmente conduza aos resultados esperados. Este processo de validação é parte essencial da ISO/IEC 17025.

O documento da SANCO descreve o método de validação e controle de qualidade analítico para dar suporte à validade dos dados usados checando com os Limites Máximos de Resíduos. Sendo assim, os objetivos específicos deste documento são: prover um sistema harmonizado de custo-benefício do sistema da garantia da qualidade na União Européia; assegurar a qualidade e a comparação de resultados analíticos; assegurar que a precisão aceitável seja alcançada; assegurar que os falsos positivos ou falsos negativos não sejam reportados e dar suporte ao que é exigido pela ISO/IEC 17025 (padrão de acreditação) (SANCO, 2012).

Além desta norma da União Européia, temos também o que é vigente nos Estados Unidos com relação às normas referentes ao meio ambiente aplicadas pela EPA. Relacionando com o analito de trabalho através de método 8081B (EPA, 2007) e por se tratar de uma matriz com características de bioindicador, as normas da série SW-846, referente aos métodos de avaliação de resíduos sólidos, é um resumo oficial de métodos analíticos e amostragem que é avaliada e aprovada pelo uso em cumprimento com as regulações do RCRA (Resource Conservation and Recovery Act). Como o trabalho desenvolvido é focado em um alimento, e a metodologia foi toda desenvolvida em laboratório acreditado, como é exigido pela Resolução (EC) Nº 882/2004 do Parlamento Europeu e Conselho (COMUNIDADE EUROPÉIA, 2004), dentro de um órgão federal (Lanagro de Campinas – SP) pertencente ao Ministério da Agricultura, que realiza ensaios de monitoramento de analitos orgânicos e inorgânicos em produtos cárneos para exportação, principalmente para países europeus, optou-se pela norma SANCO 12495:2011. É importante ressaltar que validação trata-se de um procedimento não específico, ou seja, há vários guias a serem seguidos, e cabe ao analista escolher qual é o mais adequado ao tipo de trabalho proposto.

Com a norma estabelecida, deve analisar o que ela exige para ser atendida, ou seja, quais parâmetros devem ser avaliados para que esta esteja dentro dos padrões exigidos pela Comunidade Européia. A norma é ampla, e apresenta vários controles, desde a coleta da amostra até ao descarte dos resíduos. Mas como o trabalho proposto foi designado para análise da aplicação das ferramentas da qualidade, este será focado na parte de desenvolvimento e validação do método. A Figura 6 mostra as principais etapas de um ensaio laboratorial e enfatiza os passos que serão executados no trabalho.

Figura 6: Etapas para realização de um ensaio em um laboratório enfatizando a parte que será desenvolvida no trabalho. Adaptado de Olivares, 2009.

3.1.1.1. Desenvolvimento do Planejamento Experimental – Otimização QuEChERS

O planejamento experimental é uma parte fundamental para o desenvolvimento da metodologia e uma ferramenta de extrema importância para avaliar quais são os fatores que mais influenciam no método. Este parâmetro de qualidade pode ser visto também como um teste de robustez do método para observar a variação dos fatores que o método suporta sem ter seus resultados alterados.

Para o seu desenvolvimento averiguou-se qual é o fator que tem maior influência na validação em um processo multiresíduo, neste caso observou-se que a recuperação é de maior significância, assim foi definido os fatores que poderiam interferir nesse parâmetro. Seguindo a rotina do QuEChERS original, observou-se que o solvente de trabalho na extração líquido-líquido ou líquido-sólido é um importante fator, assim como a quantidade de massa de Cloreto de Sódio (NaCl) no aumento da força iônica, quantidade de Sulfato de Magnésio (em

ambas as fases, extração líquido-sólido e dSPE) e a quantidade de PSA (Primary-Secondary Amine). Todos estes fatores são essenciais na técnica original, mas deve-se atentar para a complexidade da matriz, ou seja, o grau de interferentes existentes.

Desta forma, foi realizado um planejamento experimental para analisar os fatores que influenciam na técnica QuEChERS, ou seja, qual o grau de influência direta na metodologia, como seus sais e suas quantidades, e desta forma obter os melhores dados possíveis de recuperação.

Figura 7: Diagrama de Ishikawa para planejamento experimental da técnica QuEChERS.

Com os fatores estabelecidos foi utilizado Software Statistica 7 para determinação da aleatorização dos experimentos para evitar erros sistemáticos, foi realizado um planejamento completo 2^3 com três pontos centrais para observação do desvio padrão. No início dos estudos, se tratando de vários fatores (massa matriz, volume solvente e os sais de trabalho) foi realizado um planejamento univariado com alguns dos fatores (massa da matriz e volume do solvente) e depois da otimização destes fatores foi estabelecido a fixação do Sulfato de magnésio (retirada de água residual), pois se trata de um reagente barato e por considerar que a matriz continha pouca água residual. Estas escolhas foram satisfatórias como mostradas posteriormente nos resultados. O planejamento foi comparado com planilhas de Excel para confirmação dos resultados obtidos como garantia da qualidade do procedimento (Apêndice B) dentro de um nível de confiança de 95%.

3.1.1.2. Parâmetros para validação

A utilização de um bom planejamento evita o retrabalho das análises laboratoriais, além de economizar recursos que muitas vezes são limitantes das análises, como amostras ambientais e amostras na área de perícia criminal, estruturando assim um estudo integrado interagindo com uma multiplicidade de fatores, como a parte cultural, econômica, ambiental e social. Após este passo foi realizada análise dos parâmetros que tem influência direta na análise, com isso destaca-se que apesar de vários parâmetros serem exigidos dentro da SANCO/12495 e até mesmo na DOC-CGCRE-008 do INMETRO, e considerando o guia de validação do MAPA (MAURICIO et al., 2011) que também é baseado nestes documentos, destaca-se que há orientação de que alterações nos parâmetros e critérios de validação podem ser necessários devido a especificidade de cada laboratório.

Foi definido que se tratando de uma técnica de extração, um dos fatores de extrema importância a ser avaliado, é a recuperação/exatidão e que este deve estar entre 70 e 120%, a precisão não deve exceder 20% no coeficiente de variação (CV). Foi analisado também a linearidade/sensibilidade do método, que não deve ter resíduo superior a 20% e coeficiente de determinação acima de 0,98, bem como proposta a inserção de cálculo de incerteza para sua avaliação. As extrações foram realizadas com o efeito da matriz e posteriormente fortificadas com os 5 pontos exigidos e com as respectivas 6 replicatas para cada ponto, foi realizado também análise da repetibilidade da metodologia e por fim o cálculo da incerteza do método. Todos estes parâmetros foram definidos conforme exigência do guia SANCO.

Figura 8: Fluxograma do processo de trabalho para aplicação das ferramentas da qualidade.

3.1.1.2.1. Recuperação/Exatidão

Exatidão é a concordância entre o valor verdadeiro do analito na amostra e o extraído no processo analítico e é um dos parâmetros chaves para validação de metodologia. O processo se baseia em quatro métodos principais:

- Comparação do método proposto com um método de referência;
- Uso de ensaios de recuperação na matriz;
- Estudos colaborativos;
- Uso de material de referência certificado (MRC).

Sabe-se que a melhor forma para realização deste parâmetro é a utilização de material de referência, pois está envolvido diretamente com padrões internacionais, garantindo assim a

rastreabilidade do método. A amostra é analisada e seu valor de recuperação é comparado com o valor certificado pelo produtor do MRC. O grande problema da utilização deste material de referência é o seu alto custo e a limitação de amostras com a matriz e analito de interesse (BRITO et al., 2003), além da faixa de concentração desejada. Fator que já está se alterando no país com a acreditação de produtos de MRC pelo INMETRO. Este fator abre portas para o surgimento de novos MRC no país conforme a demanda.

A exatidão pode também ser obtida pela comparação dos dados obtidos com um outro método já validado. Após análise de diferentes amostras, as diferenças obtidas para cada amostra são calculadas e comparadas com o valor desejado. Entretanto nem sempre se encontra método de referência preexistente, impossibilitando a utilização deste procedimento. O desenvolvimento por estudos colaborativos é conduzido com a aceitação do desenvolvimento do método com outros laboratórios, com um mínimo absoluto de 5 participantes. O grande problema desta metodologia é manter a exatidão do método já que o estudo envolve a estabilidade do composto, o que torna uma tarefa difícil quando se trata de compostos com certo grau de volatilidade ou degradação. Neste processo de validação utiliza-se análise de variância (ANOVA) para determinação de diferença significativa entre os laboratórios envolvidos.

O ensaio de recuperação constitui o método mais utilizado em validação de processos analíticos, e a recuperação esta relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade de analito recuperado em relação à quantidade real presente na amostra. A exatidão é expressa em porcentagem e podem possuir erros sistemáticos inerentes ao processo, como perda da substância, medidas volumétricas imprecisas, interferentes na amostra, entre outros fatores. (BRITO et al., 2003).

$$Exatidão = \left[1 - \frac{(V_{real} - V_{determinado})}{V_{real}} \right] \cdot 100$$

Equação 2: Fórmula para cálculo da exatidão.

3.1.1.2.2. Linearidade/Sensibilidade

A linearidade de uma curva analítica é a resposta obtida (instrumentação) em função da concentração a qual deve ser estudada em um intervalo de concentração apropriado, na prática a linearidade é determinada através de gráficos de calibração, seguido de tratamento estatístico. O número mínimo de pontos geralmente aceito nas curvas de calibração varia entre 5 e 6 pontos. Seguindo a orientação da SANCO/12495:2011 foi estabelecido 5 pontos para a curva analítica com 3 replicatas para cada ponto. As concentrações da faixa de trabalho devem ser escolhidas entre 50% a 150% do valor esperado da amostra em estudo.

Algumas formas de realizar a curva são bem difundidas na área da química, como fortificação da matriz em várias concentrações seguido do processo de extração. Outra forma é a extração da matriz limpa e posteriormente fortificação do extrato (Figura 9). Também muito aplicada é a fortificação do solvente, que não existe a interferência da matriz, esta técnica não analisa a linearidade da metodologia e sim a do equipamento de trabalho.

Figura 9: (A) Extração da matriz pré-fortificada nas concentrações da faixa de trabalho; (B) Extração da matriz limpa com posterior fortificação do extrato com as concentrações na faixa de trabalho.

Assim para ter-se a melhor resposta da metodologia foi realizado o procedimento de extração do branco e posteriormente sua fortificação nas concentrações desejadas para realização da curva na faixa de trabalho. Foi realizado fortificação nos pontos de concentração 0,5; 0,8; 1,0; 1,5 e 2,0 LMR (1 LMR é igual aos valores propostos mais a frente na tabela 9).

Após construção da curva foi desenvolvida uma sistemática de avaliação da mesma, para se ter parâmetros que afirmam o quanto adequada é a curva em relação a metodologia

aplicada. Esta sistemática desenvolvida é apresentada no capítulo de resultados (4.1.4. Desenvolvimento de modelo para avaliação da curva de calibração).

3.1.1.2.3. Seletividade

O termo especificidade, muitas vezes utilizado como sinônimo de seletividade define a capacidade do método em detectar o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz. Já a seletividade refere-se à capacidade de detecção de substâncias. O processo para demonstrar a especificidade do método depende do seu objetivo. Em diversas técnicas analíticas (como nas análises cromatográficas, por exemplo) esse parâmetro pode ser estabelecido pela comparação do resultado obtido com a combinação de vários fatores. Como substâncias diferentes podem apresentar respostas similares em dadas condições deve-se proceder à análise, seguida por outras técnicas comprobatórias (como cromatografia ou eletroforese acoplada à espectrometria de massas). Outra maneira de avaliar a especificidade envolve a adição de padrão analítico (muito empregada em análises por espectrometria de absorção ou de emissão atômica) ou a comparação com padrão externo (BRITO et al., 2003).

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. Os interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito também pode depender da concentração. Experimentos para avaliação da seletividade descritos na literatura sobre validação de métodos analíticos envolvem ensaios com padrões ou materiais de referência, amostras com e sem o analito, além da avaliação da capacidade de identificação do analito de interesse na presença de interferentes. Quando não há disponibilidade de interferentes, alguns autores sugerem a avaliação da habilidade de medição do analito por diferentes métodos, técnicas ou por meio de variações nas condições instrumentais. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a tendência e a precisão estarão seriamente comprometidas (DOC-CGCRE-008, 2010).

Tabela 7: Avaliação da seletividade segundo a DOC-CGCRE-008 do INMETRO.

Procedimento	Demonstrar	Comentários
a) Fazer a análise com a amostra e materiais de referência pelo método em estudo e outros métodos validados.	Habilidade do método em estudo de identificar e dosar o analito na presença de interferentes.	Evidências necessárias para dar suporte e gerar confiabilidade suficiente.
b) Analisar amostras contendo vários interferentes suspeitos na presença do analito de interesse.	Efeito de interferentes – a presença de interferente acentua ou inibe a detecção ou quantificação do analito de interesse.	Se alterar resultados, aperfeiçoar o método ou selecionar outro mais adequado.

Já a SANCO/12495:2011 requer que interferentes na resposta do branco não apresentem sinal superior a 30% em relação aquele obtido no Limite de Quantificação.

3.1.1.2.4. Precisão

É a expressão da concordância entre vários resultados analíticos obtidos para uma mesma amostra. Pode ser determinado em condições de repetibilidade ou em condições de reprodutibilidade intralaboratorial (OLIVARES, 2006b): intra-dias ou inter-dias, além de precisão intermediária.

A repetibilidade pode ser obtida utilizando parâmetros iguais na análise, como amostra, laboratório, analista e equipamento, já a reprodutibilidade intralaboratorial utiliza a mesma amostra, mas difere em pelo menos um dos fatores, laboratório, analista ou equipamento.

Figura 10: Diferença entre repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial para análise de precisão.

A precisão é obtida utilizando a seguinte fórmula,

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

Onde CV é a coeficiente de variação, s é o desvio padrão e o $\bar{x}$ é a média.

Equação 3: Fórmula para cálculo da constante de variação (CV).

3.1.1.3. Cálculo da incerteza

O VIM (Vocabulary International Metrology) define a incerteza como um parâmetro “não negativo caracterizando a dispersão dos valores atribuídos ao mensurando, baseado na informação usada”. Em outras palavras, o cálculo da incerteza demonstra o nível de confiança de um resultado analítico. Não há um processo único para calcular a incerteza, mas a ISO/IEC 17025 (requerimento 5.4.6.2) estipula que: “Em certos casos a natureza do teste pode impedir o cálculo da incerteza de uma forma mais rigorosa, metrológica e estatisticamente válida. Neste caso o laboratório deverá pelo menos identificar todos os componentes da incerteza e fazer uma estimativa razoável, e assegurar que a forma de reportar os resultados não transmita uma impressão errada da incerteza. Estimativas razoáveis devem ser baseadas no conhecimento da performance do método e o escopo de medidas deve fazer uso de experiência prévia de dados de validação”.

Considerando as diferentes formas para calcular a incerteza, o guia EURACHEM/CITAC aparece como referência de aplicação. De acordo com este guia, o cálculo da incerteza envolve 4 passos básicos:

- Especificar o mensurando;
- Identificar as Fontes de incerteza; (na literatura há diferentes formas de abordagem de escolha das fontes e cálculo da incerteza), pelas seguintes abordagens:

Bottom-up – é baseado na identificação, quantificação e combinação de todas as fontes de incerteza. Geralmente, é a abordagem mais complexa, pois considera todas as fontes de incerteza do método analítico. Este cálculo é aplicado usando principalmente a incerteza de equipamentos volumétricos (por exemplo, micropipetas, balanças entre outros). Estes geralmente tem suas incertezas expandidas declaradas em certificados de calibração.

Fitness for purpose – é baseado em uma única definição de parâmetro chamado de função de adequação, esta abordagem é baseada principalmente em estudos de precisão e exatidão.

Top-down – é baseado em dados obtidos por estudos interlaboratoriais (precisão). Esta abordagem requer informações de estudos colaborativos e o cálculo é baseado em desvio padrões de informações disponíveis.

Validation-based – é baseado em estudos de validação interlaboratoriais ou intralaboratoriais (precisão, exatidão e robustez). Este cálculo é geralmente baseado em desvio padrão da informação disponível.

Robustness-based – é baseado em teste de robustez de estudos interlaboratoriais. Este cálculo também é baseado em desvio padrão das medidas.

O guia EURACHEM/CITAC cita dois métodos mais utilizados, a abordagem Bottom-up e o Validation-based. Embora os dois métodos serem aplicáveis a metodologia, será utilizado o Validation-based por ser considerado a forma mais fácil para prover uma boa estimativa do cálculo da incerteza (OLIVARES E LOPES, 2012).

- Quantificar os componentes da incerteza;
- Calcular a incerteza combinada e expandida.

3.1.1.4. Método para análise de organoclorados em pescado (QuEChERS)

Foi desenvolvido um método multiresíduo (QuEChERS) para avaliar a extração de 14 organoclorados (Tabela 8) de matriz peixe. O objetivo deste trabalho foi aplicar diferentes ferramentas da qualidade (Planejamento Experimental, validação e cálculo de incerteza) segundo exigência de alguns guias de validação nacionais e internacionais. Como orientação nacional foi utilizado o DOC-CGCRE-008 (INMETRO, 2011) e a norma ISO/IEC 17025, e como orientação internacional a SANCO/12495/2011 (SANCO, 2012).

Tabela 8: Compostos organoclorados estudados:

Nome	PM	Fórmula molecular	Fórmula estrutural
Hexaciclorobenzeno (HCB)	288	$C_6H_6Cl_6$
Heptacloro Hepóxido (HPX)	386	$C_{10}H_5Cl_7O$
Dieldrin (DLD)	378	$C_{12}H_8Cl_6O$
2,2,-bis-p-clorofenil-1,1,-dicloroetileno (DDE)	316	$C_{14}H_8Cl_4$
2,2,-bis-p-clorofenil-1,1,-dicloroetano (DDD)	318	$C_{14}H_8Cl_4$

Diclorodifeniltricloroetano (DDT)	352	C₁₄H₉Cl₅
Aldrin (ALD)	365	C₁₂H₈Cl₆
Chlordane (cCLD e tCLD)	410	C₁₀H₆Cl₈
Mirex (MRX)	545	C₁₀Cl₁₂
Lindane (LIN)	291	C₆H₆Cl₆
2,3',4,4',5-Pentaclorobifenil (PCB 118)	326	C₁₂H₅Cl₅
2,2',3,4,4',5,5'- Heptaclorobifenil (PCB 180)	395	C₁₂H₃Cl₇

3.1.1.4.1. Padrões e reagentes

Foram utilizados padrões de Organoclorados e PCB's fornecidos pelo LANAGRO, todos da Accustandard, com grau de pureza acima de 98%. Foi utilizado o n-hexano para a extração líquido-líquido. Os sais utilizados na fase dispersiva foram o Sulfato de magnésio e Cloreto de Sódio e na fase de clean-up foram usados o PSA e o C18. A matriz foi fornecida por produtores credenciados ao Lanagro, com a garantia de amostras limpas, o que foi provado no teste de seletividade realizado.

3.1.1.4.2. Materiais e equipamentos

Para realização do trabalho foi utilizado balança analítica BEL engineering Mark 160, vortex AP56 Phoenix, centrífuga Fanem Excelsa 4 Mod. 280R, balão volumétrico, micropipeta Ecopipette e para análise das extrações GC-ECD da marca Thermo (Thermo Trace Gc Ultra).

3.1.1.4.3. Preparação das amostras e padrões

O método QuEChERS foi desenvolvido no ambiente de um laboratório acreditado (pré-requisito para uma abordagem de qualidade), conforme Apêndice A, com isso tem-se que todos equipamentos utilizados dentro do laboratório são calibrados periodicamente e auditados pelo INMETRO.

Inicialmente foi preparada uma solução estoque com os 14 compostos organoclorados em seus respectivos LMRs (Limite Máximos de Resíduos) e acondicionados em um refrigerador. A matriz pescado foi fornecida por um criador local e disponibilizado ao Lanagro-SP, esta foi limpa e triturada com o cuidado para obter apenas as partes de interesse do peixe (filé comercialmente disponível) e posteriormente também foi acondicionado em refrigerador para sua conservação.

Tabela 9: Proposta enviada a CCRC (Coordenação e Controle de Resíduos e Contaminantes).

Analito	Proposta (ppb)	Referência
Chlordane	300	(EPA, 2000)
Total DDT (DDD; DDT e DDE)	5000	(EPA, 2000)
Dieldrin	300	(EPA, 2000)
Heptaclor e Heptachlor epoxide	300 (apenas Heptachlor Epoxide)	(EPA, 2000)
Mirex	100	(EPA, 2000)
Total PCBs	2000	(EPA, 2000)
Aldrin	100	(MINISTRY OF HEALTH, LABOUR, AND WELFARE, 2006)
Benzene hexachloride (HCB)	100	(MINISTRY OF HEALTH, LABOUR, AND WELFARE, 2006)
Lindane	1000	(MINISTRY OF HEALTH, LABOUR, AND WELFARE, 2006)

A solução estoque foi preparada se atentando aos LMRs de cada analito. Para isso foram investigados quais seriam estes possíveis valores, já que o país não possui referência para organoclorados em peixes, desta forma foram avaliados os valores internacionais destes limites em diferentes países como destacado na Tabela 9, principalmente os valores preconizados pelos Estados Unidos e Europa. Com base nestes valores, foi sintetizado uma proposta de valores máximos a ser aplicado no Brasil e submetida à CCRC (Coordenação e Controle de Resíduos e Contaminantes do MAPA).

Estes valores foram adotados como os LMRs para o trabalho, sendo assim preparada a solução estoque. Para extração das amostras fortificadas, a matriz e o padrão foram retirados da refrigeração e acondicionados em temperatura ambiente, seguido da pesagem de 2 g da matriz e colocados em tubo de centrifuga de 50 mL. Nesta amostra foi adicionado 250 uL da solução estoque atentando-se para que toda solução fosse bem dispersada na matriz e sendo aguardado 60 minutos para interação do analito com o pescado. Após este passo foi adicionado 8 mL de hexano para realização da primeira etapa do procedimento QuEChERS, extração líquido-sólido, sendo agitado por 3 minutos em vortex. Em seguida foi adicionado, 0,5 g de NaCl para aumentar a força iônica do meio e 1 g de MgSO₄ para remoção de água

residual. Esta mistura foi agitada novamente em vortex por 3 minutos e depois foi centrifugado por 10 minutos (3500 rpm).

Na sequência, foi realizado a segunda etapa, a dSPE (dispersão da matriz em fase sólida), onde foi coletado uma alíquota de 3 mL da primeira etapa e adicionado 500 mg de MgSO_4 para remoção da água restante, 50 mg de sorbente PSA para remoção de açúcares e ácidos graxos e 75 mg de C18 para remoção de interferentes apolares como lipídios. Esta mistura foi agitada durante 1 minuto em vortex e centrifugada por 10 minutos (3500 rpm) sendo o extrato final analisado em GC-ECD. É importante ressaltar que os volumes e massas trabalhados foram pré-determinados em estudo de planejamento experimental multivariado que será detalhado nos resultados, com exceção da massa da matriz e volume do solvente que foram otimizados em planejamento experimental univariado, como citado anteriormente.

3.1.1.4.4. Método Cromatográfico

Para análise das extrações dos Organoclorados foi utilizado GC-ECD (Gas Chromatograph-Electron Capture Detector) da marca Thermo (Thermo Trace Gc Ultra). O método foi desenvolvido em uma coluna apolar OV-5MS (25m x 0,25 mm x 0,25 μm) da Ohio Valey (95% Dimetil e 5% difenilpolisiloxano). Foi utilizado um injetor automático AS 3000 com volume de injeção de 1 μL com 10 ciclos de lavagem da seringa, pré-injeção (2 ciclos de lavagem com acetona e hexano), amostra (3 ciclos de lavagem com a amostra) e pós-lavagem (5 ciclos de lavagem com acetona e hexano). A injeção foi no modo Splitless, fluxo constante do gás de arraste de 0,8 mL, temperatura injetor de 250°C, Temperatura do detector foi fixada em 300°C e rampa de aquecimento como descrita na Figura 11.

Figura 11: Gráfico (A): rampa de aquecimento da coluna inicia a 80°C/ 1,5 min., taxa de 40°C/min. até temperatura de 170°C, taxa de 6,5°C/min. até temperatura de 220°C/7,0 min., taxa de 15°C/min. até temperatura de 245°C e por fim taxa de 50°C/min. até temperatura de 265°C/4 min. Gráfico (B) fluxo do gás de arraste de 0,8 mL/min.

Com a etapa cromatográfica otimizada, foi injetado os padrões para obter os respectivos tempos de retenção. A Figura 12 apresenta o cromatograma para os 14 analitos.

Figura 12: Cromatograma do método cromatográfico da melhor condição para separação dos 14 compostos organoclorados; tempo de retenção: HCB, 8,017 min.; LIN, 8,410 min.; ALD, 10,817 min.; HPX, 11,722 min.; tCLD, 12,350 min.; cCLD, 12,810 min.; ppE, 13,440 min.; DLD, 13,575 min.; PCB118, 14,723 min.; ppD, 14,990 min.; opT, 15,218 min.; ppT, 16,847 min.; PCB 180, 20,383 min.; MRX, 21,153 min.

3.2. Método RSE

3.2.1. Desenvolvimento do planejamento experimental – Otimização da fase extratora RSE

Antes da construção do sistema de extração, buscou-se a melhor forma de confecção da fase de PDMS para ter-se a melhor resposta de extração no sistema. Segundo a literatura e o fabricante, a composição adequada de polímero PDMS e seu agente de cura é a relação de 10:1(m:m). Desta forma foi realizada a mistura vigorosamente das fases e condicionada em um sistema de vácuo para retirada de gases presente na mistura, depois deste processo foi adicionado à mistura ao molde (destacado construção no capítulo 3.2.2. Desenvolvimento do método RSE). Este foi fechado com o cuidado de não perder massa como demonstrado na imagem (e) da Figura 16 e colocado em um forno à temperatura de 100°C durante 45 minutos para pré-cura da fase. Depois deste passo o molde foi desmontado para retirada da barra de RSE e esta foi direcionada para mufla a alta temperatura para retirada de possíveis interferentes e oligopolímeros que não se polimerizaram no primeiro aquecimento. No entanto, foi observado que o tempo entre o forno e a mufla interferiam no processo. Desta forma foi realizado um planejamento experimental com três fatores após a pré-cura: período exposto à temperatura ambiente, tempo e temperatura de mufla para observação da robustez na mudança destes fatores.

Tabela 10. Dados dos níveis do planejamento experimental na confecção da fase de extração com polímero PDMS.

Fatores	Nível Inferior	Nível Superior
	-1	+1
(1) Temperatura da mufla (°C)	100	200
(2) Tempo de mufla (min.)	60	180
(3) Tempo a temperatura ambiente (min.)	0	240

Foi realizado um planejamento experimental completo 2^3 e os dados já codificados em nível inferior (-1) e nível superior (1) foram direcionados para o Software Statistica 7 para ter-se a aleatorização dos experimentos, e foi obtido a seguinte sequência:

Tabela 11: Aleatorização dos experimentos pelo Software Statistica 7.

Experimento	T da mufla	Tempo de mufla	Tempo a temp. ambiente
2	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
1	-1	-1	-1
7	-1	+1	+1
3	-1	+1	-1
8	+1	+1	+1
4	+1	+1	-1

Para confecção das barras de SBSE (Stir Bar Sorptive Extraction) foi utilizado metal cilíndrico cortado na dimensão para utilização do molde, e este foi revestido com vidro para não obter interferentes provenientes do metal e que esse não se oxide em meio aquoso. Assim, foram confeccionadas 8 barras conforme tabela acima, e estas foram direcionada para testes em extração de um HPA (Hidrocarboneto Poliaromático) o Antraceno em água, para observação da recuperação. O processo de extração foi otimizado para obtenção do maior índice de recuperação do composto analisado sendo utilizada a metodologia descrita por Lynam, 2012.

As barras sortivas foram adicionadas em solução fortificada com Antraceno ($25\mu\text{g.L}^{-1}$) volume de 10 mL e colocada sob agitação (500 rpm) durante um período de 2 horas a temperatura ambiente. Após a extração, o Antraceno foi dessorvido da barra adicionando a mesma em vial com 1,5mL de uma solução de Acetonitrila/Tolueno (80:20%) e colocados durante 20 minutos em banho ultrassônico. Esta solução foi injetada em cromatógrafo gasoso para análise do Antraceno. Algumas modificações foram realizadas no método de Lynam para obter o analito de interesse, assim utilizou-se uma coluna DB-5 da Agilent; temperatura do injetor de 280°C , fluxo de gás hélio 1 mL/min e split 1:10 e a seguinte rampa de aquecimento.

Tabela 12: Rampa de aquecimento proposta para a coluna DB-5 da Agilent.

Temperatura (°C)	Taxa (°C/min)	Hold (min)	Total (min)
80	-	1	1
200	20	1	8
280	10	2	18

Com isso foi obtido o seguinte cromatograma para o antraceno que foi quantificado em uma curva analítica de 10 - 330 ug/L, conforme Figura 13.

Figura 13: (A) Curva analítica para o analito Antraceno; (B) Cromatograma representativo.

3.2.1.1. Padrões e reagentes

Para construção do molde de confecção das barras de RSE foi utilizado um tarugo de teflon. O polímero utilizado foi o Polidimetilsiloxano (PDMS) e seu agente de cura da Dow Corning. Os padrões utilizados para a extração no teste de robustez foi o Antraceno e para análise de extração foram utilizados Organoclorados e PCB's fornecidos pelo Lanagro, todos da Accustandard com grau de pureza acima de 98%, Cloreto de Sódio cristal PA, Quemis para o aumento da força iônica, água destilada, Acetonitrila PANREAC 99,9%, tolueno MALLINCKRODT para o processo de dessorção. A matriz foi fornecida por produtores credenciados ao Lanagro, com a garantia de amostras limpas, o que foi provado no teste de seletividade realizado.

3.2.1.2. Materiais e equipamentos

No processo de confecção das barras de RSE foi utilizado uma balança analítica Gettaka AG 200 para pesagem do polímero e seu agente de cura, assim como para pesagem dos analitos, bomba de vácuo para desgaseificação do polímero após mistura, forno mufla para o processo de cura. Para o processo de extração foi utilizado vial de headspace da Agilent 20 mL modificado, barra magnética de agitação de 2 cm, agitador magnético IKA C-MAG HS7, micropipeta 10-100 uL marca HTL Labmate+, lacre 20 mm de alumínio septo de PTFE, lacrador e deslacrador manual ergonômico 20 mm, vial de dessorção Agilent 1,5 mL. Para o teste de robustez foi realizado análise em GC-MS CP-3800 da VARIAN e para análise das extrações GC-ECD.

3.2.1.3. Preparação das amostras e padrão

Os padrões utilizados no método de extração RSE foi o mesmo da técnica QuEChERS. Para desenvolvimento da melhor condição de produção da fase de PDMS foi utilizado um hidrocarboneto poliaromático, o Antraceno como já destacado. A matriz pescado cedida pelo Lanagro de Campinas – SP.

3.2.1.4. Método Cromatográfico

O método utilizado foi o mesmo da técnica QuEChERS.

3.2.2. Desenvolvimento do método RSE

Para o desenvolvimento da técnica, planejou-se um molde que foi confeccionado pela oficina mecânica do campus da USP de São Carlos. As barras de SBSE comercial, normalmente possuem um volume maior de fase de PDMS, o que limita o trabalho apenas em dessorção líquida, perdendo assim em sensibilidade da técnica. Devido a esse limitante, foi construído um molde com as dimensões para ter-se 24 uL de fase sortiva para que pudesse ser acoplado em um sistema de dessorção térmica conforme apresentado na Figura 14.

Figura 14: Chromatoprobe Varian – (A) Esquema do Chromatoprobe utilizado para dessorção térmica dos analitos da barra sortiva para o cromatógrafo; (B) Posicionamento da barra sortiva no Chromatoprobe; (C) Acoplamento do Chromatoprobe com a barra sortiva ao cromatógrafo.

Desta maneira foi esquematizado um molde para confecção das barras de RSE (Figura 15) para que fosse possível ser acoplada ao PROBE de dessorção térmica disponível visando a aumentar a sensibilidade do método. O molde foi adaptado de Grossi, 2009, com alterações nas dimensões.

Figura 15: Projeto para confecção do Molde. (A.) Suporte de teflon com o tubo oco de aço; (B.) suporte de teflon agregado ao molde de teflon; (C.) Esquema da barra de SBSE ou RSE com suas dimensões para utilização em PROBE; (D.) vista do molde com seus dois lados juntos; (E.) molde já com o sistema de travas para confecção das barras. Adaptado de Grossi, 2009.

A Figura 16 apresenta o molde já finalizado, mostrando as partes de encaixe, suporte e presilha. O molde foi confeccionado em teflon e a presilha em alumínio. A presilha foi confeccionada para garantir que o suporte esteja bem fixo e que não haja perda do polímero durante a confecção.

Figura 16: Molde já finalizado: (a) Dois lados do molde e suporte de teflon; (b) Suporte com barra ou tubo oco de aço; (c) suporte de teflon agregado ao molde; (d) vista lateral do conjunto; (e) vista superior do conjunto; (f) Suporte com a barra de RSE já revestida com PDMS; (g) barra de RSE.

O sistema RSE sendo uma técnica nova de extração, é um método que necessita de adaptações para que se atinja o ápice em eficiência, assim alguns passos foram executados para otimização da metodologia quando comparada com o desenvolvido por Carmi, 2006. A Figura 17 exemplifica as partes do sistema, em que é necessário uma refrigeração constante da barra de extração para que este entre em um equilíbrio termodinâmico, entre a fase extratora e a fase de headspace, conforme o coeficiente de equilíbrio de cada analito. Com a refrigeração há um deslocamento deste coeficiente para a fase extratora (polímero PDMS), aumentando assim, a eficiência do processo, com isso foi executado um procedimento de planejamento experimental para buscar a melhor forma de confecção da fase como demonstrado no capítulo 4.2.1. Assim, o sistema adaptado de Grossi, 2009 sofreu algumas alterações para o trabalho proposto como, por exemplo, o sistema de vedação por anéis o-rings, para evitar perda de analito para o meio e a dimensão da fase extratora.

Figura 17: Sistema RSE. (A) Tubo oco revestido com a fase PDMS no suporte de teflon; (B) Suporte de Teflon do vial Headspace com o tubo de RSE; (C) Vial de headspace com braços laterais, suporte e tubo de RSE; (D) Sistema RSE acoplado com sistema de refrigeração; (E) Sistema RSE com aquecimento de 85°C em agitador magnético; (F) Sistema RSE com vapor na fase de headspace.

Com a utilização de gás para refrigeração, pode-se atingir temperaturas muito baixas o que aumenta o leque de trabalho com o sistema, necessitando de estudos profundos termodinâmicos para analisar viabilidade das baixas temperaturas. Com isto pode-se utilizar CO₂ como gás refrigerante e como controle desta temperatura para não se atingir temperaturas

mais abaixo do que se pretende pode ser injetado ar comprimido em um misturador de gases confeccionado em vidro, como é evidenciado na imagem B da Figura 18. Todos os cabos foram isolados para não absorver calor do ambiente e por consequência diminuir a eficiência da refrigeração. Sendo assim, a Figura 18 mostra o sistema completo montado, pronto para o processo de extração. Estudos futuros devem ser iniciados para estudos dos parâmetros que influenciam diretamente no método.

Figura 18: Sistema de refrigeração da fase sortiva - (A) Cilindro de Gás; (B) Misturador de gases (*homemade*); (C) Conexão com o misturador de gases e mangueiras; (D) Esquema com a refrigeração da barra conectado a linha de gás; (E) Vial de headspace pronto para a extração; (F) Sistema completo.

4. Resultados e discussão

4.1. Aplicação das ferramentas da qualidade no desenvolvimento, validação e cálculo da incerteza para análise de organoclorados em pescado pelo método QuEChERS

Para avaliação do método QuEChERS necessitou primeiramente definir as concentrações de analito, ou seja, os LMRs de trabalho os quais foram apresentados na Tabela 9.

4.1.1. Planejamento experimental

Trabalhando-se com a extração de organoclorados em pescado, pelo método QuEChERS, observou-se dificuldades na extração no intervalo que a norma SANCO 12495 exige, que são as extrações entre 70 e 120%, sendo assim uma otimização do processo de extração foi planejada. Primeiramente fixaram-se alguns pontos que foram considerados já bem estudados, como por exemplo, o volume de solvente orgânico (Hexano), a massa da matriz devido a limitação de material a disposição e a quantidade de sulfato de magnésio, que foi considerado um material de fácil acesso, não inviabilizando assim sua utilização na rotina de trabalho, todos estes fatores foram otimizados com planejamento univariado.

A escolha das variáveis para o planejamento experimental foram, o sal da fase de extração líquido-líquido, o NaCl (com nível baixo (-1) de 0,5 g e nível alto (+1) de 1,5 g), para observar a influência da força iônica na extração dos analitos de interesse. Também foi adicionado como variável no planejamento a massa de PSA com nível baixo (-1) de 50 mg e nível alto (+1) de 150 mg e utilização de C18 com nível baixo (-1) de 25 mg e nível alto (+1) 75 mg, na fase de Clean-up usando o método de dSPE (Dispersive Solid Phase Extraction). Com estes dados, foi realizado um planejamento experimental 2^3 completo, onde foi utilizado o Software Statistica 7 para promover a aleatoriedade para o tratamento dos dados, e como comparação e confirmação dos resultados utilizamos a Planilha Excel, conforme Apêndice B.

Sendo assim, foi preparada a planilha de planejamento para promover a sequência de execução dos experimentos no Software Statistica 7, a qual foi realizada com triplicata no ponto central para observar a reprodutibilidade do experimento, desta maneira obteve-se a seguinte sequência (Tabela 13).

Tabela 13: Planejamento experimental com os níveis baixos e altos distribuídos aleatoriamente para análise.

Experimentos	NaCl	PSA	C18
(1)	-1	-1	-1
(5)	-1	-1	1
(10 C)	0	0	0
(4)	1	1	-1
(7)	-1	1	1
(8)	1	1	1
(2)	1	-1	-1
(6)	1	-1	1
(9 C)	0	0	0
(3)	-1	1	-1
(11 C)	0	0	0

Foi realizado o método QuEChERS para extração dos organoclorados e observou-se as recuperações das amostras fortificadas no LMR (Limite Máximo de Resíduos) dos 14 analitos da Tabela 9. Para se obter uma referência de quanto seria a máxima extração possível, foi utilizado uma amostra branca (sem os analitos), onde todo o processo de extração foi realizado e ao final do mesmo, foi adicionado os analitos no solvente da fase extratora. Observaram-se assim as seguintes áreas para a amostra branca fortificada.

Tabela 14: Área das recuperações da amostra branca fortificada sem perdas do processo de extração.

Analito	Área (Fortificado LMR 100%)
HCB	27874167
LIN	118114674
ALD	20908374
HPX	58917290
tCLD	62463266
cCLD	59969236
ppE	141377744
DLD	51645231
PCB 118	8487743
ppD	139145586
opT	124061997
ppT	159012529
PCB 180	12325377
MRX	12566941

Com estas áreas sendo a referência do máximo de extração dos analitos na amostra, realizou-se a extração, obtendo as recuperações abaixo (Tabela 15).

Tabela 15: Recuperação dos 14 organoclorados de interesse realizado sobre a técnica QuEChERS e injetado em GC-ECD.

	HCB	LIN	ALD	HPX	tCLD	cCLD	ppE	DLD	PCB118	ppD	opT	ppT	PCB180	MRX
(1)	83	79	82	81	80	83	93	72	87	83	92	91	86	89
(5)	90	82	89	83	84	88	97	71	93	84	96	94	94	94
(10C)	87	73	87	77	75	80	94	66	89	76	91	88	89	91
(4)	89	68	87	76	71	78	93	66	89	72	91	86	90	91
(7)	86	64	83	70	66	74	91	57	85	66	86	82	86	90
(8)	86	66	83	71	67	74	90	58	85	68	88	83	86	90
(2)	81	77	80	76	76	80	90	66	84	79	88	87	84	85
(6)	89	78	88	79	80	85	94	66	91	81	93	91	92	94
(9C)	92	74	91	79	76	82	94	67	90	76	91	88	91	94
(3)	91	70	90	78	72	79	94	66	88	72	90	86	89	91
(11C)	92	75	90	79	76	82	95	67	88	76	91	89	92	94

Com os resultados de recuperação obtidos com o planejamento experimental 2³ completo, tratou-se os dados para observação dos efeitos dos fatores, com a intenção de conhecer a melhor condição para o trabalho, e por conseguinte observar quais são os efeitos significativos para um nível de confiança de 95%. Segundo Neto, 2010 quando analisado cada efeito, este deve ser maior que o desvio de um efeito multiplicado pelo t de Student (com seus respectivos graus de liberdade e nível de confiança) para ser considerado diferente de zero e então significativo para o método, quando trabalhado com a tabela de probabilidade Z-score.

Figura 19: Exemplo de pontos significativos e insignificativos, trabalhando com uma distribuição normal com a tabela de probabilidade Z score para observação dos pontos a um nível de confiança de 95%.

4.1.1.1. Tratamento dos dados - MIREX (MRX)

Assim, foram tratados os dados para os compostos individualmente, para que seja possível observar o comportamento de cada um frente à extração, porém a decisão para o ponto ótimo para todos os analitos foi averiguada com mais cautela, por se tratar de um método multiresíduo.

Deve-se atentar também aos efeitos gerados para cada fator individualmente, assim como suas interações, e analisar a tendência de usar este fator em seu nível mais baixo (-1) ou em seu nível mais alto (+1). Os efeitos são interpretados em porcentagem já que foi feito a opção por trabalhar com porcentagem de recuperação, e sendo assim, o efeito significa o ganho ou a perda na recuperação. Desta forma segue o exemplo de um tratamento realizado na planilha Excel e comprovado pelo Software Statistica 7 para o composto Mirex.

Tabela 16: tabela dos fatores para o composto Mirex (MRX) em nível baixo (-1) e nível alto (+1) com suas respectivas recuperações para cada experimento realizado aleatoriamente, foi disposto os experimentos em ordem para melhor visualização dos dados.

Experimentos	Fatores			Recuperação (%)
	Fator 1 (NaCl)	Fator 2 (PSA)	Fator 3 (C18)	Mirex (MRX)
1	-1	-1	-1	89
2	1	-1	-1	85
3	-1	1	-1	91
4	1	1	-1	91
5	-1	-1	1	94
6	1	-1	1	94
7	-1	1	1	90
8	1	1	1	90

Assim, como procedimento para observação dos efeitos foi realizado a multiplicação dos níveis com suas respectivas porcentagens de recuperação, como segue na tabela a seguir.

Tabela 17: Cálculo dos efeitos de primeira (1,2 e 3), segunda (12,13 e 23) e terceira ordem (123).

Experimentos	Número de efeitos	1	2	3	4	5	6	7
	Interações	1	2	3	12	13	23	123
1	Níveis multiplicado pela recuperação	-89,20	-89,20	-89,20	89,20	89,20	89,20	-89,20
2		85,50	-85,50	-85,50	-85,50	-85,50	85,50	85,50
3		-91,49	91,49	-91,49	-91,49	91,49	-91,49	91,49
4		91,34	91,34	-91,34	91,34	-91,34	-91,34	-91,34
5		-94,41	-94,41	94,41	94,41	-94,41	-94,41	94,41
6		94,08	-94,08	94,08	-94,08	94,08	-94,08	-94,08
7		-89,51	89,51	89,51	-89,51	-89,51	89,51	-89,51
8		89,64	89,64	89,64	89,64	89,64	89,64	89,64
	Somatório	-4,06	-1,22	10,10	4,01	3,66	-17,48	-3,09
	Efeito	-1,02	-0,30	2,53	1,00	0,92	-4,37	-0,77

Com os efeitos obtidos, estes foram colocados em uma distribuição normal com os valores fornecidos pela tabela Z-score, assim obteve-se o seguinte gráfico.

Figura 20: Gráfico dos efeitos de um planejamento 2^3 para o analito Mirex realizado em análise multiresíduo plotado em tabela Z-Score.

Com este planejamento, foi evidenciado que o efeito com maior significância foi o proporcionado pela interação do fator 2 com o 3 (-4,37), ou seja, do PSA e o C18. Como o fator 1 (NaCl) e suas respectivas interações tiveram efeitos muito baixo (menor que 1%), este foi excluído do planejamento para esta resposta. Com esta exclusão, o planejamento que era um 2^3 , passou a ser um planejamento 2^2 , com uma replicata em cada experimento, sendo possível calcular o desvio de um fator e assim obter o valor de t crítico, que segundo a tabela t, para 4 graus de liberdade e nível de confiança de 95%, foi de 2,59, comprovando que todos valores de efeito acima deste valor crítico são realmente considerados significativos.

Deve-se observar que a interação dos fatores 2 e 3 (PSA e C18) foi negativo, ou seja, quando passamos do nível -1 para o +1 existe uma diminuição na porcentagem relativa de extração (perda de 4,37 na recuperação), sendo assim é importante utilizar os fatores 2 e 3 nas seguintes condições.

Tabela 18: Condições de trabalho para os fatores PSA e C18.

Fator	2 (PSA)	3 (C18)	Efeito
Multiplicação	-1	+1	Negativo
	+1	-1	Negativo

Observando as recuperações tem-se que a melhor condição é usar o fator 2 (PSA) no nível mais baixo e o fator 3 (C18) no nível mais alto para este analito organoclorado (Mirex), já que com o fator 3 no nível mais alto existe um ganho de 2,52%. Estes valores de efeitos foram reproduzidos no programa Software Statistica 7 confirmando assim os resultados.

Figura 21: Gráfico de Pareto mostrando os efeitos para cada fator e suas interações para o analito Mirex.

A Figura 22 demonstra graficamente o que já foi discutido anteriormente, é possível verificar que a diagonal principal é que tem os menores valores de recuperação (87,3 e 89,6%), a diagonal principal tem os valores da interação da variáveis 2 (PSA) e 3 (C18) que dão valores +1 e a diagonal secundária têm os maiores valores de recuperação (94,2 e 91,4%), sendo a maior recuperação de todos os pontos em que a variável 2 esta no nível inferior (-1) e a variável 3 esta no nível superior (+1).

Figura 22: Gráfico do quadrado dos fatores PSA e C18 para o Mirex, mostrando a melhor condição de trabalho para obter maior ganho de recuperação. Valores obtidos em duplicatas em um nível de confiança de 95%.

Desta forma foi realizado o planejamento e o estudo dos efeitos de todos os outros compostos (resposta) avaliando o comportamento de cada um frente à técnica aplicada. É importante ressaltar que o trabalho foi realizado em análise multiresíduo, e que as análises no Apêndice B são para os analitos individuais, com exceção do conjunto multiresíduo. Assim, são mostradas as figuras e tabelas para os outros compostos, com especial atenção para o composto que foi o limitante na extração, ou seja, o que esteve no limiar do que é exigido pela norma SANCO 12495 (70%), composto Dieldrin.

Tabela 19: Analitos e significância de seus efeitos para um nível de confiança de 95% em ordem decrescente em módulo (Gráficos e Figuras ver Apêndice B).

Analitos	Efeitos em ordem decrescente de significância	Efeito significativo para 95%
ALD	23 > 1 > 2 > 3 > 13 > 12 > 123	23
cCLD	2 > 23 > 1 > 12 > 13 > 123 > 3	2 e 23
DLD	2 > 3 > 23 > 12 > 1 > 13 > 123	2
HCB	23 > 2 > 3 > 1 > 13 > 123 > 12	23
HPX	2 > 23 > 1 > 3 > 12 > 13 > 123	2 e 23
LIN	2 > 23 > 12 > 1 > 3 > 123 > 13	2
opT	23 > 2 > 12 > 1 > 13 > 3 > 123	2 e 23
PCB 118	23 > 3 > 2 > 12 > 1 > 13 > 123	23
PCB 180	23 > 3 > 12 > 1 > 2 > 123 > 13	23
ppD	2 > 23 > 12 > 3 > 1 > 13 > 123	2
ppE	23 > 1 > 1 > 12 > 3 > 13 > 123	23
ppT	2 > 23 > 12 > 1 > 13 > 123 > 3	2
tCLD	2 > 23 > 1 > 12 > 13 > 3 > 123	2 e 23
Conjunto Multiresíduo	2 > 23 > 12 > 1 > 13 > 123 > 3	2 e 23

4.1.1.2. Fatores de influência no Conjunto Multiresíduo

Analizando o conjunto multiresíduo dos organoclorados na extração e buscando uma forma de analisar todos juntos e assim a contribuição de cada sal presente na extração, realizou-se uma média das recuperações de todos analitos para cada experimento realizado, e obteve-se os seus respectivos efeitos, que é compatível com alguns dos compostos individuais, e como foi mostrado anteriormente o analito limitante Dieldrin que esteve próximo do que é exigido pela SANCO 12495, teve comportamento ligeiramente diferente do conjunto, que teve como fator significativo o reagente PSA, mas que não pode-se considerar extremamente diferente, já que tivemos um grande efeito da interação 23 mesmo não sendo significativo para o nível de confiança trabalhado, assim pode-se seguir o que o conjunto multiresíduo mostra, dando relevância para os fatores 2 e 3. E como mostrado, o fator 1

NaCl, não se mostrou significativo em nenhum dos analitos, evidenciando que o efeito de Salting-Out não se mostrou relevante quando comparado com os efeitos dos outros sais PSA e C18.

Pode-se concluir que o planejamento foi bem executado e atendeu o que foi proposto pelo trabalho, que foi a obtenção de extração acima do que é exigido, assim sabe-se quais são os componentes principais, e a rota de otimização caso necessite melhorar o processo.

4.1.1.3. Função de Desejabilidade

Um grande problema visto para tomada de decisão em procedimentos que há várias respostas é a otimização simultânea das variáveis independentes. Como forma de garantir os resultados do conjunto multiresíduo, foi aplicada a função de Desejabilidade para obtenção das respostas através de um tratamento estatístico conforme proposto por Harrington, 1965.

Esta proposta foi desenvolvida para determinação de respostas de análise que contêm mais de uma variável resposta, neste caso 14 analitos organoclorados. O procedimento é semelhante com o desenvolvido para os analitos individuais, só que neste procedimento é encontrado um valor d_i (Desejabilidade) para cada recuperação, conforme proposto por Harrington. Padroniza-se todos os pontos entre 0 e 1, e assim obtêm-se uma média geométrica, que será a desejabilidade do procedimento, D (Desejabilidade combinada) como demonstrado na tabela 20. Segue as fórmulas de trabalho abaixo,

$$d_i = \begin{cases} 0 \\ 1 \end{cases} \left[\frac{\text{Recuperação} - \text{Menor Recuperação}}{\text{Maior Recuperação} - \text{Menor Recuperação}} \right]$$

$$D = (d_1 \cdot d_2 \cdot \dots \cdot d_k)^{1/k}$$

Onde k é o número de respostas para o experimento.

Equação 4: Fórmula para cálculo da desejabilidade.

Tabela 20: Desejabilidade (d_i) dos 14 organoclorados.

	dHCB	dLIN	dALD	dHPX	dtCLD	dcCLD	dppE	dDLDD	dPCB118	dppD	dopT	dppT	dPCB180	dMRX
(1)	0,19	0,83	0,19	0,85	0,78	0,64	0,44	1,00	0,34	0,94	0,60	0,75	0,21	0,45
(5)	0,82	1,00	0,82	1,00	1,00	1,00	1,00	0,93	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
(10C)	0,55	0,50	0,64	0,54	0,50	0,43	0,58	0,60	0,56	0,56	0,50	0,50	0,50	0,67
(4)	0,73	0,22	0,64	0,46	0,28	0,29	0,44	0,60	0,56	0,34	0,50	0,34	0,60	0,67
(7)	0,46	0,00	0,28	0,01	0,004	0,01	0,15	0,004	0,12	0,004	0,01	0,01	0,21	0,56
(8)	0,46	0,11	0,28	0,08	0,06	0,01	0,01	0,07	0,12	0,11	0,21	0,09	0,21	0,56
(2)	0,01	0,72	0,01	0,46	0,56	0,43	0,01	0,60	0,01	0,72	0,21	0,42	0,01	0,01
(6)	0,73	0,78	0,73	0,69	0,78	0,79	0,58	0,60	0,78	0,83	0,70	0,75	0,80	1,00
(9C)	1,00	0,56	1,00	0,69	0,56	0,57	0,58	0,67	0,67	0,56	0,50	0,50	0,70	1,00
(3)	0,91	0,34	0,91	0,62	0,34	0,36	0,58	0,60	0,45	0,34	0,41	0,34	0,50	0,67
(11C)	1,00	0,61	0,91	0,69	0,56	0,57	0,72	0,67	0,45	0,56	0,50	0,59	0,80	1,00

Como no planejamento anterior segue abaixo os níveis de trabalho com o fator resposta e com as desejabilidades combinadas para os analitos estudados (Tabela 21).

Tabela 21: Fatores em nível baixo (-1) e nível alto (1) com suas respectivas Desejabilidade para o experimento multiresíduo.

Experimentos	Fatores			Desejabilidade Combinada
	Fator 1 (NaCl)	Fator 2 (PSA)	Fator 3 (C18)	Multiresíduo
1	-1	-1	-1	0,51
2	1	-1	-1	0,97
3	-1	1	-1	0,45
4	1	1	-1	0,03
5	-1	-1	1	0,10
6	1	-1	1	0,09
7	-1	1	1	0,75
8	1	1	1	0,49

Assim, como procedimento para observação dos efeitos foi realizado a multiplicação dos níveis com suas respectivas Desejabilidades, como segue na Tabela 22.

Tabela 22: Efeitos de primeira (1,2 e 3), segunda (12,13 e 23) e terceira ordem (123).

Experimentos	Número de efeitos	1	2	3	4	5	6	7
	Interações	1	2	3	12	13	23	123
1	Níveis multiplicado pela Desejabilidade	-0,51	-0,51	-0,51	0,51	0,51	0,51	-0,51
2		-0,97	-0,97	0,97	0,97	-0,97	-0,97	0,97
3		0,45	0,45	-0,45	0,45	-0,45	-0,45	-0,45
4		-0,03	0,03	0,03	-0,03	-0,03	0,03	-0,03
5		0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
6		0,09	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09	0,09	0,09
7		0,75	-0,75	0,75	-0,75	0,75	-0,75	-0,75
8		-0,49	0,49	-0,49	-0,49	0,49	-0,49	0,49
	Somatório	-0,61	-1,24	0,30	0,67	0,32	-1,94	-0,08
	Efeito	-0,15	-0,31	0,08	0,17	0,08	-0,48	-0,02

Com os efeitos obtidos, estes foram colocados em uma distribuição normal com os valores fornecidos pela tabela Z score, assim obteve-se o seguinte gráfico.

Figura 23: Efeitos de um planejamento 2^3 para o Conjunto Multiresíduo realizado pela função de Desejabilidade plotado em tabela Z-Score.

Estes valores de efeitos foram reproduzidos no programa Software Statistica 7 para confirmação dos resultados.

Figura 24: Gráfico de Pareto mostrando os efeitos para cada fator e suas interações para o Conjunto Multirésíduo.

A Figura 25 demonstra graficamente o que já foi discutido anteriormente, é possível verificar que a diagonal principal é a que tem os menores valores de recuperação (0,267 e 0,038), a diagonal principal tem os valores da interação das variáveis 2 (PSA) e 3 (C18) que dão valores +1 e a diagonal secundária têm os maiores valores de recuperação (0,856 e 0,468), sendo a maior recuperação de todos os pontos em que a variável 2 esta no nível inferior (-1) e a variável 3 esta no nível superior (+1).

Figura 25: Gráfico do quadrado dos fatores PSA e C18 para o Conjunto Multirresíduo, mostrando a melhor condição de trabalho para obter maior ganho de recuperação. Valores obtidos em duplicatas em um nível de confiança de 95%.

Conclui-se que a melhor condição é coerente com o que foi observado com as médias das recuperações, assim a função de Desejabilidade é uma ferramenta útil para análise dos fatores do experimento multirresíduo. Desta maneira fica evidente que os fatores de maior influência são o PSA e o C18 na fase de Clean-up da técnica QuEChERS, que foi coerente com os analitos individuais. O fator NaCl, apesar de não significativo, é importante evidenciar os valores dos efeitos de suas interações que obteve uma certa influência, só que não significativas para o nível de confiança trabalhado, mas que somado mostrou ter relevância sobre o método. Em relação à otimização, os níveis de NaCl não se mostraram importante, logo seria bom fixá-lo no ponto mais baixo por economia de reagente. Já o PSA como mostrou o estudo, é melhor utilizá-lo no nível mais baixo e o C18 no nível mais alto, lembrando que o efeito do C18 na maioria das análises se mostrou relativamente baixo quando não significativo, mostrando que uma otimização pode ser válido neste fator para melhorar a recuperação do método.

4.1.2. Validação do Método

4.1.2.1. Seletividade

A primeira etapa realizada para validação foi à avaliação da seletividade do método. Este teste foi realizado analisando 10 diferentes amostras brancas de pescado verificando se existiam interferentes nos tempos de retenção dos analitos de interesse. As amostras foram obtidas pelas unidades COI e CTEC do Lanagro/SP, conforme destacado pela Tabela 23. Após analisar as 10 amostras, não foram evidenciados interferentes nos tempos de retenção dos analitos de trabalho, conforme destacado no cromatograma representativo (Figura 26) de uma das amostras analisadas.

Tabela 23: Amostras de pescado para teste de seletividade.

Amostra	Fornecedor	Características
1	Unidade COI	Peixe Tambaqui – Lagoa Teresopolis
2		Peixe Tilápia (oreochromis sp)
3		Peixe Tambacu (inteiro sem vísceras e sem cabeça)
4		Peixe Tilápia (oreochromis niloticus)
5		Peixe pintado da Amazônia (pseudo latystoma ssp. X Leiarius marmoratus)
6	Unidade CTEC	Truta 01
7		Truta 02
8		Truta 03
9		Sardinha 01
10		Sardinha 02

A Figura 26 mostra a análise das 10 amostras dos fornecedores, mostrando que estas não contêm nenhum interferente representativo que possa ser qualificado como resultado positivo, mascarando assim a análise dos analitos estudados. Desta forma as amostras são consideradas limpas para o processo e o método trabalhado seletivo.

Figura 26: Cromatograma representativo das 10 amostras de pescado.

A figura 27 mostra a sobreposição de uma amostra branca com uma amostra fortificada em 1 LMR evidenciando que não existem interferentes representativos nos tempos de retenção dos analitos de trabalho.

Figura 27: Sobreposição de amostra branca com amostra fortificada em 1 LMR: Linha amarela representa a matriz e a linha azul representa os analitos de trabalho.

A Seletividade do método utilizado evidencia que a matriz nas condições de trabalhos são apropriadas para que não haja má interpretação dos dados obtidos.

4.1.2.2. Linearidade

Para a análise da linearidade foi aplicado o coeficiente de determinação como especificado pela DOC-CGCRE-008, análise dos resíduos conforme requisitado pela SANCO 12495:2011 e a incerteza como requisito da ISO/IEC 17025 e o guia EURACHEM/CITAC, além do desenvolvimento de rotina para analisar se a curva linear é o mais apropriado para o método, como será destacado em 4.1.4. “Desenvolvimento de modelo para avaliação da curva de calibração”. As concentrações de trabalho para HCB, ALD, MRX foram de 50, 80, 100, 150 e 200 ug/Kg, para o LIN foram 500, 800, 1000, 1500 e 2000 ug/Kg, para o HPX, tCLD, cCLD, DLD 150, 240, 300, 450 e 600 ug/Kg, para o ppE, ppD, opT, ppT 625, 1000, 1250, 1875 e 2500 ug/Kg, para o PCB 118, PCB 180 28,5, 45,6, 57,0, 85,5 e 114 ug/Kg. Como se trata de uma análise multiresíduo, foram estabelecidas várias faixas de trabalho para

a curva devido ao LMR de cada analito. Os gráficos dos resíduos estão representados no Apêndice C.

Tabela 24: Resultados para Curva analítica utilizando métodos dos mínimos quadrados ordinários.

Analito	Faixa de trabalho (ug/Kg)	Equação da curva	R ²	Resíduos	Incerteza ¹ (%)
HCB	50 – 200	$y = 3,34.10^{+5} + 4,91.10^{+6}$	0,99	SANCO/12495 < 20%. O maior valor encontrado foi 19,08% do composto HCB	± 7,00
ALD	50 – 200	$y = 3,28.10^{+5} - 4,65.10^{+5}$	0,99		± 4,60
MRX	50 – 200	$y = 2,67.10^{+5} - 2,68.10^{+6}$	0,99		± 3,40
LIN	500 – 2000	$y = 5,30.10^{+4} + 9,22.10^{+7}$	0,98		± 9,84
HPX	150 – 600	$y = 1,55.10^{+5} + 3,56.10^{+7}$	0,98		± 9,33
tCLD	150 – 600	$y = 1,76.10^{+5} + 3,48.10^{+7}$	0,98		± 8,33
cCLD	150 – 600	$y = 1,77.10^{+5} + 3,22.10^{+7}$	0,98		± 8,80
DLD	150 – 600	$y = 1,66.10^{+5} + 2,23.10^{+7}$	0,98		± 8,60
ppE	625 – 2500	$y = 5,50.10^{+4} + 1,17.10^{+8}$	0,98		± 9,42
ppD	625 – 2500	$y = 6,64.10^{+4} + 1,09.10^{+8}$	0,98		± 9,29
opT	625 – 2500	$y = 6,17.10^{+4} + 8,90.10^{+7}$	0,98		± 8,85
ppT	625 – 2500	$y = 8,15.10^{+4} + 1,11.10^{+8}$	0,98		± 8,67
PCB 118	28,5 – 114	$y = 3,29.10^{+5} - 3,29.10^{+6}$	0,99		± 6,67
PCB180	28,5 – 114	$y = 5,02.10^{+5} - 4,38.10^{+6}$	0,99		± 3,51

¹ A incerteza foi calculado com o menor ponto da curva, que, segundo a teoria de Horwitz, contem o maior desvio.

Com estes dados, pode-se observar que todos os parâmetros foram cumpridos com o que é exigido pelas normas de trabalho, ou seja, todos os coeficientes de determinação foram maiores que 0,98 e os resíduos não excederam os 20%, assim como exige a SANCO 12495:2011. O cálculo da incerteza não teve valor acima de 9,84% para todos os analitos de trabalho, mostrando uma incerteza aceitável para as curvas analíticas. Considerando que a amostra trata-se de um alimento e que os limites máximos de resíduos estão em concentrações baixas de toxicidade, este valor de incerteza é aceitável, considerando que o guia SANCO permite a incerteza expandida dentro da faixa de 50%, sendo assim, os valores são aceitáveis para se chegar ao resultado pretendido.

4.1.2.3. Recuperação/ Exatidão

Após o planejamento experimental, foi selecionada a melhor condição e foram realizadas extrações em 3 dias diferentes para se obter a recuperação média do método QuEChERS. Este foi desenvolvido, sendo apresentado um cromatograma representativo na Figura 28, que evidencia a separação dos analitos de trabalho e seus respectivos tempos de retenção. A Tabela 25 mostra as recuperações em dias diferentes, sendo que no segundo dia foi realizado triplicata da recuperação para observar quanto da repetibilidade dos dados.

Tabela 25: Recuperações do dia 1, 2 (triplicata) e 3.

Analitos	Rec. Dia 1 (%)	Rec. Dia 2 (%)			Rec. dia 3 (%)
		Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	
HCB	83	112	101	107	112
LIN	79	88	84	86	94
ALD	82	109	101	107	116
HPX	81	91	87	90	100
tCLD	80	94	91	94	104
cCLD	83	97	93	96	106
ppE	93	102	101	102	109
DLD	72	74	71	74	92
PCB 118	87	100	99	99	113
ppD	83	90	88	89	98
opT	92	99	98	99	106
ppT	91	96	93	95	105
PCB 180	86	98	97	99	113
MRX	89	100	97	102	117

A exatidão expressa à concordância entre o valor real e o valor determinado pela metodologia. Para validação da metodologia foi fortificado uma amostra conhecida e livre de interferentes.

Figura 28: Cromatograma da melhor condição do planejamento experimental.

Com esta melhor condição foi analisada a recuperação/exatidão de cada analito de trabalho, obtendo assim resultados dentro do exigido pela norma (70 a 120%), o que mostra que a metodologia é apta a ser utilizada para o trabalho proposto, como mostrado na Tabela 26.

Tabela 26: Recuperação média (com 5 replicatas) e desvio padrão dos analitos estudados:

Analito	Recuperação (%)	Desvio Padrão (%)
HCB	103	12,00
LIN	86	5,33
ALD	103	12,80
HPX	90	6,86
tCLD	93	8,60
cCLD	95	8,25
ppE	101	5,53
DLD	77	8,85
PCB 118	100	9,29
ppD	90	5,55
opT	99	4,87
ppT	96	5,28
PCB 180	99	9,54
MRX	101	10,18

Pode se evidenciar que todos os analitos apresentaram resultados dentro do exigido, ou seja, entre 70 e 120%.

4.1.2.4. Precisão (Reprodutibilidade Intralaboratorial)

A precisão foi realizada com 5 replicatas em 3 dias diferentes, obtendo assim valores satisfatório para o que é exigido pela SANCO 12495:2011. A Tabela 27 mostra que os analitos contêm um CV (Coeficiente de variação) aceitável e que os analitos com características semelhantes possuem coeficientes de variação próximos, por exemplo, os PCBs contêm CV próximos assim como os DDT e seus derivados.

Tabela 27: Valores do Coeficiente de Variação (CV) para análise da precisão do método QuEChERS.

Analito	Precisão – CV(%) ¹	Requisito SANCO 12495:2011
HCB	11,65	< 20%
LIN	6,19	
ALD	12,43	
HPX	7,65	
tCLD	9,29	
cCLD	8,69	
ppE	5,46	
DLD	11,54	
PCB 118	9,33	
ppD	6,19	
opT	4,93	
ppT	5,51	
PCB 180	9,68	
MRX	10,08	

¹ Os experimentos foram conduzidos em três diferentes dias, permitindo avaliar a precisão em termos de reprodutibilidade intralaboratorial através do CV(%).

4.1.3. Cálculo da incerteza

Para análise do cálculo da incerteza, deve ser realizado uma estimativa razoável, e o analista deve estabelecer quais são os parâmetros que mais interferem no processo. Segundo estudos, é sabido que a linearidade tem grande influência na incerteza final dos métodos de extração, sendo assim um parâmetro a ser considerado, assim como a recuperação e a precisão, com menor impacto no resultado final, mas com influência significativa. O processo de análise da incerteza utilizado neste trabalho é denominado método Validation based. Segue abaixo as fórmulas de trabalho para cada parâmetro analisado.

A Linearidade foi calculada no menor ponto da curva, pois se sabe que há o maior desvio embutido, segundo a teoria do trompette de Horwitz.

$$Incerteza = \frac{S}{B_1} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_0 - \bar{C})^2}{S_{xx}}}$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [A_j - (B_0 + B_1 \cdot c_j)]^2}{n - 2}}$$

Onde,

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^n (c_j - \bar{c})^2$$

Onde, B_1 é a inclinação da curva, S é o desvio padrão, p é o número de medidas para determinar C_0 , n é o número de medidas para a calibração, C_0 é a concentração determinada, $\bar{C}$ é o valor médio dos diferentes padrões de calibração e C_j são as concentrações do iésimo padrão de calibração. A_j é o jésima medida dos padrões de calibração e B_0 é o intercepto.

Equação 5: Fórmula para cálculo da incerteza da curva analítica.

A Recuperação foi calculada na concentração de 1 LMR para todos analitos de trabalho, assim como para a precisão, sendo utilizado um valor de n igual 5, ou seja, 5 análises para obter-se a recuperação e precisão média,

$$S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Equação 6: Fórmula para cálculo da incerteza da recuperação.

A precisão foi calculada utilizando o desvio padrão das 5 análises, a sua incerteza é exatamente o desvio padrão obtido,

$$Incerteza = S$$

Equação 7: Fórmula para cálculo da incerteza da precisão.

Com estes parâmetros principais, que contêm maior influência na incerteza final da metodologia, calcula-se a incerteza combinada e a incerteza expandida.

Incerteza combinada

$$u_c(y(p, q, \dots)) = \sqrt{u(p)^2 + u(q)^2 + \dots}$$

Onde $u(p)^2$, $u(q)^2$ são as incertezas dos parâmetros da validação.

Equação 8: Fórmula para cálculo da incerteza combinada.

Incerteza expandida

$$u_{\text{Expandido}} = K \cdot u_{\text{combinada}}$$

Onde K igual a 2.

Equação 9: Fórmula para cálculo da incerteza expandida.

É importante ressaltar que os procedimentos de cálculo de incerteza adotados foram trabalhados segundo o guia EURACHEM/CITAC (EURACHEM, 2000) e os seus dados estão expostos na Tabela 28.

Tabela 28: Incerteza padrão combinada e expandida para o método QuEChERS:

Analito	Fonte da incerteza	Valor (x) (ug/Kg)	Incerteza a padrão u(x)	Incerteza padrão (%)	Incerteza padrão relativa u(x)/x	Quadrado da Incerteza padrão relativa (u(x)/x) ²	Incerteza combinada ¹	Incerteza combinada (%)	Incerteza Expandida (%) (K=2)
HCB	Curva analítica	50	3,50	7,00	0,0700	0,0049	± 14,89	± 14,89	± 29,79
	Recuperação	100	5,36	5,36	0,0536	0,0029			
	Precisão		12,00	12,00	0,1200	0,0144			
LIN (Lindane)	Curva analítica	500	49,20	9,84	0,0984	0,0097	± 98,66	± 9,86	± 19,73
	Recuperação	1000	2,38	0,24	0,0024	0,0000058			
	precisão		5,33	0,53	0,0053	0,000028			
ALD (Aldrin)	Curva analítica	50	2,30	4,60	0,0460	0,0021	± 14,75	± 14,75	± 29,51
	Recuperação	100	5,72	5,72	0,0572	0,0033			
	precisão		12,80	12,80	0,1280	0,01638			
HPX Heptachlor Epoxide)	Curva analítica	150	14,00	9,33	0,0933	0,0087	± 28,83	± 9,61	± 19,22
	Recuperação	300	3,07	1,02	0,0102	0,0000104			
	precisão		6,86	2,29	0,0229	0,000524			
tCLD (trans- Chlordane)	Curva analítica	150	12,50	8,33	0,0833	0,0069	± 26,64	± 8,88	± 17,76
	Recuperação	300	3,85	1,28	0,0128	0,000164			
	precisão		8,60	2,87	0,0287	0,000824			

cCLD (cis-Chlordane)	Curva analítica	150	13,20	8,80	0,0880	0,0077	± 27,83	± 9,28	± 18,55
	Recuperação	300	3,69	1,23	0,0123	0,000151			
	precisão		8,25	2,75	0,0275	0,000756			
ppE (ppDDE)	Curva analítica	625	58,90	9,42	0,0942	0,0089	± 118,08	± 9,44	± 18,89
	Recuperação	1250	2,47	0,20	0,0020	0,0000040			
	precisão		5,53	0,44	0,0044	0,0000194			
DLD (Dieldrin)	Curva analítica	150	12,90	8,60	0,0860	0,0074	± 27,28	± 9,09	± 18,19
	Recuperação	300	3,96	1,32	0,0013	0,00000169			
	precisão		8,85	2,95	0,0295	0,00087			
PCB 118	Curva analítica	28,5	1,90	6,67	0,0667	0,0044	± 10,85	± 19,05	± 38,10
	Recuperação	57	4,16	7,29	0,0729	0,005314			
	precisão		9,29	16,29	0,1630	0,02657			
ppD (ppDDD)	Curva analítica	625	58,1	9,29	0,0929	0,0086	± 116,08	± 9,29	± 18,57
	Recuperação	1250	2,48	0,20	0,0020	0,0000040			
	precisão		5,55	0,44	0,0044	0,0000194			
opT (opDDT)	Curva analítica	625	55,30	8,85	0,0885	0,0078	± 110,52	± 8,84	± 17,68
	Recuperação	1250	2,18	0,17	0,0017	0,00000289			
	precisão		4,87	0,39	0,0039	0,000015			
ppT (ppDDT)	Curva analítica	625	54,20	8,67	0,0867	0,0075	± 108,41	± 8,67	± 17,34
	Recuperação	1250	2,36	0,19	0,0019	0,00000361			

	precisão		5,28	0,42	0,0042	0,0000176			
PCB 180	Curva analítica	28,50	1,00	3,51	0,0351	0,0012	± 10,64	± 18,66	± 37,33
	Recuperação	57	4,27	7,49	0,0749	0,005610			
	precisão		9,54	16,74	0,1674	0,02802			
MRX	Curva analítica	50	1,70	3,40	0,0340	0,0012	± 13,45	± 13,45	± 26,90
	Recuperação	100	4,55	4,55	0,0455	0,002070			
	precisão		12,18	12,18	0,1218	0,01483			

¹ multiplica-se a o valor encontrado da incerteza combinada pela concentração de trabalho, neste caso o LMR para cada analito.

Com a utilização das ferramentas da qualidade, como o planejamento experimental, pode-se observar que foram obtidos resultados na validação condizentes com a proposta do trabalho, sendo assim, de extrema importância a utilização de tais ferramentas para que haja a melhor resposta. O planejamento experimental, por ser uma ferramenta que guia para a melhor forma de trabalho, proporcionou um direcionamento correto, minimizando retrabalho e consequentemente tempo, atingindo assim resultados em conformidade com o guia de validação adotado. Como exemplo, resíduos abaixo dos 20% para a curva analítica, com o maior valor encontrado de 19,08% para o HCB. Recuperações na faixa de 70 a 120% como requerido pela norma trabalhada, se atentando para as recuperações do Dieldrin (DLD) que ficou próximo do valor mínimo estabelecido. Curvas analíticas com coeficientes de determinação acima do 0,98, demonstrando boa correlação entre os dados e incerteza dentro do que foi pretendido, com incertezas inferiores a 10% para todos os analitos.

Desta forma é evidente que a utilização de tais ferramentas acrescentam valor e confiabilidade nos dados obtidos, garantindo qualidade do método devido a aplicação de procedimentos dentro de normas e guias já bem conhecidos e difundidos na área da qualidade.

4.1.4. Desenvolvimento de modelo para avaliação da curva de calibração

Atualmente para a avaliação de uma curva analítica é sugerido por vários guias, alguns parâmetros a serem analisados, como por exemplo, a DOC-CGCRE-008 que sugere análise do coeficiente de determinação, a SANCO 12495:2011 que evidencia a análise dos resíduos e como o guia EURACHEM que insere o cálculo de incerteza. Estes parâmetros não são todos utilizados em rotinas, e alguns parâmetros como a coeficiente de determinação não é considerado um parâmetro adequado para avaliação de uma curva de calibração (BRUGGEMANA, QUAPP e WENRICH, 2006; VAN LOCO et al., 2002). Sendo assim, é de extrema importância uma investigação para observar se a curva de calibração realmente é adequada aos dados obtidos.

Com isso sugere-se um fluxograma como rotina de trabalho, evidenciando que uma análise profunda dependendo do tipo de análise é necessária para assegurar os resultados obtidos, assim propõe-se a utilização da incerteza como parâmetro primordial na análise de uma curva analítica em rotina, além dos parâmetros já bem difundidos, como coeficiente de determinação e resíduos. É importante ressaltar que a incerteza não é parâmetro para dizer se uma curva analítica é aceitável ou não, mas sim evidenciar o quanto adequado esta curva é para o trabalho utilizado. Foram utilizados também testes para análise de aptidão para a curva linear como teste de outlier, homoscedasticidade e modelo, que é base para sustentação de uma curva linear adequada. Assim o fluxograma da Figura 29 foi desenvolvido e aplicado ao trabalho.

O uso da incerteza proverá um embasamento a mais para justificar um bom uso da curva analítica, ela não mostra se a curva é linear ou não, mas evidencia o quanto apto o modelo é para ser utilizado na representação dos dados de trabalho. Desta forma a incerteza é uma ferramenta a mais de análise, como justificativa de adequação ao uso pretendido, sabendo ainda que esta é exigência da qualidade, acrescentando assim maior confiabilidade no resultado apresentado.

Figura 29: Proposta de fluxograma para análise da linearidade da curva.

O item 1 do fluxograma orienta o analista na definição da quantidade de pontos a serem trabalhados, replicatas e a metodologia. Em seguida no item 2 plota-se a curva analítica com o objetivo de obter os seus respectivos dados, como intercepto b e sua inclinação a .

$$y = ax + b$$

Onde, a é a inclinação da curva analítica e b é o intercepto.

Equação 10: Fórmula para equação da curva linear.

Após este passo, no item 3 deve-se definir qual norma, guia ou documento orientativo será utilizado, como os citados na Tabela 3, ou outro que seja mais adequado ao método. Muitos deles utilizam como critério de avaliação o coeficiente de determinação (Equação 11), os resíduos (Equação 12) e como alternativa proposta pelo trabalho o uso do cálculo da incerteza (Equação 5), sendo de responsabilidade do analista, definir qual critério é o mais adequado. A incerteza de um resultado é um parâmetro que descreve o intervalo no qual o valor da quantidade que esta sendo medido é esperado se encontrar, levando em conta todas as fontes de desvios (MILLER e MILLER, 2005).

$$r^2 = \left(\frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sqrt{\left[\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[\sum_i (y_i - \bar{y})^2 \right]}} \right)^2$$

Onde x_i é a concentração trabalhada, $\bar{x}$ é a média das concentrações, y_i é o sinal analítico e $\bar{y}$ é a média dos sinais analíticos.

Equação 11: Fórmula para cálculo do coeficiente de determinação.

$$\text{resíduo (\%)} = [(y_i - \hat{y}) / y_i] \times 100$$

Onde $\hat{y}$ é o valor de sinal predito pela curva analítica.

Equação 12: Fórmula para cálculo dos resíduos da curva analítica.

Após definido qual parâmetro deve ser avaliado, sugere-se confrontar este parâmetro com as normas escolhidas, por exemplo, ao se trabalhar com o coeficiente de determinação,

muitos guias adotam como critério valores acima de 0,98. O uso dos resíduos também é muito utilizado, e representado na forma de porcentagem.

Utilizando a incerteza como critério, destaca-se que esta deve ser calculada por um analista competente. O conceito de incerteza já tem uma profunda influência em muitos aspectos da química analítica, seja ele prático ou teórico. Atualmente encontra-se difundido em diferentes temas: validação, amostragem, apresentação de resultados, limites de especificações, e muitos outros conceitos e atividades rotineiras em laboratórios (JIMÈNEZ-CHACÓN e ALVAREZ-PRIETO, 2009). Após avaliar um ou todos os parâmetros (coeficiente de determinação, resíduos e incerteza) deve ser verificado se estes são adequados ao critério de aceitação ou exigências do cliente.

Caso não atenda algum dos critérios, deve-se inicialmente avaliar a presença de valor discrepante que interfira na análise de alguns dos parâmetros citados anteriormente, podendo assim aplicar aos pontos um teste de outlier, como o teste de Grubbs.

$$G = \left| \frac{\text{Valor Suspeito} - \bar{y}}{S} \right|$$

Onde S é o desvio padrão.

Equação 13: Fórmula para cálculo de outlier – Teste de Grubbs.

Se o valor $G > G_{\text{tabelado}}$, considera-se um outlier. Conforme o item 4, deve se estudar a possibilidade de descarte do dado considerado outlier. Caso não seja possível, deve-se refazer o ensaio e retornar ao item 1 do fluxograma, caso seja possível, retornar ao item 2.

Se não houver nenhum ponto discrepante, sugere-se outro teste para verificar a variância dos resíduos em torno da curva, como sugerido no item 6. Desta forma, um teste de homoscedasticidade é aplicado para observar se os resíduos se comportam com distribuição constante (DOQ-CGCRE-008, 2010).

$$C = \frac{S_{\max}^2}{\sum_{i=1}^N S_i^2}$$

Onde $i = 1$ a N , e é o número de concentrações padrões de calibração, $S_{\max}$ é o maior desvio.

Equação 14: Fórmula para cálculo da homoscedasticidade – Teste de Cochran.

Se $C \leq C_{\text{tabelado}}$ então não há diferença significativa entre as variâncias das respostas no intervalo de concentração do analito estudado e este é considerado homoscedástico. Caso estas não sejam constante sugere-se aplicar o método dos mínimos quadrados ponderados ou diminuir a faixa de trabalho e retornar ao ponto 2 do fluxograma 1. Caso seja constante e ainda os critérios para os parâmetros não tenham sido atendidos, orienta-se mudar o método de ensaio.

Após esta etapa, uma análise para verificar se o modelo linear é adequado aos dados deve ser inserido no procedimento como descrito no item 7, como o teste da falta de ajuste (BRUGGEMANA, QUAPP e WENRICH, 2006).

$$\sigma_{\text{Erro}}^2 = \frac{SQ_{\text{Erro}}}{(IJ - I)} = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{(IJ - I)}$$

$$\sigma_{\text{fda}}^2 = \frac{SQ_{\text{fda}}}{(I - 2)} = \frac{\sum_{i=1}^I (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2}{(I - 2)}$$

$$\sigma_{\text{residuo}}^2 = \frac{SQ_{\text{residuo}}}{(IJ - 2)} = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (y_{ij} - \hat{y}_i)^2}{(IJ - 2)}$$

$$F_{(I-2)/(IJ-I)} = \frac{\sigma_{\text{fda}}^2}{\sigma_{\text{Erro}}^2}$$

Sabendo que SQ é a soma dos quadrados, e fda é a falta de ajuste dos pontos e sinal Prev._i é o sinal previsto na reta no iésimo ponto. Quando $F_{\text{tab}} > F_{(I-2)/(IJ-I)}$ o modelo tem característica de linearidade, caso contrário outro modelo deve ser proposto. $i=1...I$, e $j=1...J$

Equação 15: Fórmula para cálculo a adequação do modelo linear – Teste da falta de ajuste.

4.1.4.1. Aplicação da metodologia proposta

Após a análise dos parâmetros é indicado observar se a curva realmente é adequada aos dados, alguns testes são indicados para esta análise, como teste de outlier, dependência, adequação ao modelo, tendência etc. No trabalho presente, foi julgado importante para análise de curva linear os testes de outlier, homoscedasticidade e modelo (Tabela 29).

Foi realizado o teste de Grubbs para observar evidência de outlier nos dados obtidos. Segundo o teste de Grubbs é calculado o valor G e se este valor for maior que o valor G tabelado este é considerado Outlier. Considerando uma amostra de 5 replicatas para cada ponto e utilizando um nível de confiança de 95% temos que o G crítico tabelado é de 1,715. Foi observado que grande parte dos valores obtidos estão abaixo deste valor crítico, com exceção do ppD e ppE que indicaram pontos com $G = 1,72$. Considerando que o valor discrepante está no limite crítico de trabalho exigido, julgou-se não necessário a sua retirada já que este ponto não interferiu na curva de forma significativa, sendo assim pertinente a utilização dos dados.

Para análise da Homoscedasticidade dos dados foi aplicado o teste de Cochran para evidenciar se a distribuição dos resíduos é constante em torno da curva traçada. Para isto, o teste foi aplicado e o valor encontrado foi comparado com o C crítico tabelado para amostra de tamanho 5 e nível de confiança de 95%. O valor tabelado foi de 0,506 e todos os valores para os analitos de trabalho foram abaixo deste valor, evidenciando homoscedasticidade dos dados, caso estes valores fossem acima, o analista deveria diminuir a faixa de trabalho ou aplicar o método dos mínimos quadrados ponderado para adequar os dados a curva.

Para análise de modelo, foi utilizado o teste da falta de ajuste. É sabido que há vários outros testes, como o teste de Mandel, por exemplo, mas julgou-se o teste utilizado mais simples e adequado ao método utilizado. Desta forma foram calculadas as somas quadradas residuais, dos erros e da falta de ajuste e foi encontrada a razão F como demonstrado na fórmula de falta de ajuste. O F tabelado para um nível de confiança 95% é de 3,098, o valor de Fisher para os analitos trabalhados são todos acima deste valor, com exceção do composto Mirex que obteve valor abaixo do F crítico, sendo assim, o modelo linear não é o mais adequado aos dados, ou seja, outro modelo deve ser proposto para os analitos de trabalho, como por exemplo, a função quadrática.

Tabela 29: Avaliação das curvas analíticas lineares do método QuEChERS.

Analito	Equação Linear	R²	Resíduo	Incerteza¹	Outlier² (Grubbs)	Variância³ (Cochran)	Variância⁴ (Levene)	Modelo⁵ (Mandel)	Modelo⁶ (Teste da Falta de Ajuste)
HCB	$y=334331x + 5E+06$	0,99	< 19,08%	± 7,00%	G < 1,60 (Não)	C = 0,06 (Homoscedástico)	P-valor = 0,68 L = 0,59 (Homoscedástico)	F = 1,102 (Adequado)	F = 14,83 (outro modelo deve ser proposto)
LIN	$y=53042x + 9E+07$	0,98	< 7,53%	± 9,84%	G < 1,53 (Não)	C = 0,14 (Homoscedástico)	P-valor = 0,30 L = 1,31 (Heteroscedástico)	F = 9,573 (Adequado)	F = 29,32 (outro modelo deve ser proposto)
ALD	$y=327525x + 464596$	0,99	< 15,56%	± 4,60%	G < 1,49 (Não)	C = 0,06 (Homoscedástico)	P-valor = 0,55 L = 0,79 (Heteroscedástico)	F = 1,314 (Adequado)	F = 14,09 (outro modelo deve ser proposto)
HPX	$y=155267x + 4E+07$	0,98	< 12,58%	± 9,33%	G < 1,36 (Não)	C = 0,13 (Homoscedástico)	P-valor = 0,65 L = 0,63 Homoscedástico	F = -0,31 (Adequado)	F = 98,80 (outro modelo deve ser proposto)
tCLD	$y=175697 + 3E+07$	0,98	< 12,60%	± 8,33%	G < 1,67 (Não)	C = 0,15 (Homoscedástico)	P-valor = 0,62 L = 0,68 (Heteroscedástico)	F = -0,82 (Adequado)	F = 115,99 (outro modelo deve ser

									proposto)
cCLD	$y=177076x + 3E+07$	0,98	< 12,95%	$\pm 8,80\%$	$G < 1,65$ (Não)	$C = 0,08$ (Homoscedástico)	P-valor = 0,59 L = 0,71 (Heteroscedástico)	F = 2,79 (Adequado)	F = 37,98 (outro modelo deve ser proposto)
ppE	$y=54988x + 1E+08$	0,98	< 7,49%	$\pm 9,42\%$	$G = 1,72$ (existe outlier)	$C = 0,27$ (Homoscedástico)	P-valor = 0,76 L = 0,47 (homoscedástico)	F = 8,71 (Adequado)	F = 389,06 (outro modelo deve ser proposto)
DLD	$y=165950x + 2E+07$	0,98	< 14,97%	$\pm 8,60\%$	$G < 1,66$ (Não)	$C = 0,08$ (Homoscedástico)	P-valor = 0,78 L = 0,44 (Homoscedástico)	F = 21,42 (Modelo quadrático deve ser proposto)	F = 56,34 (outro modelo deve ser proposto)
PCB 118	$y=329103x - 3E+06$	0,99	< 11,01%	$\pm 6,67\%$	$G < 1,53$ (Não)	$C = 0,03$ (Homoscedástico)	P-valor = 0,13 L = 1,98 (Heteroscedástico)	F = 10,97 (Adequado)	F = 16,55 (outro modelo deve ser proposto)
ppD	$y=66394x + 1E+08$	0,98	< 8,25%	$\pm 9,29\%$	$G = 1,72$ (existe outlier)	$C = 0,21$ (Homoscedástico)	P-valor = 0,92 L = 0,22 (Homoscedástico)	F = 1,32 (Adequado)	F = 97,07 (outro modelo deve ser proposto)
ppT	$y=81524x +$	0,98	< 9,06%	$\pm 8,67\%$	$G < 1,69$	$C = 0,22$	P-valor = 0,95	F = 10,73	F = 93,42

	1E+08				(Não)	(Homoscedástico)	L = 0,18 (Homoscedástico)	(Adequado)	(outro modelo deve ser proposto)
opT	$y=61726x + 9E+07$	0,98	< 8,86%	$\pm 8,85\%$	G < 1,70 (Não)	C = 0,17 (Homoscedástico)	P-valor = 0,97 L = 0,13 (Homoscedástico)	F = 14,15 (Adequado)	F = 36,19 (outro modelo deve ser proposto)
PCB 180	$y=502140x - 4E+06$	0,99	< 10,58%	$\pm 3,51\%$	G < 1,69 (Não)	C = 0,04 (Homoscedástico)	P-valor = 0,49 L = 0,90 (Heteroscedástico)	F = 3,95 (Adequado)	F = 4,03 (outro modelo deve ser proposto)
MRX	$y=267472x - 2E+06$	0,99	< 6,60%	$\pm 3,40\%$	G < 1,68 (Não)	C = 0,03 (Homoscedástico)	P-valor = 0,56 L = 0,76 (Heteroscedástico)	F = -1,29 (Adequado)	F = 1,05 (Adequado)

¹ A incerteza dos analitos foram calculado sobre o menor ponto da curva analítica.

² G tabelado para amostra de tamanho 5 e nível de confiança de 95% é igual a 1,715.

³ C tabelado para amostra de tamanho 5 e nível de confiança de 95% é igual a 0,506.

⁴ Quando o P-valor do teste é maior que o valor critico de Levene (L) para o nível de significância escolhido, não deve-se rejeitar a hipótese nula de igualdade das variâncias.

⁵ F tabelado para amostra de tamanho 5, graus de liberdade 1 e 2 e nível de confiança de 95% é igual a 18,513.

⁶ F tabelado para amostra de tamanho 5, graus de liberdade 3 e 20 e nível de confiança de 95% é igual a 3,098.

Com esta análise de curva pode-se observar os pontos e modelos que devem ser melhorados e consequentemente os caminhos mais coerentes para se ter uma boa análise da curva analítica. Foi traçado uma curva linear como pretendido pelo fluxograma de trabalho e, por conseguinte, a análise de resíduos, coeficiente de determinação e incerteza da curva. Os resíduos estiveram todos dentro do que é exigido pelo guia de trabalho, a SANCO 12495:2011, os coeficientes de determinação estiveram todos acima de 0,98, mostrando boa correlação entre os

dados, a incerteza da curva esta dentro do pretendido, não influenciando a incerteza expandida acima do que é exigido, sendo assim satisfatória para o método. Na aplicação dos testes para analisar se os dados estão de acordo com o modelo utilizado, trabalhou-se com o teste de outlier (teste de Grubbs) em que foi evidenciado outlier em dois compostos (ppD e ppE) que tiveram um ponto das replicatas fora da estatística trabalhada. No entanto, considerando que o valor discrepante esta no limite critico de trabalho exigido, julgou-se não necessário a sua retirada já que este ponto não interferiu na curva de forma significativa.

Para o teste de variância, foi utilizado o teste proposto pelo trabalho (teste de Cochran) e um teste para comparação, também muito utilizado na literatura (teste de Levene), observando algumas disparidades entre os resultados. Com o teste de Cochran observa-se que todos os dados são considerados homoscedásticos, ou seja, as variâncias são similares e constantes, já com o teste de Levene, observa-se que alguns dados foram caracterizados como heteroscedásticos (LIN, ALD, cCLD, tCLD, PCB 118, PCB 180 e MRX). Com isso o analista deve analisar o rigor que pretende para o trabalho, e se os dados forem considerados heteroscedásticos, deve-se diminuir a faixa de trabalho para atingir a homoscedasticidade ou utilizar o método dos mínimos quadrados ponderados.

O teste do modelo foi utilizado, e assim como para o teste de variância, foi utilizado dois testes, o proposto pelo trabalho, o teste da falta de ajuste e o teste de Mandel, como teste comparativo. Observa-se a não adequação do modelo para os compostos com o teste da falta de ajuste com excessão do Mirex, sendo assim necessário propor um outro modelo, já o teste de Mandel, apresentou um composto em que o melhor modelo seria a função quadrática em vez da função linear (DLD).

Desta forma, as ferramentas apresentadas evidenciam uma análise critica dos dados para a curva linear, sendo imprescindível sua utilização para um trabalho dentro dos moldes da qualidade.

4.2. Aplicação das ferramentas da qualidade para análise de organoclorados em pescado por RSE

4.2.1. Planejamento experimental

Para desenvolvimento do planejamento experimental da fase de PDMS, foi utilizado o molde pré-estabelecido na Figura 16, e assim produzido várias barras de SBSE para obter-se respostas de recuperações de um composto conhecido com os fatores citados na parte experimental. Assim foram produzidas 8 barras de SBSE como destacado na Tabela 30 com seu fator de Recuperação/massa PDMS na extração do Antraceno, que possui um $\text{Log } K_{O/W} = 4,45$ e peso molecular de 178 Daltons. Foi utilizado procedimento descrito na literatura para extração deste composto (BARCO-BONILA et al., 2011). Para quantificação da metodologia foi construída uma curva de calibração com 7 pontos, que demonstrou um r^2 de 0,994 mostrando correlação linear entre concentração e o sinal analítico.

Figura 30: Curva de calibração do método com analito Antraceno com 7 pontos.

A Tabela 30 representa as relações Recuperação/massa PDMS com cada experimento. Foi realizada esta razão, pois na produção de cada barra de SBSE houve variação da massa de PDMS que ficava na fase, então sabendo que a recuperação é proporcional ao volume de fase, realizou-se este fator.

Tabela 30: Recuperação de 8 barras de SBSE.

Experimentos	Recuperação (%)	Massa PDMS	Recuperação/massa PDMS
1	69,40	0,02960	2344
2	88,28	0,02450	3603
3	66,63	0,02650	2514
4	56,81	0,02960	1919
5	63,34	0,02400	2639
6	78,70	0,03020	2605
7	73,50	0,02390	3075
8	71,51	0,03090	2314

Com as respostas obtidas foram multiplicados os fatores com seus respectivos resultados para análise dos fatores significativos para a produção das fases de PDMS, como descrito na Tabela 30. É importante ressaltar que os experimentos foram realizados de forma aleatória para não ter-se tendências nas respostas de recuperação.

Tabela 31: Cálculo dos efeitos de primeira (1,2 e 3), segunda (12,13 e 23) e terceira ordem (123).

Experimentos	Número de efeitos	1	2	3	4	5	6	7
	Interações	1	2	3	12	13	23	123
1	Níveis multiplicado pela recuperação	-2344	-2344	-2344	2344	2344	2344	-2344
2		3603	-3603	-3603	-3603	-3603	3603	3603
3		-2514	2514	-2514	-2514	2514	-2514	2514
4		1919	1919	-1919	1919	-1919	-1919	-1919
5		-2639	-2639	2639	2639	-2639	-2639	2639
6		2605	-2605	2605	-2605	2605	-2605	-2605
7		-3075	3075	3075	-3075	-3075	3075	-3075
8		2314	2314	2314	2314	2314	2314	2314
	Somatório	-130	-1369	253	-2580	-1457	1658	1126
	Efeito	-32	-342	63	-645	-364	414	281

Tratando a verificação dos dados do planejamento observa-se que nem um dos fatores são considerados significativos para o nível de confiança de 95% e 4 graus de liberdade, que obteve um t crítico de 864. Observa-se que todos os efeitos estão abaixo deste valor, não sendo assim significativo para a produção da fase nos intervalos trabalhados. No entanto sabe-se que há uma condição de trabalho que mostrou maior rendimento de recuperação nos intervalos trabalhos: temperatura de mufla a 200°C; sem tempo de espera em temperatura ambiente; e tempo de mufla 60 minutos, correspondente ao experimento 2.

Figura 31: Gráfico de efeito contra probabilidade Z. Considerando como resposta o fator recuperação/massa PDMS.

Foi construído o gráfico de pareto no Software Statistica 7 para validação da Figura 31, evidenciando os valores dos efeitos e que nenhum deles é maior que o ponto crítico calculado, sendo assim nenhum dos fatores teve significância sobre o processo de produção da fase, tanto no nível baixo quanto nos níveis altos, mostrando robustez da metodologia de produção com os fatores trabalhados.

Figura 32: Gráfico de pareto evidenciando os efeitos das interações de 1º, 2º e 3º ordem.

Desta forma pode-se identificar robustez no método de produção das barras de SBSE (desvio padrão na recuperação de 13%), já que nem um dos parâmetros trabalhados teve influência significativa na extração do analito nas faixas de trabalho, esta condição foi analisada também por Microscopia de Varredura Eletrônica (MEV) para observar se houve alteração significativa na superfície do polímero, o que mostrou ter forma padrão.

Tabela 32: Resultados de MEV dos 8 experimentos realizados. Com ampliação de 150, 1000 e 5000 vezes.

Experimentos	150 x (100 µm)	1000x (10 µm)	5000x (1 µm)
1
2

A análise MEV evidenciou que o processo de cura do polímero PDMS não é perfeito, o processo de produção deixa alguma imperfeições na superfície do polímero, como buracos e ranhuras, evidenciado na resolução de 150x, o que foi observado em todas barras de SBSE, isso se deve provavelmente a imperfeições do molde. Apesar disso, não foi evidenciado nenhuma influência destas imperfeições.

5. Conclusão

Como pode ser observado, as ferramentas da qualidade são adequadas na otimização de um método para ser operado em sua melhor condição (obtido com a aplicação do planejamento experimental) e evidenciar se este método está apto ou não para atender a critérios estabelecidos por guias de validação. Estas ferramentas, como dito anteriormente, são utilizadas conforme decisão do analista, quando julgado ser de importância e influência no trabalho. No método QuEChERS julgou-se que a seletividade, a recuperação, a linearidade e a precisão foram representativos, expressando os resultados necessários para uma boa avaliação e julgamento do método trabalhado. Como resultado, obteve-se boas respostas para o método QuEChERS, método já bem difundido na literatura. Obteve-se seletividade ótima, evidenciando este procedimento como trabalho prévio para todo tipo de análise. A recuperação foi bem estabelecida, com recuperação dentro do especificado (70 e 120% de recuperação). A precisão apresentou valores de CV abaixo dos 20%, evidenciando adequação ao uso pretendido do método.

Com isto temos o cálculo da incerteza, como resultado final da metodologia, mostrando a confiabilidade dos resultados, já que este fator não mostra o erro da metodologia, mas sim, o quanto preciso a metodologia é com o resultado obtido. Desta forma o método QuEChERS se mostrou adequado para análise de organoclorados em pescado, com vantagem de ser uma técnica simples, barata e com vantagens visíveis, como já destacado no estudo atual.

Como proposta do trabalho, e considerando sua importância, foi selecionada a análise da linearidade de uma forma mais profunda para evidenciar se o modelo linear é o mais adequado, além de ser o mais utilizado no campo de química analítica, sendo a incerteza da curva um parâmetro primordial e simples de ser aplicado, podendo ser aplicado como mais um fator de aceitação da curva. Como foi evidenciado, a curva linear não é o mais adequado para o método já que os resultados não se apresentaram dentro do esperado, com excessão dos testes de Levene e Mandel aplicados, que mostraram valores condizentes para a curva linear. Esta análise como já dito, depende do rigor que o analista pretende aplicar no trabalho, sendo mais uma análise crítica, já que os testes utilizados já são bem difundidos e aplicados.

O método RSE foi desenvolvido com o intuito de desenvolvimento da fase de PDMS, em que foi bem sucedida, abrindo espaço para trabalhos futuros, como desenvolvimento do sistema estabelecido, assim como a metodologia de confecção da fase mostrando que a ferramenta da qualidade planejamento experimental pode ser utilizado em vários campos, seja

na otimização de um método bem estabelecido como o QuEChERS, ou no desenvolvimento de um novo método como o RSE.

Desta forma os resultados obtidos foram muito satisfatórios, atingindo os objetivos propostos, destacando ferramentas da qualidade as quais são bem difundidas em guias e normas, mas pouco exploradas em pesquisas e rotinas de trabalho na química analítica, concluindo assim quanto à importância em aplicar tais ferramentas para agregar valor ao trabalho além de aumentar a confiabilidade nos resultados obtidos.

Apêndice A: Declaração de treinamento no Laboratório Nacional Agropecuário – LANAGRO – Campinas – SP.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO
Secretaria de Defesa Agropecuária – SDA
Coordenação Geral de Apoio Laboratorial – CGAL
Laboratório Nacional Agropecuário – Lanagro-SP

DECLARAÇÃO

Declaramos, a quem interessar possa, que o Sr. Sérgio Pereira da Costa participou do treinamento para análise de organoclorados utilizando método QuEChERS na Unidade de Análise de Contaminantes Orgânicos – ORG no Laboratório Nacional Agropecuário (Lanagro-SP), CNPJ 00.396.895/0047-08, sito à Rua Raul Ferrari, s/n, Jd. Santa Marcelina, Campinas-SP, pertencente à rede de Laboratórios oficiais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Governo Federal, no período de 25 a 29 de julho de 2011.

Campinas, 29 de agosto de 2011.

Assinatura manuscrita de Maria de Fátima Martins Pinhel.
Maria de Fátima Martins Pinhel
Fiscal Federal Agropecuário
Carteira fiscal nº 3471
Coordenadora Técnica do Lanagro-SP

Apêndice B: Figuras e gráficos para os analitos de extração individuais e para o conjunto multiresíduo no método QuEChERS.

Analitos	Figuras e Gráficos		
ALD	Figura dos efeitos	Gráfico de Pareto	Quadrado
cCLD	Figura dos efeitos	Gráfico de Pareto	Quadrado

ALD

Figuras e Gráficos

Gráfico de Pareto

Quadrado

cCLD

PCB 180

ppD

Apêndice C: tabela de resíduos das curvas analíticas para os 14 analitos com a técnica QuEChERS.

6. Referências

AHADI, A.; PARTOAZAR, A.; ABEDI-KHORASGANI, M.H.; SHETAB-BOUSHEHRI, S.V.; **Comparison of liquid-liquid extraction-thin layer chromatography with solid-phase extraction-high-performance thin layer chromatography in detection of urinary morphine**; Journal of Biomedical Research, 2011, 25(5):362-367.

AMARAL, H.I.F.; BERG, M.; BRENNWALD, M.S.; HOFER, M.; KIPFER, R.; ¹³C/¹²C **Analysis of Ultra-Trace Amounts of Volatile Organic Contaminants in Groundwater by Vacuum Extraction**; Environ. Sci. Technol. 2010, 44, 1023–1029.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J. **Fast and easy Multiresidue method employing acetonitrile extraction/partition and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce**. Journal of AOAC International, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

AOAC OFFICIAL METHOD 2007.01; **Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate Gas Chromatography/Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry**; First Action, 2007.

AZZOUZ, A.; BALLESTEROS, E.; **Combined microwave-assisted extraction and continuous solid-phase extraction prior to gás chromatography-mass spectrometry determination of pharmaceuticals, personal care products and hormones in soils, sediments and sludge**; Science of the Total Environment, 2012.

BALTUSSEN, E.; SANDRA, P.; DAVID, F.; CRAMERS, C.A.; **Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles**; Journal of Microcolumn Separation, v. 11, p. 737, 1999.

BARCO-BONILLA, N.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; PLAZA-BOLAÑOS, P.; FERNÁNDEZ-MORENO, J.L.; FRENICH, A.G.; VIDAL, J.L.M.; **Comprehensive analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in wastewater using stir bar sorptive extraction and gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry**; Analytica Chimica Acta 693 (2011) 62–71.

BARREAK, S.; CREN-OLIVÉ, C.; WIEST, L.; BAUDOT, R.; ARNAUDGUILHEM, C.; **Multi-residue analysis and ultra-trace quantification of 36 priority substances from the European Water Framework Directive by GC–MS and LC-FLD-MS/MS in surface Waters**; Talanta 79 (2009) 712–722.

BEIZHEN, H.; WEIHUA, S.; LIPING, X.; TIEFENG, S.; **Determination of 33 pesticides in tea using accelerated solvent extraction/gel permeation chromatography and solid phase extraction/gas chromatography-mass spectrometry**; Chin J Chromatogr, 2008, 26(1): 22–28.

BELTRAN, J.; LÓPEZ, F.J.; HERNÁNDEZ, F.; **Solid-Phase microextraction in pesticide residue analysis – Review**; Journal of Chromatography A, v. 885, p. 389-404, 2000.

BELTRÃO, K.; **Norte-americanos encerram missão ao Brasil para verificar controles sanitários**; 22 de Setembro de 2010; Disponível em: <

<http://www.agricultura.gov.br/internacional/noticias/2010/09/norte-americanos-encerram-missao-ao-brasil-para-verificar-controles-sanitarios> > Acesso em 30 de Jan. de 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Interministerial nº 902, de 22 de Setembro de 2008. Diário Oficial da União – **Institui a Rede de Laboratórios de Resíduos e Contaminantes em produtos de origem animal e vegetal destinados ao consumo direto e indireto**. Disponível em < <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarlegislacao.do?operacao=visualizar&id=19099> > Acesso em 30 de Jan. de 2012.

BRITO, N.M.; AMARANTE JR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L.; **Validação de métodos analíticos: Estratégia e discussão**; Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente, Curitiba, v. 13, p. 129-146, 2003.

BRUGGEMANA L., QUAPP W., WENRICH R.; **Test for non-linearity concerning linear calibrated chemical measurements**; Accreditation Quality Assurance, 2006, 625-631.

CARASEK, E.; CUDJOE, E.; PAWLISZYN, J.; **Fast and sensitive method to determine chloroanisoles in cork using an internally cooled solid-phase microextraction fiber**; Journal of Chromatography A, v. 1138, p. 10-17, 2007.

CARASEK, E.; PAWLISZYN, J.; **Screening of Tropical Fruit Volatile Compounds Using Solid-Phase Microextraction (SPME) Fibers and Internally Cooled SPME Fiber**; Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 54, p. 8688-8696, 2006.

CARMI, J.D.; OLIVARES, I.; GROSSI, P.; LANÇAS, F.M.; **Refrigerated Sorptive Extraction: determination of BTEX in water samples**; Journal of Chromatographic Science (2009), 47(9), 812-816.

CBI - MINISTRY OF FOREIGN AFFAIRS OF THE NETHERLANDS; **The Netherlands legislation: Maximum Residue Levels in fish and fishery products (additional requirements)**, 2010.

CCME – Canadian Council of Ministers of the Environment; **Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life**, 2002; Disponível em < http://www.ccme.ca/assets/pdf/sedqg_summary_table.pdf > Acesso em 13 de fevereiro de 2012.

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo; **O Gerenciamento de Áreas Contaminadas no Estado de São Paulo - Cadastro de Áreas Contaminadas e Reabilitadas no Estado de São Paulo, Novembro de 2009**; Disponível em < http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/texto_areas_cont_nov_09_.pdf > Acesso em 10 de fevereiro de 2012.

CHEN, Y.; BEGNAUD, F.; CHAINTREAU, A.; PAWLISZYN, J.; **Analysis of flavor and perfume using an internally cooled coated fiber device**; Journal of Separation Science, v. 30, p. 1037-1043, 2007.

COMUNIDADE EUROPÉIA - **Decisão da Comissão das Comunidades Europeias de 12 de Agosto de 2002 (2002/657/CE)**. Dá execução ao disposto na Directiva 96/23/CE do

Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. Jornal Oficial das Comunidades Europeias de 17/08/2002.

COMUNIDADE EUROPEIA (EC); **Regulation (EC) n° 882/2004 of the European Parliament and of the Council**; de 29 de abril de 2004; Disponível em < <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2004R0882:20060525:EN:PDF> > acessado em 09 de fevereiro de 2012.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente; **Resolução CONAMA N° 357, de 17 de Março de 2005 - Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências**; Disponível em < http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/praias/res_conama_357_05.pdf > Acesso em 11 de fevereiro de 2012.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente; **Resolução CONAMA N° 396, de 3 de Abril de 2008 - Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências**; Disponível em < http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/agua_sub/arquivos/res39608.pdf > Acesso em 11 de fevereiro de 2012.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente; **Resolução CONAMA N° 420, de 28 de Dezembro de 2009 - Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas**; Disponível em < http://www.fundagres.org.br/biossolido/images/downloads/resolucao_420_2009.pdf > Acesso em 11 de fevereiro de 2012.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente; **Resolução CONAMA N° 344, de 25 de Março de 2004 - Estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos mínimos para a avaliação do material a ser dragado em águas jurisdicionais brasileiras, e dá outras providências**.

COSTA, D.L.L.B.; **Desenvolvimento e validação de um método analítico para análise multiresíduo de produtos veterinários em leite bovino através de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas**. Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos – USP. 2010.

DERRINGER, G.; SUICH R.; **Simultaneous Optimization of Several Response Variables**; Journal of Quality Technology, Vol. 12, pp.214-219, 1980.

DOQ-CGCRE; **Guidance on validation of analytical methods**; Revision 3, February 2010.

EPA - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY.; **Guidance for Methods Development and Methods Validation for the RCRA Program – Phase 2: Formal Validation**. 2006. Disponível em: < <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/pdfs/methdev.pdf> >. Acesso em: 30 de Jan. de 2012.

EPA - SW-846 METHOD 8081B; **Organochlorines Pesticides By gas Chromatography**; Revision 2, February 2007; Disponível em < <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/8081b.pdf> > acessado em 09 de fevereiro de 2012.

EPA- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY; **Guidance for Assessing Chemical Contaminant Data for Use in Fish Advisories – Volume 2: Risk Assessment and Fish Consumption Limits**; Third Edition; Office of Science and Technology, Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, 2000. EURACHEM/CITAC; **Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement**; Second Edition; 2000.

EURACHEM - Sociedade Brasileira De Metrologia (SBM). Primeira Edição Brasileira do Guia EURACHEM/CITAC: **Determinando a incerteza de medição em química analítica**. 2º ed. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Metrologia, 2000.

EURL – EUROPEAN UNION REFERENCE LABORATORY; **Modified QuEChERS-Method for the Analysis of Chlorothalonil in Fruits and Vegetables**, 2011.

FAO/WHO FOOD STANDARDS; **Codex Alimentarius**; Disponível em < <http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/pesticides/index.html> > Acesso em 14 de fevereiro de 2012.

FERNANDES, E.A.D.N.; BACCHI, M.A.; TAGLIAFERRO, F.S.; GONZAGA, C.L.; DE FRANÇA, E.J.; FAVARO P.C.; FOGAÇA, A.A.; **Quality system implementation in a Brazilian university laboratory**. Accred Qual Assur (2006) 10: 594–598.

FERREIRA D.C.; SILVA, C.W.M.; **Implementação da ISO 17025 em laboratórios de instituições de ensino tecnológico: Realidade ou utopia**. VI Congresso Brasileiro de Metrologia 2011. Natal – RN.

GHIASVAND, A.R.; HOSSEINZADEH, S.; PAWLISZYN, J.; **New cold-fiber headspace solid-phase microextraction device for quantitative extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment** ; Journal of Chromatography A, 1124 (2006) 35–42.

GHIASVAND, A. R.; SETKOVA, L.; PAWLISZYN, J.; **Determination of flavour profile in Iranian fragrant rice samples using cold-fibre SPME–GC–TOF–MS**; Flavour and Fragrance Journal, v. 22, p. 377-391, 2007.

GIORDANO, A.; RICHTER, P.; AHUMADA, I.; **Determination of pesticides in river water using rotating disk sorptive extraction and gas chromatography–mass spectrometry**; Talanta 85 (2011) 2425– 2429.

GONZÁLEZ, A.G.; ÁNGELES, M.H.; **A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles**. Trends in Analytical Chemistry, v. 26, n. 3, 2007.

GROSSI, P.; **Desenvolvimento e aplicação de técnicas miniaturizadas de preparo de amostras para análises ambientais via GC-MS**; Tese apresentado ao Instituto de Química de São Carlos – USP; 2009.

HARRINGTON E.C.; **The desirability function**, Industrial. Quality Control 21 (1965) 494–498 apud ISLAM, M.A.; SAKKAS, V.; ALBANIS, T.A.; **Application of statistical design of experiment with desirability function for the removal of organophosphorus pesticide from aqueous solution by low-cost material**; Journal of Hazardous Materials 170 (2009) 230–238.

HE, J.; BALASUBRAMANIAN, R.; KARTHIKEYAN, S.; JOSHI, U.M.; **Determination of semi-volatile organochlorine compounds in the atmosphere of Singapore using accelerated solvent extraction**; Chemosphere 75 (2009) 640–648.

HUANG, Y.; ZHOU, Q.; XIE, G.; **Development of micro-solid phase extraction with titanate nanotube array modified by cetyltrimethylammonium bromide for sensitive determination of polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental water samples**; Journal of Hazardous Materials 193 (2011) 82–89.

INMETRO - DOC-CGCRE-008. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Revisão 04, Jul. 2011.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia < http://www.inmetro.gov.br/laboratorios/rbc/lista_laboratorios.asp > Acesso em 30 de Jan. de 2012.

JIMÉNEZ-CHACÓN J., ALVAREZ-PRIETO M.; **Modelling uncertainty in a concentration range**; Accreditation Quality Assurance (2009) 14: 15–27.

JUNIOR, I.M.; CIERCO, A.A.; ROCHA, A.V.; MOTA, E.B.; LEUSIN, S.; **Gestão da Qualidade**; FGV Editora, 9ª edição, 2008.

KHAJEH, M.; **Optimization of microwave-assisted extraction procedure for zinc and copper determination in food samples by Box-Behnken design**; Journal of Food Composition and Analysis 22 (2009) 343–346.

KLEJDUS, B.; LOJKOVÁ, L.; PLAZA, M.; SNÖBLOVÁ, M.; STERBOVÁ, D.; **Hyphenated technique for the extraction and determination of isoflavones in algae: Ultrasound-assisted supercritical fluid extraction followed by fast chromatography with tandem mass spectrometry**; Journal of Chromatography A, 1217 (2010) 7956–7965.

KOLE, P.L.; MILLERSHIP, J.; MCELNAY, J.C.; **Determination of diclofenac from paediatric urine samples by stir bar sorptive extraction (SBSE)–HPLC–UV technique**; Talanta 85 (2011) 1948–1958.

LEITE, F.; **Validação em análise química**; Editora Átomo, 5ª edição, ampliada e atualizada, 2008.

LIN, W.; LI, Z.; **Detection and Quantification of Trace Organic Contaminants in Water Using the FT-IR-Attenuated Total Reflectance Technique**; Anal. Chem. 2010, 82, 505–515.

LIU, H.; LIU, Y.; WU, B.; NIAN, H.; CHEN, H.; CHIU, K.; LO, J.; **Process sampling module coupled with purge and trap–GC–FID for in situ auto-monitoring of volatile organic compounds in wastewater**; Talanta 80 (2009) 903–908.

LYNAM, K.; **PAH Analyses with High Efficiency GC Columns: Column Selection and Best Practices**; Agilent Technologies, Inc.; Disponível em < <http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5990-5872EN.pdf> > acessado em 24 de maio de 2012.

MAURICIO A. Q. et al.; **Manual da Garantia da Qualidade – Resíduos e Contaminantes em alimentos**; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; 1ª Edição; Brasília, 2011.

MELO, L.P.; NOGUEIRA, A.M.; LANÇAS, F.M.; QUEIROZ, M.E.C.; **Polydimethylsiloxane/polypyrrole stir bar sorptive extraction and liquid chromatography (SBSE/LC-UV) analysis of antidepressants in plasma samples**; Analytica Chimica Acta 633 (2009) 57–64.

MILLER J.N., MILLER J.C.; **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**; 5ª ed.; Person Education Limited, 2005.

MINISTRY OF HEALTH, LABOUR AND WELFARE; **Positive List System for Agricultural Chemical Residues in Foods – Japan**, 2006; Disponível em < <http://www.mhlw.go.jp/english/topics/foodsafety/positivelist060228/index.html> > Acesso em 13 de fevereiro de 2012.

MMUALEFE, L.C.; TORTO, N.; HUNTSMAN-MAPILA, P.; MBONGWE, B.; **Headspace solid phase microextraction in the determination of pesticides in water samples from the Okavango Delta with gas chromatography-electron capture detection and time-of-flight mass spectrometry**; Microchemical Journal 91 (2009) 239–244.

NBR ISO/IEC 17025:2005; **Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração**; 2005.

NETO, B. B.; SCARMINO, I. S.; BRUNS, R. E.; **Como Fazer Experimentos**; 4ª Edição, Bookman, 2010.

NGUYEN, T.D.; YU, J.E.; LEE, D.M.; LEE, G.H.; **A multiresidue method for the determination of 107 pesticides in cabbage and radish using QuEChERS sample preparation method and gas chromatography mass spectrometry**; Food Chemistry 110 (2008) 207–213.

OLIVARES, I.R.B. **Gestão de Qualidade em Laboratórios**. Campinas: Editora Átomo, 2006a.

OLIVARES, I.R.B.; **Desenvolvimento, otimização e validação da técnica HS-SPME-GC/MS para análise de amostras obtidas do Rio Atibaia através da aplicação de uma sistemática “ISO” para diagnóstico ambiental de áreas contaminadas**; Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos; 2006b.

OLIVARES, I.R.B. **Gestão de Qualidade em Laboratórios**. Campinas: Editora Átomo, 2009. 146 p. 2ª edição (revisada e ampliada).

OLIVARES, I.R.B.; LOPES, F.A.: **Essential steps to providing reliable results using the analytical quality assurance cycle**; Trends in analytical chemistry, Vol. 35, 109-121, 2012.

OLIVEIRA, E.C.; AGUIAR, P.F.; **VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DA AVALIAÇÃO DE INCERTEZA EM CURVAS DE CALIBRAÇÃO MELHOR AJUSTADAS POR POLINÔMIOS DE SEGUNDO GRAU**; *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 6, 1571-1575, 2009.

PAYÁ, P.; ANASTASSIADES, M.; MACK, D.; SIGALOVA, I.; TASDELEN, B.; OLIVA, J.; BARBA, A.; **Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gás and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection**; *Anal Bioanal Chem* (2007) 389:1697–1714.

PAWLISZYN, J.; ARTHUR, C.L.; **Solid-phase microextraction with thermal-desorption using fused-silica optical fibers**; *Analytical Chemistry*, v. 62, p. 2145-2148, 1990.

PEREZ, L. H.; **Análise de Resíduos: Atendimento das exigências européias ou embargo nas exportações de produtos brasileiros de origem animal. Análises e Indicadores do Agronegócio**, volume 2, n. 4. Disponível em: < <http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=8922> >. Acesso em: 30 Jan. de 2012.

PIZARRO, C.; GONZÁLEZ-SÁIZ, J.M.; PÉREZ-DEL-NOTARIO, N.; **Multiple response optimisation based on desirability functions of a microwave-assisted extraction method for the simultaneous determination of chloroanisoles and chlorophenols in oak barrel sawdust**; *Journal of Chromatography A*, 1132 (2006) 8–14.

REGULATION (EC) N° 882/2004 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL de 29 de abril de 2004; **On official controls performed to ensure the verification of compliance with feed and food law, animal health and animal welfare rules**. Disponível em < <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2004R0882:20060525:EN:PDF> > Acesso em 27 de fevereiro de 2012.

RESTEK; **Q-sep™ QuEChERS Sample Prep Packets & Tubes** ;Disponível em < <http://www.restek.com/quechers> > Acesso em 01 de Fevereiro de 2012.

RICHTER, B.E.; JONES, B.A.; EZZEL, J.L.; PORTER, N.L.; **Accelerated Solvent Extraction: A technique for sample preparation**; *Anal. Chem.* 1996, 68, 1033-1039.

RUBERT, J.; SOLER, C.; MAÑES, J.; **Evaluation of matrix solid-phase dispersion (MSPD) extraction for multi-mycotoxin determination in different flours using LC–MS/MS**; *Talanta* 85 (2011) 206–215.

RUEDA, M.E.; SARABIA, L.A.; HERRERO, A.; ORTIZ, M.C.; **Optimisation of a flow injection system with electrochemical detection using the desirability function**

Application to the determination of hydroquinone in cosmetics; *Analytica Chimica Acta* 479 (2003) 173–184.

SANCO - Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. Document No. SANCO/2007/3131 31/October/2007.

SANCO/12495 - Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. Document No. SANCO/12495/2011 - 2012.

SANTOS, M.C.H.; BERNARDES, A.T.; SANTOS, L.A.S.; ROCHA, G.M.; SILVA, A.V.F.; **A proposta do INMETRO para a disseminação da metrologia e avaliação da conformidade na graduação em engenharia nas modalidades presencial e EAD.** VI Congresso Brasileiro de Metrologia 2011 – Natal - RN.

SASANO, R.; HAMADA, T.; KURANO, M.; FURUNO, M.; **On-line coupling of solid-phase extraction to gas chromatography with fast solvent vaporization and concentration in an open injector liner Analysis of pesticides in aqueous samples;** *Journal of Chromatography A*, 896 (2000) 41–49.

SCHIAVON, B.; **Pesquisa sobre dificuldades operacionais de laboratórios de ensaio após implantação do sistema de gestão da qualidade ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005;** Monografia apresentada ao Instituto de Química de São Carlos – USP. 2011.

SINHA, S.N.; VASUDEV, K.; RAO, M.V.V.; **Quantification of organophosphate insecticides and herbicides in vegetable samples using the “Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe” (QuEChERS) method and a high-performance liquid chromatography–electrospray ionisation–mass spectrometry (LC–MS/MS) technique;** *Food Chemistry* 132 (2012) 1574–1584.

SKARTLAND, L.K.; MJOS, S.A.; GRUNG, B.; **Experimental design for modeling retention patterns and separation efficiency in analysis of fatty acid methyl esters by gas chromatography-mass spectrometry;** *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 6823–6831.

THE FEDERAL AUTHORITIES OF THE SWISS CONFEDERATION; **Ordonnance du DFI sur les substances étrangères et les composants dans les denrées alimentaires –** Switzerland, 1995; Disponível em < <http://www.admin.ch/ch/f/rs/8/817.021.23.fr.pdf> > Acesso em 13 de fevereiro de 2012.

SCHIAVON, B.; **Pesquisa sobre dificuldades operacionais de laboratórios de ensaio após implantação do sistema de gestão da qualidade ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005;** Monografia apresentada ao Instituto de Química de São Carlos – USP. 2011.

VAN LOCO J., ELSKENS M., CROUX C., BEERNAERT H.; **Linearity of calibration curves: use and misuse of the correlation coefficient;** *Accreditation Quality Assurance*, 2002, 281-285.

WANG, J.; WAN, W.; **Application of desirability function based on neural network for optimizing biohydrogen production process;** *International Journal of Hydrogen Energy* – 34 (2009) 1253 – 1259.

WANG, S.; OAKES, K.D.; BRAGG, L.M.; PAWLISZYN, J.; DIXON, G.; SERVOS, M.R.; **Validation and use of in vivo solid phase micro-extraction (SPME) for the detection of emerging contaminants in fish**; Chemosphere 85 (2011) 1472–1480.

WANG, Y.; MCCAFFREY, J.; NORWOOD, D. L.; **Recent Advances in Headspace Gas Chromatography**; Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. v. 31, p. 1823-1851, 2008.

WILEY - **Total Quality Mangement**. Chapter 5. Disponível em: <
<http://www.wiley.com/college/sc/reid/chap5.pdf>>. Acesso em: 30 de jan. 2012.