Ricardo dos Santos Camargo

“Aplicação do *Analytical Quality Assurance Cycle* no desenvolvimento de método para análise de compostos voláteis e semivoláteis pelo acoplamento das técnicas *Refrigerated Sorptive Extraction e Gas Chromatography* (RSE/GC)”

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências - Programa de Química

Área de Concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Igor Renato Bertoni Olivares

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos
2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Assinatura:

Data:

Ricardo S. Camargo
09/02/17

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Camargo, Ricardo dos Santos

Aplicação do analytical quality assurance cycle no desenvolvimento de método para análise de compostos voláteis e semivoláteis pelo acoplamento das técnicas Refrigerated Sorptive Extraction e Gas Chromatography (RSE/GC) / Ricardo dos Santos Camargo. — São Carlos, 2016.
203 f.

Tese (Doutorado em Química Analítica e Inorgânica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2016.
Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Igor Renato Bertoni Olivares

1. Qualidade total. 2. Controle estatístico do processo. 3. Amostragem experimental. 4. Cromatografia a gás. I. Título.

*Referências Bibliográficas
conferidas pelo SBI/IQSC*

“No princípio, criou Deus os céus e a terra” Genesis 1:1.

“Tu eras querubim da guarda ungido, e te estabeleci; permanecias no monte santo de Deus, no brilho das pedras andavas. Perfeito eras nos teus caminhos, desde o dia em que foste criado até que se achou iniquidade em ti. Na multiplicação do teu comercio, se encheu o teu interior de violência, e pecaste; pelo que te lançarei profanado, fora do monte de Deus e te farei perecer, ó querubim da guarda, em meio ao brilho das pedras” Ezequiel 28:14-16.

“Então a serpente disse à mulher: É certo que não morrereis. Porque Deus sabe que no dia em que dele comerdes se vos abrirão os olhos e, como Deus, sereis conhecedores do bem e do mal. Vendo a mulher que a árvore era boa para se comer, agradável aos olhos e árvore desejável para dar entendimento, tomou-lhe do fruto e comeu e deu também ao marido, e ele comeu” Genesis 3:4-5.

“Então, o Senhor Deus disse à serpente: [...] Porei inimizade entre ti e a mulher, entre a tua descendência e o seu descendente. Este te ferirá a cabeça, e tu lhe ferirás o calcanhar.” Genesis 3:14-15.

“Portanto, o Senhor mesmo vos dará um sinal: eis que a virgem conceberá e dará à luz um filho e lhe chamará Emanuel” Isaías 7:14.

“Mas Ele foi traspassado pelas nossas transgressões e moído pelas nossas iniquidades; o castigo que nos traz a paz estava sobre Ele, e pelas suas pisaduras fomos sarados” Isaías 53:5

“Não se turbe o vosso coração; crede em Deus, crede também em mim. Na casa de meu Pai há muitas moradas. Se assim não fora, eu vo-lo teria dito. Pois vou preparar-vos lugar. E, quando eu for e vos preparar lugar, voltarei e vos receberei para mim mesmo, para que, onde eu estou, estejais vós também” João 14:1-3.

Dedicatória

Eu dedico este trabalho à Antônio de Camargo (*in memorium*), Lindaura Viana da Costa (*in memorium*), Antônio Fernandes dos Santos, Alzira Ribeiro de Camargo, Elizete Costa dos Santos Camargo e Bento Domingos de Camargo. Todos vocês lutaram como Leões durante toda a vida. Eu oro ao SENHOR para que me dê oportunidades para também lutar como um, para que eu possa provar a Deus e a mim mesmo, que o sangue que corre nas minhas veias também é o de vocês, valorosos guerreiros de paz.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, o SENHOR dos Exércitos, Criador de todo o Céu, Terra e seres viventes, pelo seu Amor. Ele é digno de honra e louvor. Eu, sendo pecador, devo tudo a Ele, pois quando perdida estava toda a humanidade na transgressão de sua Santa Lei, Ele não considerou que seria certo a destruição de todos, antes proveu um meio de unir a misericórdia e a justiça. Ele mesmo pagou o preço que Sua Lei exige. Enviou Seu Filho Amado, Jesus Nazareno, que se esvaziou de sua glória, assumindo forma de servo, sendo obediente em tudo até mesmo na cruz, pendurado por erros que não eram dEle. Na cruz, o meu preço foi pago, para que crendo nEle, eu tenha vida e não morte eterna, consequência da minha transgressão. Mais uma vez digo: Ele é digno de toda a honra e de todo o louvor! Agradeço, querido Deus, pela oportunidade de estudar e alcançar esse título e espero servi-lo com esse presente que me deste pelo seu Filho Jesus. Amém.

Agradeço aos meus avós e especialmente meus pais, Elizete e Bento, pelo amor, dedicação, privações que tiveram que passar para me ajudar, pelas broncas e surras, que me fizeram alguém melhor. O alicerce familiar que tive foi excepcional e só por isso estou aqui escrevendo esse agradecimento. Não foi sorte. Não foi destino. Foram vocês que construíram boa parte do meu caráter. Obrigado por isso!

Agradeço ao meu irmão Leonardo e minha cunhada Isabela, por todo o apoio que me deram, às vezes até sem nem eu conseguir perceber. Pelos conselhos, brigas, abraços, camaradagem, abrigo no apartamento em São Paulo e acima de tudo, compreensão pelo meu jeito desleixado. Obrigado Leo e Zá!

Talvez eu não tenha mais textos desse tipo pela frente, na qual possa agradecer com palavras, mas só queria dizer que você é minha para sempre. Eu não quero outra pessoa. Quero você, Klécia. Obrigado por ser a mulher que me completa.

Agradeço a Daniel Buzzá e Akio Nonaka Jr. pela amizade desses anos todos. Pode passar o tempo que for, quando encontro qualquer um desses, a afeição nunca esfria. É muito bom ter vocês como amigos.

Quero agradecer ao Paulo Nascimento, meu professor de Química no ensino médio, que me fez apaixonar por essa ciência. Também agradeço, de forma geral, a todos os meus colegas de turma do bacharel, os “zero zero sete” (007). Foram muito bons esses anos. Agradeço especialmente a Fernando Alves Petri (Butão) e Thiago Della Nina Tibiriçá (Urubu, Explosão, Thitibi, Rexas etc.), os dois mais camaradas desse tempo. Não posso me esquecer da Shirley

e Carlos Petri, pais do Butão que foram praticamente meus pais em São Carlos. Através deles, também conheci Marina Massocco, grande amiga também. *Grazie!*

Também agradeço a Benedito dos Santos Lima Neto, meu orientador na iniciação científica, pelos conselhos e exemplo. Dessa época também agradeço aos amigos Valdemiro (Magão), Zé Luiz, Camila, Antônio (Naná), Gustavo Metzker, as Danielas, Henrique Koch, Larissa Fonseca e Augusto pelas risadas e ajudas.

Agradeço a Eduardo Bessa de Azevedo pelo professor que é, zeloso e competente e pelo exemplo de vida, que mesmo sofrendo com a recuperação do AVC, não deixa de viver. Agradeço ao Eduardo também porque numa época em que o individualismo reina, ele compartilhou o laboratório sob sua supervisão conosco, quando não tínhamos estrutura para continuar esse trabalho. Também agradeço à Maria Olímpia de Oliveira Rezende e Eny Maria Vieira pelas inúmeras ajudas em seus laboratórios. Nessa época, agradeço aos amigos Sérgio Pereira da Costa, Rodrigo Padovan, Maraisa Franco, Katherine Ardilla, Natália Sabatina, Ana Fornazari (e à sua mãe pelos bolos e tortas!), Mônica, Ulisses, Tiago pelas risadas, ajudas e companheirismo. Também agradeço ao Bruno Fumes (Fuminho) pelas inúmeras ajudas e especialmente àquela que salvou esse trabalho, quando o SENHOR respondeu à minha oração!

Agradeço ao Igor Olivares por quase 5 anos de amizade e companheirismo. Foi uma honra para mim trabalhar com uma pessoa tão séria e competente e ao mesmo tempo um amigo para todas as horas. Uma pessoa que dá o valor máximo para a coisa mais importante que Deus nos deu: a família. Agradeço também à sua cara-metade, Vitor Paccas, pelas risadas, pela amizade e pelos toques em qualidade. Nessa época, agradeço à Heloisa, Eduardo Quaresma, Tarcísio, Lucas Quintal, Daniela, Priscila, Laís, Sarah, Tatiana Turuta, Anderson Massahiro (o melhor *consigliere* de como colocar as ideias no papel que eu já tive!).

Agradeço imensamente a Vivian Cristina dos Santos Hackbart e Guilherme Theodoro Nascimento Pereira de Lima pelos bons momentos de amostragem em São Luiz do Paraitinga, onde houve muitos risos consoante com trabalho sério!

Agradeço a todos os alunos da disciplina “Sistema NBR ISO/IEC 17025” do ano de 2014 quando fui estagiário do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE). A contribuição de cada um está no Capítulo 3.

Agradeço a todo o pessoal do operacional: laboratórios de Ensino (Glauco, Cidinha, Renatinha e Cia), Central de Análises Químicas (Paulo e Cia), Oficina e Vidraria (Toninho e Cia) e Biblioteca (Bernadete e Cia) e Secretaria (Silvia, Andrea, Gustavo e Cia). Em especial, agradeço ao Ademar Pereira, o Boy, porque afinal, é “só flores”!

Agradeço também às agências de fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas bolsas concedidas.

Título: Aplicação do *Analytical Quality Assurance Cycle* no desenvolvimento de método para análise de compostos voláteis e semivoláteis pelo acoplamento das técnicas *Refrigerated Sorptive Extraction* e *Gas Chromatography* (RSE/GC)

Palavras chave: Qualidade Total; Controle Estatístico de Processo; Amostragem Experimental; Cromatografia a Gás.

Resumo

Este trabalho visou a aplicação de uma ferramenta da qualidade chamada *Analytical Quality Assurance Cycle*, que engloba num ciclo: a Validação de Métodos, já bem conhecida do meio científico; o Cálculo de Incerteza Analítica e Controle de Qualidade Intralaboratorial, estes ainda pouco aplicados no meio acadêmico, mas que unidos se mostraram uma alternativa útil e poderosa para a garantia da qualidade de resultados de um laboratório de pesquisa e desenvolvimento universitário. O projeto de pesquisa que recebeu a aplicação da ferramenta buscava uma otimização de metodologia de extração de contaminantes, denominada *Refrigerated Sorptive Extraction* que é baseada em sorção por barra de polidimetilsiloxano, e posterior determinação dos contaminantes voláteis e semivoláteis por um cromatógrafo a gás com detector de ionização em chama (GC/FID). Uma das otimizações contemplou a miniaturização do protótipo, o que tornou possível utilizar a dessorção térmica diretamente no injetor do cromatógrafo, o que permitiu ao equipamento determinar concentrações cada vez mais baixas, como foi o caso dos compostos octilfenol e fluoranteno, alcançando a concentração de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$. A aplicação da metodologia foi realizada em amostras ambientais reais de água superficial, coletadas segundo os procedimentos descritos no Guia nacional de coleta e preservação de amostras publicado pela Agência Nacional de Águas (ANA) e Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). Como um adendo da etapa de Cálculo de Incerteza do ciclo, foram descritos os critérios para o Cálculo de Incerteza da Amostragem, de muita importância para a garantia da qualidade do resultado final. Foram encontrados alguns obstáculos para a aplicação do *Analytical Quality Assurance Cycle*, que exige a utilização de padrões analíticos com incerteza declarada (produzidos de acordo com a norma ISO Guia 34) e a calibração de equipamentos que interferem na qualidade dos resultados. Nesse trabalho não foi possível utilizar os padrões ISO Guia 34, mas através de um programa de verificação da balança analítica com peso-padrão calibrado em laboratório da Rede Brasileira de Calibração do Instituto Nacional de Metrologia e Qualidade Industrial (RBC/INMETRO), foi possível obter a Rastreabilidade Metrológica para as medições realizadas nas amostras coletadas. Apesar de todo o cuidado com a garantia da qualidade com as ferramentas aplicadas, a Rastreabilidade Metrológica por si só não consegue garantir a qualidade do resultado da medição integralmente. Portanto foi detectada a necessidade de implantar um Sistema de Gestão da Qualidade adaptado ao laboratório para prover a Rastreabilidade Documental que faltava. Foram utilizadas as normas NBR ISO/IEC 17025 e Boas Práticas de Laboratório para fornecer uma base para o sistema implantado. Enfim, todo esse trabalho foi dedicado a aproximar a Metrologia, a Garantia e o Controle da Qualidade aos laboratórios de pesquisa universitários, pois é imprescindível que esses conceitos sejam aplicados à academia para garantir a reprodutibilidade dos resultados gerados.

Title: Application of the Analytical Quality Assurance Cycle in the development of a method of analysis of volatile and semi-volatile contaminants by coupling techniques Refrigerated Sorptive Extraction and Gas Chromatography (RSE/GC)

Keywords: Total Quality Management; Statistical Process Control Traceability; Experimental Sampling; Gas Chromatography.

Abstract

This thesis presents an application of a quality tool called the Analytical Quality Assurance Cycle, which involves in a cycle: the Validation of Methods, already well known in the scientific environment, the Estimation of Analytical Uncertainty and Intralaboratorial Quality Control. These latter are few applied in the academic medium, but that united tools proved to be an useful and powerful alternative for a guarantee of the quality of results of research and development laboratories at universities. The research project that received the application of this tool sought an optimization of contamination extraction methodology, denominated Refrigerated Sorptive Extraction that is based on sorption by a polydimethylsiloxane bar, and subsequent determination of volatile and semivolatile contaminants by a gas chromatograph with flame ionization detector (GC/FID). One of the optimizations contemplated the miniaturization of the prototype, which enabled the thermal desorption inside the injector of the chromatograph, which allowed the equipment to reach concentrations increasingly low, as was the case of the compounds octylphenol and fluoranthene, achieving a concentration of $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$. The application of the methodology was carried out in samples of surface water collected according to the National Collection and Preservation Guide published by the Brazilian National Water Agency (ANA) and São Paulo State Environmental Company (CETESB). As an addendum of the Estimation of Uncertainty step in the cycle, was discussed the methods of Estimation of Uncertainty of the Sampling, that it is very important for a guarantee of the quality of the final result. Some challenges were found in the application of the Analytical Quality Assurance Cycle, which requires the use of analytical standards with declared uncertainty (made according the ISO Guide 34) and a calibration of equipment that interferes in the quality of the results. In this project, it is not used analytical standards with declared uncertainty, but the introduction of a program of verification of the analytical balance with standard weight calibrated in a laboratory of the Brazilian Calibration Network of the National Institute of Metrology and Industrial Quality (RBC/INMETRO) provides the Metrological Traceability for the measurements of the samples collected. Despite all the care taken with quality assurance with the applied tools, Metrological Traceability alone cannot guarantee the total quality of the measurement results. Thus, a need was detected to implement a Quality Management System adapted to the laboratory for a probable Documentary Traceability that was lacking. NBR ISO/IEC 17025 and Good Laboratory Practices (GLP) were used as a basis for the implanted system. Finally, all this work was dedicated to approximate the Metrology, the Guarantee and a Quality Control to the university research laboratories, for which the concepts are applied in the academy to guarantee the reproducibility of the generated results.

Lista de Figuras

Figura 1.1 Roteiro para execução da regressão da curva de calibração e avaliação do ajuste	34
Figura 1.2 Sistematização da diferença entre erro e incerteza. O valor 5,6 é uma média de várias medições, ou seja, o resultado da análise. O valor 6,0 é o valor de referência para a análise. Erro é a diferença entre o resultado medido e o valor de referência, enquanto Incerteza é a dispersão dos resultados, sendo caracterizada por uma distribuição, no caso, a distribuição normal.	42
Figura 1.3 Distribuições a) Retangular e b) triangular	43
Figura 1.4 Exemplo de fluxograma da etapa analítica do exemplo de determinação da concentração de bisfenol A	45
Figura 1.5 Diagrama de causa e efeito ou espinha de peixe para incerteza	47
Figura 1.6 Diagrama de causa e efeito, adicionadas as subcomponentes de incerteza	48
Figura 1.7 Diagrama de causa e efeito, mostrando a reorganização da subcomponente branco fortificado agora como componente principal de incerteza	49
Figura 1.8 Diagrama de causa e efeito finalizado	50
Figura 1.9 Diagrama de Ishikawa para as principais fontes de incerteza para amostragem de solo	56
Figura 1.10 Planejamentos de coleta de amostras para cálculo de incerteza da amostragem. a) Divisão simples e b) Divisão dupla	56
Figura 1.11 Carta-controlre típica, com limites superiores e inferiores de atenção (amarelo) e de ação (vermelho)	62
Figura 1.12 Critérios para declaração de uma situação fora de controle	63
Figura 1.13 Construção de uma carta-controlre de Shewhart	64
Figura 1.14 Construção de carta de amplitude, utilizando a combinação de 95% de confiança para os limites de atenção e 99,7% para os limites de controle com $n=2$	66
Figura 1.15 Carta de média pela amplitude, utilizando $n=2$.	68
Figura 1.16 Diagrama que representa o Analytical Quality Assurance Cycle	70
Figura 1.17 Ilustração da Rastreabilidade Metrológica e sua relação com a cadeia ininterrupta de calibrações	71
Figura 2.1 Hidrocarbonetos aromáticos escolhidos para análise.	78
Figura 2.2 Benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos	79
Figura 2.3 Nonilfenol e octilfenol	79
Figura 2.4 Diagrama esquemático do molde em teflon para deposição do PDMS na barra de aço	88
Figura 2.5 Molde em teflon. a) molde em teflon; b) barra de aço acoplada ao suporte; c) suporte e barra acoplados à uma das faces do molde; d) tarraxa envolvendo o molde; e) visão superior do molde completo; f) barra com fase sortiva acoplada ao suporte; g) barra confeccionada	89
Figura 2.6: Detalhe da junção entre a peça de teflon e a barra de aço onde ocorria o vazamento de etanol	90
Figura 2.7: peças de teflon. Nova peça, à esquerda e antiga, à direita. Detalhe do furo cônico.	90
Figura 2.8 Esquema de vedação com o-rings. a) vedação com 1 o-ring da peça antiga; b) peça nova com 2 o-rings	91

Figura 2.9 Ilustração do procedimento de inserção da barra sortiva no injetor do GC para dessorção térmica	93
Figura 2.10 Cromatograma para extração água destilada fortificada na concentração de 50 µg L-1 para HPAs e alquilfenóis e 2000 µg L-1 para BTEX	94
Figura 2.11 Intervalo de confiança (em unidades de área) para a triplicata do branco, considerado como LOD (média somada a 3 vezes o desvio padrão) e o resultado do ponto 1 para benzeno	98
Figura 2.12 Intervalo de confiança (em unidades de área) para a triplicata do branco, considerado como LOD (média somada a 3 vezes o desvio padrão) e o resultado do ponto 1 para octilfenol	98
Figura 2.13 Protótipo de extração. a) visão lateral da nova peça de teflon com stopper e o-ring e tubo de vidro com rosca; b) detalhe da tampa rosqueável	103
Figura 2.14 Protótipo de extração. a) unidade de extração no bloco de aquecimento e acoplada às mangueiras do banho criostático; b) sistema completo da Refrigerated Sorptive Extraction	103
Figura 2.15 Superfície de Resposta do Planejamento Doehlert executado. A desejabilidade é maximizada quando o tempo é maximizado, sendo a refrigeração contínua	106
Figura 2.16 Modos de extração utilizando a técnica Refrigerated Sorptive Extraction: a) Modo Headspace; b) Modo direto	108
Figura 2.17 Superfícies de Resposta para o Planejamento Doehlert. a) Tempo versus Refrigeração; b) Tempo versus aquecimento; c) Refrigeração versus Aquecimento	109
Figura 2.18 Ilustração dos modos de extração utilizando Refrigerated Sorptive Extraction: a) Modo Direto; b) modo Multishot (combinação do modo direto e headspace)	111
Figura 2.19 Diagramas representando a dependência do sinal analítico com o extrato fortificado (passível de correção pela Recuperação) e com o branco fortificado (sem necessidade de correção pela Recuperação, pois já está implícita na curva de calibração)	119
Figura 2.20 Resultado do teste DFFITS para detecção de ponto influente no valor ajustado	121
Figura 2.21 Resultado do teste DFBETAS para detecção de ponto influente no ajuste do coeficiente angular	121
Figura 2.22 Resultado do teste DFFITS para detecção de ponto influente no valor ajustado	122
Figura 2.23 Resultado do teste DFBETAS para detecção de ponto influente no ajuste do coeficiente angular	122
Figura 2.24 Croqui com localização dos pontos de amostragem	129
Figura 2.25 Fotos de alguns pontos de amostragem e procedimento de amostragem	132
Figura 2.26 Fluxograma para o método RSE/GC/FID	133
Figura 2.27 Diagrama de Ishikawa para as principais fontes de incerteza encontradas	134
Figura 2.28 Diagrama de Ishikawa, mostrando a reorganização do Branco fortificado	134
Figura 2.29 Diagrama de Ishikawa, mostrando as subcomponentes da fonte de incerteza Branco fortificado	134
Figura 2.30 Ilustração das diluições da solução padrão de pireno, bem como a propagação da incerteza no branco fortificado	135
Figura 2.31 Diagrama de Ishikawa completo das fontes de incerteza da etapa analítica	136
Figura 2.32 Gráfico de barras para as contribuições das fontes de incerteza frente à incerteza global	142
Figura 2.33 Cartas controle de Shewhart para Naftaleno	145
Figura 2.34 Cartas controle de Shewhart para Octilfenol	145

Figura 2.35 Cartas controle de Shewhart para Nonilfenol _____	146
Figura 2.36 Cartas controle de Shewhart para Benzo[a]pireno _____	146
Figura 2.37 Cartas controle de Diferença para Naftaleno _____	147
Figura 2.38 Cartas controle de Diferença para Octilfenol _____	147
Figura 2.39 Cartas controle de Diferença para Nonilfenol _____	148
Figura 2.40 Cartas controle de Diferença para Benzo[a]pireno _____	148
Figura 3.1 Fluxograma das etapas que influem na qualidade do resultado final da análise _____	157

Lista de Tabelas

Tabela 1.1 Definições mais utilizadas referente ao termo Limite de Detecção e Limite de Quatificação _____	35
Tabela 1.2 Matriz de fatores e combinação de níveis e suas respectivas respostas para o teste de Youden _____	38
Tabela 1.3 Matriz de fatores e combinação de níveis e suas respectivas respostas para o planejamento Plackett-Burman _____	40
Tabela 1.4 Valores para os fatores D de cálculo dos limites da carta de amplitude _____	66
Tabela 1.5 Fator A2 em função do número de replicatas de cada amostra _____	67
Tabela 2.1 Condições fixadas de extração por Refrigerated Sorptive Extraction _____	91
Tabela 2.2 Limites para potabilidade definidos pela portaria MS 2914 (BRASIL, 2011) _____	92
Tabela 2.3 Parâmetros do método cromatográfico desenvolvido para dessorção térmica no injetor _____	92
Tabela 2.4 Programa de Temperatura do Forno (tempo total da corrida cromatográfica: 62 min) _____	92
Tabela 2.5 Áreas do fortificado (50 µg L ⁻¹ para HPAs e alquilfenóis e 2000 µg L ⁻¹ para BTEX) e do branco e a porcentagem entre as áreas _____	95
Tabela 2.6 Dados para a triplicata do branco _____	96
Tabela 2.7 Dados para a triplicata do ponto 1 (0,5 µg L ⁻¹ para HPAs e alquilfenóis e 20 µg L ⁻¹ para BTEX) _____	97
Tabela 2.8 Teste F e teste t para as 7 replicatas (triplicata antiga de 1 a 3 e quadruplicata nova de 4 a 7) _____	100
Tabela 2.9 Teste F e teste t para as 7 replicatas (quadruplicata de 4 a 7 e nova triplicata de 8 a 10) _____	101
Tabela 2.10 Resumo dos resultados para detecção dos compostos _____	102
Tabela 2.11 Matriz Doehlert: fatores e seus respectivos níveis utilizados no Planejamento Doehlert de 2 fatores _____	105
Tabela 2.12 Resultados obtidos para o ensaio de Veracidade (utilizando como indicador da Recuperação do método) _____	107
Tabela 2.13 Matriz Doehlert: fatores e seus respectivos níveis utilizados para o Planejamento de 3 fatores. _____	108
Tabela 2.14 Comparação da Exatidão (tomado como indicador a Recuperação) entre os modos de extração Direto e Headspace _____	110
Tabela 2.15 Comparação da Exatidão (indicador de Recuperação) entre os três modos de extração utilizando a técnica Refrigerated Sorptive Extraction: Headspace (HS-RSE), Direto (DI-RSE) e Multishot (HS-DI-RSE) _____	112
Tabela 2.16 Resultado para Seletividade do método. Os compostos foram fortificados a 0,5 µg L ⁻¹ para HPAs e 3 µg L ⁻¹ para BTEX, com as seguintes exceções: benzeno (9 µg L ⁻¹); fluoreno e octilfenol (1,5 µg L ⁻¹); nonilfenol, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno e benzo[g,h,i]perileno (2,5 µg L ⁻¹). Resultados são médias de triplicatas. _____	113
Tabela 2.17 Resultado para Precisão do método. Concentração de: BTEX (baixa: 15 µg L ⁻¹ ; alta: 39 µg L ⁻¹); fenantreno e criseno (baixa: 1,5 µg L ⁻¹ ; alta: 5,5 µg L ⁻¹); nonilfenol, pireno,	

benzo[b]fluoranteno, benzo[a]pireno e benzo[g,h,i]perileno (baixa: 2,5 µg L ⁻¹ ; alta: 6,5 µg L ⁻¹); demais (baixa: 0,5 µg L ⁻¹ ; alta: 4,5 µg L ⁻¹)	115
Tabela 2.18 Resultado para Veracidade Exatidão do método. Concentração de fenantreno e criseno (baixa: 1,5 µg L ⁻¹ ; alta: 5,5 µg L ⁻¹); nonilfenol, pireno, benzo[b]fluoranteno, benzo[a]pireno e benzo[g,h,i]perileno (baixa: 2,5 µg L ⁻¹ ; alta: 6,5 µg L ⁻¹); demais (baixa: 0,5 µg L ⁻¹ ; alta: 4,5 µg L ⁻¹)	118
Tabela 2.19 Testes de Grubbs e Bonferroni para outliers. P-valor > 0,05 indica que a observação é um outlier.	120
Tabela 2.20 Testes de Grubbs e Bonferroni para outliers. P-valor > 0,05 indica que a observação é um outlier.	123
Tabela 2.21 Testes de Breusch-Pagan, Goldfeld-Quandt, Brown-Forsythe e Cochran, para observação de homocedasticidade dos dados. P-valor > 0,05 indica que os dados apresentam homocedasticidade	123
Tabela 2.22 Tabela ANOVA e teste de Falta de Ajuste. Comparação entre concentração e resíduos: p-valor > 0,05 indica que os dados não são proporcionais à concentração. Comparação entre Falta de Ajuste e Erro Puro: p-valor > 0,05 indica que não há falta de ajuste	124
Tabela 2.23 Estimativa do modelo para coeficiente linear (intercepto) e coeficiente angular (Concentração). p-valor > 0,05 indica não significância estatística para utilizar o preditor.	124
Tabela 2.24 Resultado de incerteza expandida (k=2) da curva analítica para o ponto central da mesma	124
Tabela 2.25 Resultados para Limites de Detecção e Quantificação. O MDL confirmado foi feito através da injeção de concentração até se obter repetibilidade abaixo de 20%.	126
Tabela 2.26 Parâmetros escolhidos para avaliação da Robustez do método	126
Tabela 2.27 Matriz do planejamento Plackett-Burman de Robustez	127
Tabela 2.28 Avaliação da significância dos efeitos em comparação com Ecritico . O planejamento permite a observação do intervalo de variação não significativa	127
Tabela 2.29 Resultados finais da etapa de Validação do Método	128
Tabela 2.30 Estudos trazendo análises dos compostos de interesse em outras regiões do país	131
Tabela 2.31 Resultados do cálculo de incerteza para balança analítica e micropipetas	137
Tabela 2.32 Resultados do cálculo de incerteza para os analitos	142

Lista de Siglas

ANOVA *Analysis of Variance* (Análise de Variância)

AQAC *Analytical Quality Assurance Cycle*

BIPM *Bureau International des Poids et Mesures*

BPL Boas Práticas de Laboratório

BTEX Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xilenos

C Concentração

CGCRE Coordenação Geral de Acreditação

CV Coeficiente de Variação

D Desejabilidade Global

DAD *Diode Array Detector* (Detector de Arranjo de Diodos)

d_i Desejabilidade

DI Modo direto

DICLA Divisão de Acreditação de Laboratórios

DOQ Documento Orientativo

EDC *Endocrine Disrupting Chemicals* (Compostos Disruptores Endócrinos)

EPA *Environmental Protection Agency* (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos)

ETEs Estações de Tratamento de Esgoto

EURAMET *European Association of National Metrology Institutes* (Associação Europeia dos Institutos Metrológicos Nacionais)

FID *Flame Ionization Detector* (Detector de Ionização em Chama)

GC Cromatógrafo a Gás

HPAs Hidrocarbonetos poliaromáticos

HPLC *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

HS Modo *Headspace*

IDL *Instrumental Detection Limit* (Limite Instrumental de Detecção)

IEC *International Electrotechnical Commission* (Comissão Eletrotécnica Internacional)

INMETRO Instituto Nacional de Metrologia e Qualidade Industrial

IQSC Instituto de Química de São Carlos

ISO *International Organization for Standardization* (Organização Internacional de Padronização)

k Fator de Expansão

$K_{o/w}$ Coeficiente de Partição Octanol/Água

LC/MS/MS Cromatografia Líquida com Detector de Espectrometria de Massas em modo Tandem

LOD *Limit of Detection* (Limite de Detecção)

LOQ *Limit of Quantification* (Limite de Quantificação)

MDL *Method Detection Limit* (Limite de Detecção do Método)

MIPs *Molecularly Imprinted Polymers* (Polímeros Impressos Molecularmente)

MRC Material de Referência Certificado

MS *Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massas)

NBR Norma Brasileira

NIT Norma Interna Técnica

P&D Pesquisa e Desenvolvimento

PDMS Polidimetilsiloxano

POP Procedimento Operacional Padrão

RBC Rede Brasileira de Calibração

RSD *Relative Standard Deviation* (Desvio Padrão Relativo)

RSE *Refrigerated Sorptive Extraction* (Extração Sortiva Refrigerada)

S/N *Signal to Noise Ratio* (Razão Sinal/Ruído)

SBSE *Stir Bar Sorptive Extraction* (Extração Sortiva por Barra de Agitação)

SD *Standard Deviation* (Desvio-padrão)

SEAQUA Sistema Estadual de Administração da Qualidade Ambiental, Proteção, Controle e Desenvolvimento do Meio Ambiente e Uso Adequado dos Recursos Naturais

SGQ Sistema de Gestão da Qualidade

SI Sistema Internacional de Medidas

SPE *Solid Phase Extraction* (Extração em Fase Sólida)

SPME *Solid Phase Microextraction* (Microextração em Fase Sólida)

TA Temperatura Ambiente

T_g Temperatura de Transição Vítrea

U Incerteza Expandida

u Incerteza Padrão

VIM Vocabulário Internacional de Metrologia

VOCs *Volatile Organic Contaminants* (Contaminantes Orgânicos Voláteis)

Sumário

Prefácio.....	20
Capítulo 1: Ferramentas da Qualidade, Rastreabilidade Metrológica e a Falta de Reprodutibilidade de Resultados Científicos	21
1.1. Introdução.....	21
1.2. Validação de Métodos	21
1.2.1. <i>Seletividade e Efeito matriz</i>	22
1.2.2. <i>Precisão</i>	24
1.2.3. <i>Exatidão, Veracidade e Recuperação</i>	27
1.2.4. <i>Curva de Calibração/Linearidade</i>	30
1.2.5. <i>Limites de Detecção e Quantificação</i>	34
1.2.6. <i>Robustez</i>	37
1.3. Cálculo de Incerteza.....	41
1.3.1. <i>Incerteza Analítica</i>	44
1.3.1.1. Especificar o mensurando	44
1.3.1.2. Identificar as fontes de incerteza	45
1.3.1.3. Quantificar os componentes da incerteza	50
1.3.1.4. Cálculo da incerteza padrão combinada e expandida.....	54
1.3.2. <i>Cálculo de Incerteza da Amostragem</i>	55
1.3.2.1. Método de divisão simples (Single Split).....	57
1.3.2.2. <i>Método de divisão dupla (Double Split)</i>	58
1.4. Controle de Qualidade Intralaboratorial	61
1.4.1. <i>Shewhart</i>	63
1.4.2. <i>Carta de amplitude (R-charts)</i>	64
1.4.3. <i>Carta de média por amplitude</i>	67
1.4.4. <i>Carta de diferença (Difference Chart)</i>	68
1.4.5. <i>Carta de Valor alvo (Target Value Chart)</i>	69
1.5. Analytical Quality Assurance Cycle	69
1.6. Rastreabilidade Metrológica.....	70
1.7. Considerações finais	73
1.8. Referências Bibliográficas	73

Capítulo 2: Aperfeiçoamento de técnica de preparo de amostras e aplicação de conceitos de Garantia da Qualidade	76
2.1. Introdução	76
2.1.1. Recursos hídricos e paisagem	77
2.1.2. Compostos de Interesse	77
2.1.3. Técnicas de preparo de amostras	80
2.1.4. Amostragem.....	83
2.1.5. Sistemas de Gestão da Qualidade	84
2.2. Objetivos.....	85
2.3. Materiais e métodos	85
2.3.1. Reagentes e Materiais	85
2.3.2. Equipamentos	86
2.3.3. Metodologia	87
2.3.3.1. Amostragem.....	87
2.3.3.2. Confeção da barra sortiva	87
2.4. Resultados e Discussão	87
2.4.1. Barra sortiva com revestimento de PDMS.....	87
2.4.2. Montagem do protótipo para extração por RSE.....	88
2.4.3. Planejamento experimental	103
2.4.4. Validação do método	112
2.4.4.1. Seletividade	112
2.4.4.2. Precisão	114
2.4.4.3. Recuperação.....	116
2.4.4.4. Curva de calibração e Linearidade	119
2.4.4.5. Limites de Detecção	125
2.4.4.6. Robustez	125
2.4.4.7. Finalização da etapa de Validação	127
2.4.5. Amostragem.....	129
2.4.6. Cálculo de Incerteza	133
2.4.6.1. Incerteza Analítica.....	133
2.4.6.2. Incerteza da Amostragem	143
2.4.7. Controle de Qualidade Intralaboratorial	143
2.4.8. Analytical Quality Assurance Cycle	149

2.5.	Conclusão.....	149
2.6.	Referências Bibliográficas	150
Capítulo 3 Sistemas de Gestão da Qualidade e Rastreabilidade Documental		156
3.1.	Considerações iniciais	156
3.2.	Sistemas de Gestão de Qualidade para Laboratórios.....	156
3.2.1.	<i>Manual da Qualidade</i>	158
3.2.2.	<i>Procedimentos Operacionais Padrão</i>	159
3.2.3.	<i>Registros</i>	159
3.3.	Rastreabilidade Documental	160
3.3.1.	<i>Caderno de Laboratório</i>	160
3.4.	Considerações finais	160
3.5.	Referências Bibliográficas	161
Apêndices		162

Prefácio

Um dos grandes entraves na pesquisa feita em universidades é a dificuldade em reproduzir resultados contidos em dissertações, teses, artigos e demais textos científicos. Por essa razão existe uma necessidade crescente em introduzir conceitos e práticas nos laboratórios de P&D que reflitam esta demanda. A reprodutibilidade de um resultado está intimamente ligada à Rastreabilidade Metrológica, que fornece uma referência que cada medição utiliza para uma correta comparação. Por sua vez, a Rastreabilidade Metrológica é alcançada através da Garantia e Controle de Qualidade que devem ser aplicados antes, durante e após as medições. Para suprir todos esses conceitos, desenvolveu-se uma discussão profunda sobre esses conceitos no Capítulo 1 desse trabalho. Este Capítulo é para o leitor que ainda não conhece as ferramentas da qualidade que permeiam a Rastreabilidade Metrológica.

O Capítulo 2 trata do desenvolvimento de um protótipo de extração miniaturizado, chamado *Refrigerated Sorptive Extraction*, e sua aplicação na determinação de contaminantes voláteis e semivoláteis em microbacias da região de São Luiz do Paraitinga e Cunha, extremo leste do Estado de São Paulo. Neste capítulo se encontra a aplicação dos conceitos de Garantia e Controle da Qualidade, discutidos no Capítulo 1. Contudo, a aplicação de todas estas ferramentas não se mostrou eficaz na garantia da qualidade total, devido a um fato interessante que ocorreu com uma carta-controle, ferramenta do Controle de Qualidade. No mais, este capítulo é para o leitor que busca observar como foi a aplicação das ferramentas.

Por fim, o Capítulo 3 traz uma alternativa para alcançar a garantia da qualidade de forma holística. Os três capítulos dessa tese em conjunto trazem um eficaz meio de aumentar a competência de laboratórios de P&D universitários em relatar dados confiáveis, rastreáveis e, por consequência, reprodutíveis, corroborando para um estreitamento entre empresas e universidades.

Capítulo 1: Ferramentas da Qualidade, Rastreabilidade Metrológica e a Falta de Reprodutibilidade de Resultados Científicos

1.1. Introdução

A Ciência é um universo de conhecimento gerado por partes pequenas, desenvolvidas por cada pesquisador. Muitas vezes, para um avanço numa área específica, é necessário reproduzir resultados de outros pesquisadores para apoiar um novo conceito ou fazer um teste de hipóteses.

O problema está quando não é possível reproduzir esses resultados. Porque isso ocorre? Popularmente, entre os estudantes de pós-graduação, o termo “pulo-do-gato” é frequente para explicar essa falta de reprodutibilidade de dados. Esse termo popular se refere à omissão de certos fatos do ensaio que impedem um outro pesquisador de refazer o experimento e conseguir resultados comparáveis.

No entanto, a despeito se essa omissão ocorre ou não, existe uma explicação científica, no campo da Metrologia, de porque algumas vezes não se consegue reproduzir resultados contidos em textos científicos. Para estudar essa questão, na área da Química Analítica, é preciso aprofundar conceitos de Garantia e Controle de Qualidade como: Validação, Incerteza de Medição, Controle de Qualidade e Rastreabilidade Metrológica.

1.2. Validação de Métodos

Validação é uma “verificação na qual os requisitos especificados são adequados para um uso pretendido” (Vocabulário Internacional de Metrologia, 2012). Quando aplicado o conceito a um método analítico, se refere a busca de informações que comprovem que o método é adequado para o que se pretende utilizar.

A validação já é muito utilizada no meio acadêmico e dispensa apresentações. Quanto aos parâmetros que se estudam na validação, podem-se destacar: seletividade e efeito matriz, precisão, exatidão, veracidade e recuperação, linearidade da curva de calibração, limites de detecção e quantificação e robustez.

1.2.1. Seletividade e Efeito matriz

Segundo o VIM (Vocabulário Internacional de Metrologia, 2012), Seletividade é uma “propriedade dum sistema de medição, utilizado com um procedimento de medição especificado, segundo a qual o sistema fornece valores medidos para um ou vários mensurandos, tais que os valores de cada mensurando sejam independentes uns dos outros ou de outras grandezas associadas ao fenômeno, corpo ou substância em estudo”. É a habilidade de um método em determinar inequivocamente um analito ou um grupo deles, sem interferência recíproca entre analitos, na presença de outros componentes em uma amostra real (FUNK; DAMMANN; DONNEVERT, 2007; KONIECZKA; NAMIESNIK, 2009; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002)

O efeito matriz é definido como o “efeito combinado de todos os componentes da amostra, outros que não o analito, na medida da quantidade. Se um componente específico pode ser identificado como causador de um efeito então isto se refere a uma interferência” (INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY, 2014). O efeito matriz leva em conta apenas a interferência da amostra, sem avaliar que os próprios analitos podem interferir na detecção mutuamente. Por essa razão, sempre se utilizará o termo seletividade para avaliar as interferências no método.

É muito comum utilizar o termo especificidade como sinônimo de seletividade. Especificidade é a “habilidade de um método em registrar unicamente os analitos de interesse em todas as formas relevantes, pelo que outros componentes ou características da amostra não influenciem o resultado analítico” (FUNK; DAMMANN; DONNEVERT, 2007). Por essa definição, é correto afirmar que um método só é específico se puder registrar apenas o(s) analito(s) de interesse e ainda em todas as formas relevantes (por exemplo, todas as espécies de Fe presentes na água em determinado pH). A maioria dos métodos não são específicos para detectar apenas os analitos, sendo que podem detectar também os interferentes e é por isso mesmo que se avalia a seletividade do método. Por essa razão é errôneo utilizar os dois termos como sinônimos.

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento de um método e sua validação. É um parâmetro importante porque os interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal e a magnitude desse efeito pode influenciar a medição. Essa redução ou aumento do sinal pode causar erros do tipo falso-negativo e falso-positivo, comprometendo o resultado da análise (COORDENAÇÃO GERAL DE ACREDITAÇÃO, 2011; MARCELO RIBANI et al., 2004; UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2006).

A seletividade é mais prejudicada quando: utilizam-se amostras desconhecidas (casos específicos em que não se sabe o que é a amostra); a amostra é muito complexa; a similaridade entre os componentes da amostra é alta; o número de analitos é alto; a concentração dos analitos a determinar é pequena e maior semelhança entre os analitos. Dois meios podem ser aplicados para aumentar a seletividade: removendo os interferentes ou isolando os analitos por um método de preparo de amostras (KONIECZKA; NAMIESNIK, 2009; UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2006).

Do ponto de vista prático, um método é seletivo quando é possível diferenciar os sinais da medida (a exemplo da separação cromatográfica) e associar a uma propriedade de um dado analito, a exemplo da concentração (KONIECZKA; NAMIESNIK, 2009). Em cromatografia, as interferências ocorrem em sua maioria por coeluição dos picos e degradação do analito no injetor (cromatografia gasosa) (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2006).

As formas de avaliação da seletividade envolvem experimentos com padrões analíticos e materiais de referência, amostras com e sem analitos (fortificado e branco), e identificação dos analitos na presença de possíveis interferentes, que são adicionados à amostra (COORDENAÇÃO GERAL DE ACREDITAÇÃO, 2011).

A avaliação dos interferentes pode ser feita com um branco de amostra em comparação com o branco de matriz com fortificação dos analitos de interesse, sendo que não deve haver coeluição dos interferentes com os analito (RIBANI et al., 2004; UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2006). Em certos tipos de análises, por exemplo alimentos, em que a matriz é muito complexa, pode haver coeluição dos interferentes a um limite de que o pico do interferente seja 30 % do pico do analito (EUROPEAN COMMISSION HEALTH; CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL, 2014).

O uso de detectores como Espectrometria de Massas (MS) e arranjo de diodos (DAD), que podem comparar o espectro do pico obtido com o espectro do composto puro, também são uma forma de avaliar a seletividade (RIBANI et al., 2004; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2014).

O método da adição padrão é outra forma de avaliar a seletividade, e é utilizado quando não se pode obter o branco de amostra (matriz isenta da substância de interesse). São feitas duas curvas analíticas, uma com adição da substância de interesse na amostra e outra no solvente (curva padrão). Se as curvas forem paralelas, não há interferência da matriz e o método pode ser considerado seletivo (RIBANI et al., 2004).

1.2.2. Precisão

Precisão de medição é o “grau de concordância entre indicações ou valores medidos, obtidos por medições repetidas, no mesmo objeto ou em objetos similares, sob condições especificadas”. Geralmente é expressa numericamente pelo desvio-padrão, variância ou coeficiente de variação (Vocabulário Internacional de Metrologia, 2012). A *Precisão* é associada aos erros aleatórios e é uma medida da dispersão dos valores em torno da média (KONIECZKA; NAMIESNIK, 2009).

Repetibilidade, Reprodutibilidade e Precisão Intermediária são condições para calcular a Precisão do método. Repetibilidade é definida como “condição de medição num conjunto de condições, as quais incluem o mesmo procedimento de medição, os mesmos operadores, o mesmo sistema de medição, as mesmas condições de operação e o mesmo local, assim como medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares durante um curto período de tempo” (Vocabulário Internacional de Metrologia, 2012). Assim, todos os parâmetros devem ser mantidos e o tempo de execução das replicatas deve ser minimizado (intra-dias, se possível).

Precisão Intermediária é definida como a “condição de medição num conjunto de condições, as quais compreendem o mesmo procedimento de medição, o mesmo local e medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares, ao longo dum período extenso de tempo, mas pode incluir outras condições submetidas a mudanças” (Vocabulário Internacional de Metrologia, 2012). Se todos os parâmetros foram mantidos salvo o tempo de execução, sendo em dias diferentes (inter-dias), já se tem a condição de Precisão Intermediária. Mas é possível alterar outros parâmetros, permitindo que outros permaneçam inalterados.

Reprodutibilidade é a “condição de medição num conjunto de condições, as quais incluem diferentes locais, diferentes operadores, diferentes sistemas de medição e medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares” (Vocabulário Internacional de Metrologia, 2012). Na condição de Reprodutibilidade apenas a matriz e os compostos são mantidos e todos os outros parâmetros são alterados.

A mudança da matriz na determinação do composto não é válida para a condição de Reprodutibilidade de cálculo da Precisão. Por definição, o método deve ser aplicado a um ou mais compostos e a uma matriz específicos (HARVEY, 2000). Mudança na matriz geralmente implica na criação de outro método. Por essa mesma razão, quando se trata de laboratórios acreditados segundo a norma ISO/IEC 17025:2005, a alteração de *escopo*, em decorrência da inserção de uma matriz diferente, mesmo que para os mesmos compostos-alvo, precisa passar

por avaliação do organismo acreditador, sendo necessário uma validação para essa nova matriz, cálculo de incerteza e controles de rotina, ou seja, demonstrar competência para executar de forma adequada esse novo *escopo* (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2005).

O escopo é definido como “serviços específicos de avaliação da conformidade para os quais a acreditação é desejada ou foi concedida” (COORDENAÇÃO GERAL DE ACREDITAÇÃO, 2013). Os serviços devem ser detalhados pela área de atividade do ensaio (alimentos e bebidas, meio ambiente), classe do ensaio (ensaios químicos, ensaios mecânicos), descrição do ensaio (analito, técnica e limite de quantificação, se aplicável), produto ensaiado (matriz), bem como a norma ou procedimento utilizado para o ensaio. Por essa razão, a mudança da matriz configura uma alteração de escopo. Por outro lado, existem situações em que alterar a matriz é uma requisição para avaliar a aplicabilidade de métodos que serão publicados como métodos oficiais (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2006).

Avançando para o cálculo, dois guias trazem o cálculo da precisão baseados na análise de duplicatas. O guia da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2006) traz o cálculo baseado na diferença relativa entre duplicatas, e o guia da IUPAC traz a Precisão como a soma de dois desvios-padrão da análise de duplicatas em condições de Repetibilidade e Precisão Intermediária (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). Por tratar de análises de duplicatas, esses cálculos são melhores aplicados para cálculo da Precisão em amostras de controle de rotina e utilizar os dados para a construção de cartas-controle. Isso será abordado na seção *1.4 Controle de Qualidade Intralaboratorial*.

Para a Validação de Métodos (diga-se, *inicial*), uma estimativa de desvio-padrão com maior número de replicatas é requerida para que uma maior aproximação da distribuição normal seja alcançada. O *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (WASHINGTON: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION, 2012) solicita análise de no mínimo sete (7) e no máximo dez (10) replicatas em duas concentrações diferentes (baixa, que pode ser imediatamente acima do limite de quantificação do método e uma alta, que esteja dentro da faixa linear da curva analítica). A razão para as duas concentrações é a de que nos extremos da faixa de trabalho, os desvios são maiores, principalmente se a faixa de trabalho na curva for grande (maior que duas ordens de grandeza) e nisso se pode avaliar o quanto a Precisão varia com a concentração. O resultado é calculado em termos do desvio-padrão. O limite definido é tal que o desvio-padrão relativo (coeficiente de variação) seja menor que 20%.

Konieczka e Namiesnik (2009) trazem três formas de calcular: i) fazendo nove medidas, sendo 3 pontos independentes na curva, em triplicata; ii) seis medidas de um único ponto que seja próximo à concentração real do composto e, iii) seis medidas em dois ou três níveis de concentração em *matrizes diferentes*. A primeira forma traz um cálculo para três pontos da curva, feitos em triplicata. A diferença de variância entre eles não será significativa, mas como um ponto central será incluído, a dispersão será amortizada por esse ponto, onde a variação é menor. A segunda forma parece mais plausível e em concordância com o *Standard Methods* no quesito das replicatas, mas difere na requisição de apenas uma concentração. A terceira traz a mudança de matriz e como já comentado anteriormente, não é o objetivo da validação de métodos para a finalidade desse texto.

Na questão do tamanho da amostra (número de replicatas) pode-se adotar um número fixo, definido por um guia de validação da área ou protocolos bem estabelecidos como o *Standard Methods*, mas também é possível calcular a quantidade de replicatas necessárias para estimar a um nível requerido de Precisão. Conforme descrito em Bruns, Scarminio e Barros Neto (2003) e no guia da Agência Nacional de Águas e Companhia Ambiental do Estado De São Paulo (2011), se houver dados preliminares de utilização do método dos quais possa ser extraído o desvio-padrão (ou coeficiente de variação), e houver um valor de tolerância para a Precisão, é possível calcular o número mínimo de replicatas a serem executadas para estimar a distribuição normal, segundo a Equação 1.1:

$$N \geq \frac{t \cdot s}{L} \quad \text{Equação 1.1}$$

Sendo N , o número de amostras (replicatas) que será calculado; s , o desvio-padrão (pode ser substituído pelo coeficiente de variação, mas o resultado estará em unidades de porcentagem) de dados preliminares do método; t , o valor do t de Student para $N-1$ graus de liberdade utilizados para estimar o desvio-padrão e L , a tolerância para o valor de precisão. Se não houver a informação de quantos graus de liberdade foram utilizados para estimar o desvio-padrão, pode-se proceder da seguinte forma: utiliza-se t como 1,96 (valor de t de Student para um grau de liberdade infinito, t_{∞}) e calcula-se o número de replicatas inicial (N_{inicial}). Então refaz-se o cálculo para N trocando-se t_{∞} por $t_{(N_{\text{inicial}}-1)}$.

1.2.3. Exatidão, Veracidade e Recuperação

Métodos que envolvem a etapa de Preparo de Amostras trazem a *Exatidão* (do inglês *Accuracy*) como um sinônimo da *Recuperação*, isso porque são calculados da mesma forma. Além disso, dependendo da forma como é calculada, pode-se ainda estimar a *Veracidade* da medição (do inglês, *Trueness*), que quando utilizada como sinônimo de *Exatidão*, incorre-se num erro de definição no campo da metrologia e acarreta um equívoco na interpretação dos erros (aleatórios e sistemáticos) envolvidos.

Segundo o Vocabulário Internacional de Metrologia (2012), *Exatidão* é o “grau de concordância entre um valor medido e um valor verdadeiro dum mensurando”. Já *Veracidade* é “Grau de concordância entre a média dum número infinito de valores medidos repetidos e um valor de referência”.

A *Recuperação* é “um termo usado em Química Analítica e no Preparo de Amostras que denota a fração da quantidade total de uma substância recuperada seguindo um procedimento químico”(INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY, 2014).

Enquanto a *Exatidão* é a comparação do valor de uma única medida com o valor de referência, *Veracidade* é a comparação da média amostral de replicatas frente ao valor de referência. Mais do que apenas uma confusão de definição, a *Exatidão* é a soma dos dois tipos de erros fundamentais: aleatórios e sistemáticos, enquanto a *Veracidade* é influenciada principalmente por erros sistemáticos (KONIECZKA; NAMIESNIK, 2009).

Quando se compara o valor de referência com o valor de uma única medida, os principais tipos de erros possíveis (aleatórios e sistemáticos) são os responsáveis pela diferença entre o valor medido e o valor de referência. Quando se utiliza a média de replicatas para comparar com o valor de referência, esse valor de média é resultado da distribuição normal dos resultados das replicatas (é o valor tido como mais provável de ser o “verdadeiro” para o *mensurando* nesse tipo de distribuição). Sendo assim, os erros aleatórios envolvidos na determinação da média já foram estimados pela própria distribuição normal (a *Precisão* que trata principalmente de erros aleatórios é estimada através do desvio-padrão amostral, consequência direta da distribuição das medidas). Sendo assim, a diferença do valor da média em relação ao valor de referência trata, principalmente, de erros sistemáticos (*Veracidade*).

Assim sendo, se a *Recuperação* é calculada utilizando-se a média de replicatas para comparação com o valor de referência, é um erro afirmar que é um sinônimo de *Exatidão*. O correto será afirmar que é um sinônimo da *Veracidade*.

Existem três formas principais de se obter o valor de referência para comparação com as medições: através de Materiais de Referência Certificados (MRCs), a utilização de um método oficial (método de referência) ou a utilização de matriz fortificada (COORDENAÇÃO GERAL DE ACREDITAÇÃO, 2011; KONIECZKA; NAMIESNIK, 2009; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

O MRC é um “material de referência acompanhado duma documentação emitida por uma entidade reconhecida, a qual fornece um ou mais valores de propriedades especificadas com as incertezas e as rastreabilidades associadas, utilizando procedimentos válidos” (Vocabulário Internacional de Metrologia, 2012). Assim, analisando-se replicatas desse material, pode-se comparar a média das replicatas com o valor de concentração descrito no certificado, que também é uma média (KONIECZKA; NAMIESNIK, 2009; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

O método oficial é utilizado para gerar o valor de referência para comparação com o valor gerado pelo método em validação. É muito importante checar a homogeneidade da variância e a normalidade dos resultados (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

A utilização de amostra fortificada com concentração conhecida funciona como o MRC, levando em conta que é necessário estimar a incerteza da fortificação (considerando a aferição de massa do padrão, diluições, transferências etc.) (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). Mais detalhes do cálculo de incerteza serão explanados na seção 1.3 *Cálculo de Incerteza*.

Lembrando que estimar a *Exatidão* se faz pela comparação de um valor de medição e para a *Veracidade*, a média de replicatas, todos os cálculos e condições das estimativas serão descritas para a *Veracidade*, sendo que para calcular a *Exatidão*, basta utilizar um valor absoluto de uma dessas replicatas.

Quando se utiliza MRC, podem ser utilizadas três formas de cálculo da *Exatidão*: erro relativo, índice z (z-score) e erro normalizado. O erro relativo é o mais aplicado e de fácil entendimento (Equação 1.2). O erro normalizado é utilizado quando se calcula a incerteza expandida do resultado (U) e o valor de referência não se insere dentro do intervalo coberto por U . Pode ser que o intervalo (U) esteja subestimado. Então, faz-se uma normalização do erro (Equação 1.3). O índice z (z-score) é mais utilizado em testes de proficiência e comparações interlaboratoriais (Equação 1.4). A norma ISO/IEC 17025:2005 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2005) exige que laboratórios acreditados participem periodicamente de ensaios de proficiência e com isso pode-se aproveitar esses resultados para o cálculo da *Veracidade* (e/ou *Exatidão*) (COORDENAÇÃO GERAL DE ACREDITAÇÃO, 2011).

$$\text{Erro Relativo (ER)} = \frac{(X_{lab} - X_v)}{X_v} \times 100 \quad \text{Equação 1.2}$$

$$\text{Erro Normalizado (EN)} = \frac{(X_{lab} - X_v)}{\sqrt{U_{lab}^2 + U_{ref}^2}} \quad \text{Equação 1.3}$$

$$z - score (z) = \frac{(X_{lab} - X_v)}{s} \quad \text{Equação 1.4}$$

Sendo X_{lab} , o valor da média das replicatas; X_v o valor de referência; s o desvio-padrão do teste de proficiência ou do MRC; U_{lab} a incerteza expandida calculada e U_{ref} , a incerteza do valor de referência.

Quando se utiliza o *z-score* e erro normalizado, alguns critérios para aceitação são adotados. Segundo a NBR ISO/IEC 17043:2010, se $|z| \leq 2$, o resultado é satisfatório. Se $2 \leq |z| < 3$, o resultado é questionável e se $|z| \geq 3$, o resultado é insatisfatório. Há implicações para laboratórios acreditados segundo a norma ISO/IEC 17025:2005 para cada critério, mas não será descrito nesse texto, por não ser o objetivo. Para o erro normalizado, se $EN \leq 1$, o resultado é satisfatório (COORDENAÇÃO GERAL DE ACREDITAÇÃO, 2011). No entanto, deve-se observar que uma incerteza do laboratório maximizada (U_{lab}) tende sempre a fazer com que EN seja menor que um, mascarando o resultado.

Konieczka & Namiesnik (2009) trazem a seguinte forma de analisar: dez (10) medidas do MRC e dez (10) medidas do branco da amostra. No segundo caso, o valor corrigido (média do MRC subtraída da média do branco) é comparado com o valor de referência, que é o valor nominal do MRC declarado no certificado, mais sua incerteza (isso considerando que a medida não necessita de uma curva de calibração, ou seja, uma medida direta da grandeza nominal do MRC).

Quando se utiliza a matriz fortificada, o que se faz é um estudo de *Recuperação* do método (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2006). Os valores aceitáveis estão entre 80 e 120%, dependendo da concentração do analito. A Coordenação Geral de Acreditação (2011) também traz o valor de Recuperação corrigido pelo branco, como mostrado para os MRCs. Um fato importante levantado por Thompson, Ellison e Wood (2002) é de que uma boa *Recuperação* em matrizes fortificadas não traduz exatamente

uma boa *Veracidade*. Efeitos de interferentes podem tornar a Recuperação ótima, mas o resultado é um falso-positivo. Todavia, uma Recuperação ruim, geralmente é um indicativo de falta de Veracidade. Por essa razão, deve-se tomar o máximo de cuidado na interpretação da Veracidade/Recuperação nesses casos. O cálculo, levando em conta a utilização da média do branco da matriz para correção, é apresentado na Equação 1.5 (COORDENAÇÃO GERAL DE ACREDITAÇÃO, 2011).

$$Recuperação = \frac{(C_1 - C_2)}{C_3} \times 100 \quad \text{Equação 1.5}$$

Sendo, C_1 a média das replicatas para a concentração da matriz fortificada, C_2 é a média das replicatas do branco da amostra e C_3 , a concentração de fortificação. Todas as referências consultadas fazem alusão a métodos nos quais a medição da concentração é direta. Métodos cromatográficos entre outros, trazem uma medição indireta, na qual a área do pico cromatográfico é correlacionada à concentração do composto. Portanto, é necessário haver um valor de referência para o valor de 100 % de Recuperação. O jeito mais fácil de fazer isso é injetar uma quantidade conhecida do composto (solução padrão, que não necessita de preparo de amostras) no cromatógrafo e fazer da área do pico, o valor de referência para Recuperação 100%.

1.2.4. Curva de Calibração/Linearidade

Segundo o *Vocabulário Internacional de Metrologia*, (2012), *Calibração* é “operação que estabelece, sob condições especificadas, numa primeira etapa, uma relação entre os valores e as incertezas de medição fornecidos por padrões e as indicações correspondentes com as incertezas associadas; numa segunda etapa, utiliza esta informação para estabelecer uma relação visando a obtenção dum resultado de medição a partir duma indicação.”. Ou seja, a calibração é uma associação indireta que se faz entre o valor de uma quantidade e o sinal analítico. *Linearidade* é definida como “o intervalo da faixa de medição de um método analítico em que o sinal analítico tem uma dependência linear com determinada quantidade de *mensurando*” (KONIECZKA; NAMIESNIK, 2009).

A curva de calibração, também segundo o *Vocabulário Internacional de Metrologia* (2012), é uma “expressão da relação entre uma indicação e o valor medido correspondente”, e

trata-se de uma regressão de modelo que melhor se ajusta aos pontos experimentais. Para melhor estimar esse modelo, a Coordenação Geral de Acreditação (2011) recomenda que no mínimo cinco (5) pontos sejam feitos em triplicata. Outros recomendam um mínimo de seis (6) pontos, também realizados em triplicata (KONIECZKA; NAMIESNIK, 2009).

Existem três formas básicas de construir experimentalmente a curva de calibração quando se empregam métodos de preparo de amostras: i) solução-padrão, ii) fortificação do extrato do branco (ou branco da matriz) e iii) fortificação do branco (ou branco da matriz) (COSTA, 2012). O “branco” é a água-reagente (destilada, deionizada, que é isenta dos compostos de interesse) e o branco de amostra é a matriz de interesse, isenta dos compostos do estudo. Em estudos de água superficial, branco de amostra pode ser encontrado nas nascentes dos rios, onde não se espera contaminação, contudo, é necessário comprovar por determinação por metodologia específica.

A curva de solução-padrão é mais fácil de ser executada. Porém, a linearidade que é observada é a do equipamento e não do método. A fortificação do branco (ou do branco da matriz) e posterior processamento pelo método traz a estimativa da linearidade da forma mais realista, mas a interferência da matriz é muito indesejada por causa da variabilidade que causa nos pontos da curva, diminuindo a precisão da regressão. A extração do branco (ou branco da matriz) e posterior fortificação do extrato (no caso de dessorção líquida da fase sortiva) seria o meio termo entre as formas apresentadas, que traz um extrato com presença de interferentes (efeito de matriz), podendo estimar a linearidade do método como um todo. A fortificação do extrato é a melhor opção para obter uma precisão mais adequada da regressão e também estimar a linearidade do método.

Existem várias nuances que permeiam a regressão da curva de calibração. A presença de *outliers* pode prejudicar a linearidade da curva e a heterocedasticidade (heterogeneidade das variâncias entre os pontos de calibração) pode prejudicar o ajuste do modelo e levar a erros na determinação da concentração dos compostos. Por isso, testar os pontos experimentais quanto a esses problemas é de suma importância (COORDENAÇÃO GERAL DE ACREDITAÇÃO, 2011; FUNK; DAMMANN; DONNEVERT, 2007). Observando esses critérios, Costa (2012) desenvolveu um roteiro para desenvolver e avaliar a curva de calibração. Para avaliar a existência de *outliers*, pode-se utilizar o teste de Grubbs e a homocedasticidade (homogeneidade das variâncias) pode ser testada pelo teste de Cochran. Nesse teste a hipótese nula, na qual não há homogeneidade, confirma a heterocedasticidade. A análise de resíduos também pode detectar *outliers* e homocedasticidade.

É possível observar se é realmente necessário utilizar o teste de Grubbs através dos desvios em relação à média da triplicata dos pontos. Se houver desvios muito grandes em um ponto, possivelmente existe um *outlier*. O método visual, construindo um gráfico com os pontos é uma opção para verificar desvios discrepantes. Se não houver, pode-se optar por não fazer o teste, mas é recomendável utilizar um (ou mais) teste(s) estatístico(s) para fundamentar as observações (FUNK; DAMMANN; DONNEVERT, 2007; KONIECZKA; NAMIESNIK, 2009). O teste mostra qual ponto deve ser excluído, mas não se recomenda excluir mais de um ponto. Se houver mais de dois pontos sendo detectados como *outliers*, recomenda-se fazer uma análise crítica da execução dos experimentos, pois erros grosseiros, que precisam ser corrigidos, podem estar ocorrendo.

Já o teste de homocedasticidade é sempre recomendável porque, se o resultado for heterocedástico, há algumas alternativas a serem seguidas: i) diminuir a faixa da curva de calibração (fazendo outros pontos) e fazer o teste novamente (buscando a homocedasticidade); ii) utilizar o método de regressão ponderada ou; iii) utilizar várias curvas com faixas menores para cobrir toda a faixa de concentrações desejada (método multi-curvas) (FUNK; DAMMANN; DONNEVERT, 2007).

É comum que curvas de calibração apresentem heterocedasticidade, principalmente quando a faixa de calibração supera duas ordens de grandeza (por exemplo indo de $1 \mu\text{g l}^{-1}$ a $1000 \mu\text{g l}^{-1}$). Quando a faixa da curva fica próxima ao limite superior da faixa linear do equipamento, é esperada uma variância maior para os valores mais altos de concentração pois podem ocorrer desvios grandes nessas condições (THOMPSON, 2007). Quando se busca a detecção de analitos a níveis traço, que geralmente se faz próxima ao limite de detecção do método, pela mesma razão a precisão fica prejudicada. Ou seja, para baixas concentrações, a variância também será alta, como ditado pela equação de Horwitz (trompete de Horwitz) (THOMPSON, 2004).

No entanto, um resultado homocedástico nesse caso não é um resultado excelente por si só, pois pode ser que em todos os pontos a variância seja muito alta e homogênea (o que resulta em homocedasticidade), mas o erro na determinação da concentração é maximizado pela variância excessiva. Costa (2012), defende que nesse caso deve ser feita a utilização do cálculo de incerteza da curva para embutir essa alta variância (se existir) no intervalo de confiança do resultado.

Funk, Dammann e Donnevert (2007) propõem uma outra forma de testar a homocedasticidade: em dois pontos da curva (mais baixo e mais alto) faz-se 10 replicatas em

cada ponto. Através de um teste t, avalia-se os resíduos entre os valores medidos e o valor calculado a partir da equação de regressão.

Até o momento, sabe-se se existem ou não *outliers* e se a curva possui resultados homocedásticos ou não. Se a curva for homocedástica, pode-se aplicar a regressão linear simples. Se não, existem as três opções comentadas anteriormente, que podem ser seguidas.

A partir de agora, depois de feita a regressão linear, é necessário avaliar se o modelo (curva) se ajusta bem aos resultados experimentais. Pode-se utilizar o coeficiente de determinação (R^2), análise de resíduos e Análise de Variância (ANOVA).

A utilização do coeficiente de determinação só é recomendada em curvas feitas com solução-padrão, ou seja, o padrão dissolvido em solvente (KONIECZKA; NAMIESNIK, 2009). A análise de resíduos se faz visualmente, construindo o gráfico de resíduos, que são os desvios dos valores experimentais em relação à curva que foi traçada. A distribuição aleatória dos resíduos revela um bom ajuste e qualquer tendência em relação a curva, mostra falta de ajuste (FUNK; DAMMANN; DONNEVERT, 2007). A ANOVA é mais aplicada e mais completa em relação aos primeiros métodos descritos. Por ela é possível observar a falta de ajuste via teste F (KONIECZKA; NAMIESNIK, 2009).

Por fim, pode-se utilizar o cálculo de incerteza. Esse método não mostra se o ajuste é bom ou não, mas frente a um valor de precisão requerido (valor de tolerância), pode-se rejeitar o uso da curva por estar fora desse intervalo de confiança (COSTA, 2012).

Geralmente, é a união de vários métodos que tornam a avaliação mais detalhada e com maior possibilidade de acerto. Se o método de avaliação mostrar que o ajuste do modelo não é bom, pode-se usar outros tipos de curva para regressão (polinomial, por exemplo); pode-se também diminuir a faixa de calibração, caso seja um extremo que esteja desviando. Após essas adequações, os testes para o ajuste da curva são refeitos. A Figura 1.1 ilustra o procedimento a ser seguido para avaliação da curva de calibração.

Figura 1.1 Roteiro para execução da regressão da curva de calibração e avaliação do ajuste

Fonte: autoria própria.

1.2.5. Limites de Detecção e Quantificação

O termo “Limite de Detecção” é alvo de desentendimento. Isso porque há vários conceitos e diferentes definições, o que causa confusão no entendimento. Até o modo de estimar os limites se encontra em discussão (se deve ser feito em condições de repetibilidade ou outros) e como se usam poucas amostras para a estimativa, está sujeito a uma grande variabilidade, inclusive pelos erros sistemáticos. E por fim, todos os métodos de estimativa dos limites de detecção assumem que a distribuição dos dados é normal, o que em baixas concentrações, pode não ser a realidade (COORDENAÇÃO GERAL DE ACREDITAÇÃO, 2011; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Será utilizada a definição do Vocabulário Internacional de Metrologia: “é o valor medido, obtido por um dado procedimento de medição, para o qual a probabilidade de declarar falsamente a ausência de um constituinte num material é β , sendo α a probabilidade de declarar falsamente sua presença” (Vocabulário Internacional de Metrologia, 2012). A definição dada pelo VIM aborda todos os conceitos relacionados aos limites de detecção, pois para cada um, o que muda é o modo de estimar e consequentemente, as probabilidades β e α de erro.

As estimativas dos limites de detecção são associadas a uma matriz específica, a um tamanho específico de amostras e a um método específico. Assim, quanto mais parecido o branco (ou o branco de amostra) for da amostra real que será analisada posteriormente, menos os efeitos de matriz afetarão esses limites estimados. Também é necessário ter em mente que os limites mais realistas são aqueles que são calculados levando em conta todas as etapas do método (amostragem, preparo de amostras e determinação) e não apenas os equipamentos de determinação (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2006)

Os conceitos mais importantes destacados por (KONIECZKA; NAMIESNIK, 2009) são: o limite de detecção (*limit of detection*, LOD), o limite de detecção instrumental (*instrumental detection limit*, IDL), o limite de detecção do método (*method detection limit*, MDL) e o limite de quantificação (*limit of quantification*, LOQ) (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 Definições mais utilizadas referente ao termo Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Conceito	Definição
LOD	Menor concentração (ou quantidade) que pode ser detectada com significância estatística.
IDL	Menor concentração (ou quantidade) que pode ser detectada (sem determinação quantitativa) usando um dado equipamento de análise.
MDL	Menor concentração (ou quantidade) que pode ser detectada utilizando-se um dado método analítico.
LOQ	Quantidade ou a menor concentração de um composto que pode ser determinada por um dado método analítico com níveis de precisão e incerteza aceitáveis.

Para este trabalho, foram aplicados os conceitos de MDL e LOQ. Existem várias formas de estimar o MDL: através da razão sinal/ruído; análises de branco de amostras; pelo método da curva de calibração; e através de um LOQ conhecido (KONIECZKA; NAMIESNIK, 2009).

A razão sinal/ruído (*signal to noise ratio*, S/N) é utilizada quando é possível obter uma linha de base do ruído. Pode-se analisar um branco de amostra e normalmente, multiplicar o nível de ruído por três (3) para encontrar o valor de MDL, que será a concentração que gera um

signal igual a três vezes o valor do ruído (COORDENAÇÃO GERAL DE ACREDITAÇÃO, 2011; KONIECZKA; NAMIESNIK, 2009). É melhor aplicada quando os níveis de quantificação estão muito acima do MDL.

O ensaio de replicatas do branco de amostras é a metrologicamente mais correta (KONIECZKA; NAMIESNIK, 2009). Dez replicatas do branco são analisadas. O MDL é calculado como na Equação 1.6:

$$MDL = \bar{x} + 3 \cdot SD \quad \text{Equação 1.6}$$

Sendo $\bar{x}$ a média das replicatas e SD , o desvio-padrão amostral. Se o branco não emite nenhum sinal, é possível fortificar com uma concentração baixa (próxima ao esperado para o MDL) e modificar a equação para a Equação 1.7:

$$MDL = 0 + 3 \cdot SD \quad \text{Equação 1.7}$$

Se ao invés de 10 replicatas, forem utilizadas N replicatas, pode-se utilizar o t de Student para $N-1$ graus de liberdade para estimar MDL (Equação 1.8):

$$MDL = t \cdot SD \quad \text{Equação 1.8}$$

Outro método que pode ser utilizado é o método da curva de calibração (COORDENAÇÃO GERAL DE ACREDITAÇÃO, 2011; KONIECZKA; NAMIESNIK, 2009). Através da Equação 1.9 é possível obter o MDL:

$$MDL = \frac{3,3 \cdot SD}{b} \quad \text{Equação 1.9}$$

Sendo b o coeficiente angular da curva de calibração. Já o desvio-padrão (SD) pode ser estimado por um dos meios seguintes:

- i. Como o desvio padrão de replicatas de branco de amostra;
- ii. Desvio-padrão dos resíduos da curva de calibração;
- iii. Desvio-padrão do intercepto da curva de calibração obtida.

Por fim, pode-se ainda estimar o MDL através de um LOQ já conhecido (KONIECZKA; NAMIESNIK, 2009). Para isso, a matriz é fortificada em cinco (5) concentrações diferentes (próximas ao MDL e LOQ esperados) e seis (6) replicatas são analisadas para cada nível de

concentração. Calcula-se o coeficiente de variação (CV) para cada nível de concentração e constrói-se um gráfico de CV versus concentração. A precisão requerida é escolhida e o LOQ correspondente é determinado. MDL pode ser calculado dividindo-se o LOQ por três (3).

O LOQ pode ser estimado a partir da razão sinal/ruído, como o MDL, sendo geralmente dez (10) vezes o nível de ruído (FUNK; DAMMANN; DONNEVERT, 2007). O LOQ também pode ser estimado partindo-se de uma precisão requerida e construindo-se um gráfico de CV versus concentração, como dito anteriormente (KONIECZKA; NAMIESNIK, 2009). De uma forma mais simples, o LOQ pode ser considerado como o primeiro ponto da curva de calibração (COORDENAÇÃO GERAL DE ACREDITAÇÃO, 2011).

1.2.6. Robustez

A Robustez de um método analítico é definida como uma medida da sua capacidade em permanecer inalterado por uma pequena, mas deliberada mudança nos parâmetros experimentais e provê uma indicação de sua confiabilidade durante o uso normal (VANDER HEYDEN et al., 2001; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

A Robustez foi inicialmente desenvolvida para evitar problemas em comparações interlaboratoriais. Um método desenvolvido em um laboratório e depois utilizado em outro, sem o devido controle efetivo dos parâmetros causavam desvios muito grandes. Sabendo então quais são os parâmetros mais críticos e que causam mudanças significativas nos resultados, foi possível diminuir os desvios nas comparações. Por essa razão, a Robustez está intimamente relacionada à reprodutibilidade (e precisão intermediária) do método e examina fontes de variabilidade. Por fazer parte do estudo de validação é indicado que o estudo de Robustez seja realizado nas etapas iniciais do estudo, pois pode-se identificar parâmetros que se alterados, podem causar desvios e aumentar os valores de reprodutibilidade a níveis não aceitáveis e o método pode passar por uma readequação tendo os ensaios refeitos, causando prejuízo de tempo e recursos (VANDER HEYDEN et al., 2001).

O modo mais fácil de avaliar várias fontes de variação do método e fazendo o menor número de experimentos é a utilização de planejamentos experimentais e, como é comum em qualquer planejamento experimental, é necessário definir: fatores; níveis dos fatores; resposta. Também é necessário fazer os experimentos de forma aleatória.

Os fatores serão as possíveis fontes de variação do método. Tomando-se como exemplo a cromatografia gasosa, podem ser: temperatura da coluna, temperatura do injetor, fluxo de gás de arraste, fase da coluna, tamanho da coluna, entre outros. Os níveis são os valores que são

testados no planejamento e podem ser quantitativos como por exemplo, dois níveis para temperatura da coluna: 250 e 300°C, ou qualitativos sendo um exemplo, coluna com fase polar e outra apolar. E a resposta por fim, será o parâmetro que será avaliado para observar a variabilidade quando da mudança dos níveis dos fatores. Ainda no exemplo da cromatografia, pode-se utilizar a área do pico ou resolução de picos, tudo conforme o interesse do analista.

Os fatores devem ser escolhidos tendo em mente que podem alterar significativamente o resultado quando não controlados em outros laboratórios. Geralmente se utiliza de planejamentos que avaliam apenas dois níveis no teste da robustez e o valor desses níveis também devem ser escolhidos pensando numa variação intralaboratorial.

O teste mais utilizado para avaliar a robustez é o de Youden, que trata de um planejamento fatorial fracionado (RIBANI et al., 2004). Existem outros, como o Plackett-Burman, que não difere muito do anterior. Ambos os planejamentos tratam principalmente efeitos primários, ou seja, o efeito que é causado na resposta quanto um fator é alterado do nível um para o nível dois, sem dar muita atenção às interações entre fatores (sinergia entre fatores).

No teste de Youden até 7 fatores podem ser testados, em dois níveis diferentes, sendo um deles o valor nominal dos fatores no método como utilizado cotidianamente e o segundo nível uma variação positiva ou negativa nesse fator, sendo independentes, ou seja, um fator pode ter variação positiva e outro negativa, a critério do analista. A matriz do teste de Youden é apresentada na Tabela 1.2.

Tabela 1.2 Matriz de fatores e combinação de níveis e suas respectivas respostas para o teste de Youden

Experimento	Fatores							Resposta
	1	2	3	4	5	6	7	
1	A	B	C	D	E	F	G	s
2	A	B	c	D	e	f	g	t
3	A	b	C	d	E	f	g	u
4	A	b	c	d	e	F	G	v
5	A	B	C	d	e	F	g	w
6	A	B	c	d	E	f	G	x
7	A	b	C	D	e	f	G	y
8	A	b	c	D	E	F	g	z

Por convenção, letras maiúsculas são representações do valor nominal e letras minúsculas, a variação para cada fator. Ou seja, no experimento 1, todos os fatores estão no

valor nominal (observar na linha do experimento 1 que todos os fatores estão com letras maiúsculas) e no experimento 2, os fatores 3, 5, 6 e 7 serão variados para o outro nível escolhido (letras minúsculas). Para cada experimento haverá uma resposta (s, t, u, v,...).

O efeito de cada fator na resposta é entendido da seguinte forma: quando se varia o fator do nível 1 para o nível 2, a resposta é alterada, em média, por dado valor. Para facilitar a observação, os fatores são as colunas da matriz. O efeito então é a média das respostas que foram obtidas com o fator no nível 1 (letra maiúscula) subtraída da média das respostas que foram obtidas no nível 2 (letra minúscula). O efeito do fator 1 (E_1) e 2 (E_2), são calculados pela Equação 1.10 e Equação 1.11, respectivamente:

$$E_1 = \frac{(s + t + u + v)}{4} - \frac{(w + x + y + z)}{4} \quad \text{Equação 1.10}$$

$$E_2 = \frac{(s + t + w + x)}{4} - \frac{(u + v + y + z)}{4} \quad \text{Equação 1.11}$$

Por fim, para saber se o efeito é significativo, é necessário comparar o valor do efeito com o valor de efeito considerado crítico ($E_{critico}$), que será considerado o desvio padrão da precisão intermediária multiplicado por 3 (nível de 99% de confiança): se o valor do efeito for maior que $E_{critico}$, o efeito é significativo. Se o efeito for significativo, nessa faixa de variação do fator em questão o método não é robusto e é necessário controlar a variação adequadamente para esse fator. Em alguns casos, é necessário determinar qual é a variação máxima no fator que não seja significativa e deve ser efetuada experimentalmente.

Existe uma outra maneira de conduzir o estudo de robustez de forma a saber o intervalo de controle para um fator que foi identificado como significativo (de forma teórica) (VANDER HEYDEN et al., 2001). Utiliza-se um planejamento Plackett-Burman para 7 fatores conforme descrito na Tabela 1.3 (existem outros planejamentos maiores, de 11 até 23 fatores, mas o de 7 fatores cobre uma vastidão de aplicações). Os níveis escolhidos serão variações simétricas em torno do valor nominal, positiva e negativa. O valor nominal é o “0”, ou ponto central e a variação negativa é denotada por “-1” e a positiva “1”.

Tabela 1.3 Matriz de fatores e combinação de níveis e suas respectivas respostas para o planejamento Plackett-Burman

Experimento	Fatores							Resposta
	1	2	3	4	5	6	7	
1	1	1	1	-1	1	-1	-1	s
2	-1	1	1	1	-1	1	-1	t
3	-1	-1	1	1	1	-1	1	u
4	1	-1	-1	1	1	1	-1	v
5	-1	1	-1	-1	1	1	1	w
6	1	-1	1	-1	-1	1	1	x
7	1	1	-1	1	-1	-1	1	y
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	z

O cálculo dos efeitos é análogo ao anterior do teste de Youden, mas ainda mais fácil de ser entendido: multiplicando a coluna “fator 1” (ou para qualquer outra coluna) pela resposta, se obtém quatro respostas positivas e quatro negativas, que serão corrigidas pela média e resultarão no valor do efeito (Equação e Equação 1.13).

$$E_1 = \frac{(s + v + x + y)}{4} - \frac{(t + u + w + z)}{4} \quad \text{Equação 1.12}$$

$$E_2 = \frac{(s + t + w + y)}{4} - \frac{(u + v + x + z)}{4} \quad \text{Equação 1.13}$$

O valor do efeito crítico, $E_{critico}$, é calculado tomando o desvio padrão da precisão intermediária e multiplicando pelo valor do t de student para $n - 1$ graus de liberdade utilizados no cálculo do desvio padrão da precisão intermediária. Tem-se então quais são os efeitos significativos. Para estimar então um intervalo em que a variação não seja significativa, utiliza-se a Equação 1.14.

$$\left[X_{(0)} - \frac{|X_{(1)} - X_{(-1)}| E_{critico}}{2E_x}, X_{(0)} + \frac{|X_{(1)} - X_{(-1)}| E_{critico}}{2E_x} \right] \quad \text{Equação 1.14}$$

$X_{(0)}$: valor do ponto central do fator X;
 $X_{(1)}$: valor da variação positiva do fator X;
 $X_{(-1)}$: valor da variação negativa do fator X;
 $E_{critico}$: valor crítico dos efeitos;
 E_x : valor do efeito do fator X.

Lembrando que para se utilizar da Equação 1.14, são necessários alguns requisitos: a variação em torno do ponto central precisa ser simétrica, por exemplo, se $X_{(0)}$ é 100°C e $X_{(-1)}$ é 90°C, $X_{(1)}$ deve ser 110°C, para que haja uma variação simétrica de 10°C abaixo e 10°C acima do valor nominal. Os fatores precisam ser quantitativos, por exemplo tempo e temperatura. E por último, uma resposta linear do comportamento do fator é assumida. Por essa razão, em alguns casos essa equação pode falhar na previsão do intervalo não significante.

1.3. Cálculo de Incerteza

O Vocabulário Internacional de Metrologia define Incerteza de Medição como sendo “um parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão de valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas” (Vocabulário Internacional de Metrologia, 2012). A Incerteza pode ser, equivocadamente, entendida como a dúvida em relação à validade do resultado de medição sendo que, na realidade, o conhecimento da incerteza imputa em confiança no valor medido. Também equivocadamente, muitas vezes se confunde incerteza com erro (KANE, 1997). Erro de medição, segundo o Vocabulário Internacional de Metrologia, é a “diferença entre o valor medido duma grandeza e um valor de referência” (Vocabulário Internacional de Metrologia, 2012). A Figura 1.2 exemplifica os dois termos.

Sendo a incerteza, a dispersão dos valores de um mensurando e como a distribuição normal pode ser utilizada para caracterizar essa dispersão, então pode se assumir que o desvio padrão de várias medições que compõem o resultado, multiplicado por 1,96 (número de t de Student para infinitos graus de liberdade, gerando assim, 95 % de confiança de que o resultado “real” é medido) é suficiente para prover um resultado de incerteza satisfatório. Ou seja, com base nesta afirmação, o desvio padrão da Precisão seria suficiente para prover confiabilidade ao resultado, no entanto, essa afirmação é presunçosa.

Figura 1.2 Sistematização da diferença entre erro e incerteza. O valor 5,6 é uma média de várias medições, ou seja, o resultado da análise. O valor 6,0 é o valor de referência para a análise. Erro é a diferença entre o resultado medido e o valor de referência, enquanto Incerteza é a dispersão dos resultados, sendo caracterizada por uma distribuição, no caso, a distribuição normal.

A condição de repetibilidade em que esse desvio padrão é gerado é apenas uma das várias fontes da incerteza. Sozinho, ele gera um resultado subestimado de incerteza, revelando uma falsa confiança no resultado. E essa poderia ser uma das causas para os quais resultados de teses, dissertações, artigos e demais textos científicos, não apresentam reprodutibilidade.

Antes de entrar nos méritos de encontrar as fontes de incerteza, que é uma etapa do cálculo da mesma, é preciso compreender mais algumas definições: incerteza-padrão (u) é a “incerteza de medição expressa na forma dum desvio padrão” (Vocabulário Internacional de Metrologia, 2012), ou seja, a incerteza advém de múltiplas fontes, mas é possível, expressar essas incertezas de cada fonte como desvios padrão. Incerteza-padrão Combinada (u_c) é a “incerteza-padrão obtida ao se utilizarem incertezas-padrão individuais associadas às grandezas de entrada num modelo de medição” (Vocabulário Internacional de Metrologia, 2012). As incertezas-padrão podem ser combinadas através de regras de combinação de variâncias, gerando apenas um resultado de incerteza associado não mais às fontes individuais, mas ao resultado. Por fim, a Incerteza de Medição Expandida (U) é o “produto duma incerteza padrão combinada por um fator maior do que o número um” (Vocabulário Internacional de Metrologia, 2012). Esse fator é conhecido como fator de abrangência ou de expansão (k). Para melhor exemplificar porque é utilizado, é só voltar para o exemplo da distribuição normal, sendo que o desvio-padrão é multiplicado por 1,96 para atingir o nível de 95% de confiança. O mesmo raciocínio é aplicado para a incerteza, a qual geralmente é multiplicado pelo fator 2.

Para finalizar as definições, mais duas são requeridas: incertezas do tipo A e de tipo B. Uma avaliação do Tipo A de incerteza de medição é “avaliação de uma componente da incerteza de medição por uma análise estatística dos valores medidos, obtidos sob condições definidas de medição” (Vocabulário Internacional de Metrologia, 2012). A incerteza tipo A é geralmente advinda dos resultados da validação, que geraram desvios padrão experimentais. Avaliação do Tipo B de incerteza de medição é “avaliação de uma componente da incerteza de medição determinado por meios diferentes daquele adotado para uma avaliação do Tipo A da incerteza de medição” (Vocabulário Internacional de Metrologia, 2012), ou seja, é um desvio padrão conseguido através de informação preexistente (certificado de calibração, material de referência certificado) ou até mesmo deduzido por experiência pessoal.

O tipo B de incerteza também traz como requisito uma avaliação da distribuição dos valores esperados. O cálculo da média é baseado no teorema do limite central da estatística, em que o valor médio será a melhor estimativa do valor “real”, tendo o desvio padrão como indicativo da dispersão dos valores em torno da média e tendo a distribuição normal como a que melhor descreve essa dispersão. No entanto, quando se utiliza de dados, como por exemplo, a tolerância de erro de uma classe de vidraria para ser utilizada como incerteza, não se sabe qual é a distribuição que rege a dispersão desse valor. Sendo assim, existem duas outras distribuições, muito utilizadas no cálculo de incerteza: a retangular e a triangular (Figura 1.3)

Figura 1.3 Distribuições a) Retangular e b) triangular

A distribuição triangular é utilizada quando não se espera que os valores extremos do limite de tolerância ocorram com frequência elevada. Citando-se o exemplo de um balão volumétrico, adquirido a 1 ano, e que nunca foi calibrado. É de se esperar que não haja variações próximas aos extremos do limite da tolerância, porque a fabricação do material é feita para que

a maioria da dispersão dos valores esteja próxima ao valor nominal do balão. O desvio padrão é dado pelo valor da tolerância, dividido por $\sqrt{6}$.

Já a distribuição retangular é utilizada quando se espera que os valores extremos dessa tolerância ocorram. Como exemplo, o mesmo balão, sem calibração há mais de 5 anos. É possível que a dilatação térmica, acondicionamento, e a lavagem desgaste a parede do balão, assim, espera-se que os extremos da tolerância ocorram. O desvio padrão da distribuição retangular é dada como o valor de tolerância dividido por $\sqrt{3}$.

Partindo-se então para o cálculo, existem algumas formas de calcular a incerteza e vários guias foram criados com o intuito de ajudar na elaboração desse cálculo. Dentre todos, o mais amigável é o Guia Eurachem (ELLISON; WILLIAMS, 2012) para cálculo da incerteza analítica e outro, também da Eurachem (ELLISON; RAMSEY, 2007) para cálculo da incerteza da amostragem, sendo também o guia NordTest uma simplificação do anterior (GRØN et al., 2007).

1.3.1. Incerteza Analítica

O cálculo da incerteza analítica, segundo o guia Eurachem é disposto em quatro etapas, sendo elas:

- i. Especificar o mensurando: descrever de forma clara sobre o que está sendo medido e também como está sendo medido;
- ii. Identificar as fontes de incerteza: utilizando-se de toda a informação que esteja disponível, informações da validação, fluxograma da análise, equação de cálculo do mensurando e organizar em diagrama essas fontes;
- iii. Quantificar os componentes de incerteza: de forma individual, utilizar dados de incerteza tipo A e de tipo B (certificados de calibração etc.);
- iv. Calcular a incerteza-padrão combinada e expandida: utilizando-se das regras de combinação de variâncias e depois multiplicando pelo fator de abrangência.

1.3.1.1. Especificar o mensurando

Mensurando é “a grandeza que se pretende medir”. Em Química, muitas vezes se utiliza o termo “analito”, ou o nome da substância ou composto como um sinônimo de mensurando, o que é errado pois não são grandezas (Vocabulário Internacional de Metrologia, 2012). A concentração de um analito sim, é um mensurando.

Deve-se então escrever uma frase clara e concisa a respeito do que se mede. Por exemplo: “Medição da concentração em ng L^{-1} de bisfenol A em água superficial pelo método de preparo de amostras *solid phase extraction* e determinação por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas em modo tandem”. Esse exemplo de determinação de bisfenol A em água permeará todo o conceito de Incerteza apresentado nessa seção.

1.3.1.2. Identificar as fontes de incerteza

É necessário fazer um fluxograma de todo o processo analítico, o que auxilia sobremaneira na identificação das fontes. Segue o exemplo de fluxograma na Figura 1.4. Observando o fluxograma da análise, pode-se começar a identificar as fontes de incerteza: a amostragem (coleta, transporte, acondicionamento) é, sem dúvida uma fonte de incerteza; ambientar as amostras a temperatura ambiente também, porque se isso não for feito, pode haver erros na determinação do volume (água superficial geralmente precisa ficar acondicionada a $4 \pm 2^\circ\text{C}$, temperatura na qual há aumento de volume observado pela mudança no empacotamento das moléculas); medir 1 litro para ser filtrado também é uma fonte de incerteza, pois a vidraria utilizada, por exemplo uma proveta, traz seu contribuinte de incerteza pois não mede exatamente 1 L; os cartuchos de SPE também são uma fonte de incerteza pois nenhum cartucho é exatamente igual ao outro; o volume de solvente 1 e 2 também são fontes de incerteza; Na evaporação do solvente, algumas moléculas do composto podem ser evaporadas, também sendo uma fonte de incerteza; a micropipeta utilizada para medir $100 \mu\text{L}$ traz sua componente de incerteza; a microseringa utilizada para injetar $1 \mu\text{L}$ também e o equipamento, da mesma forma, contribui para a incerteza. Não houve etapa no fluxograma que não contribuisse para a incerteza do resultado.

Figura 1.4 Exemplo de fluxograma da etapa analítica do exemplo de determinação da concentração de bisfenol A

Pelo fluxograma também podemos formular a equação pela qual a concentração de bisfenol A na amostra de água superficial é calculada. Durante a etapa de validação, foi feita uma curva de calibração para o bisfenol A, sendo da forma $y = 234x - 12$. O resultado 140 em unidades de área refere-se então a 0,6 ng L⁻¹ de bisfenol A na amostra de água superficial? Não, refere-se ao extrato de 100 µL, que passou por uma extração em cartucho SPE, que é passível de um cálculo de recuperação. Então a equação para o cálculo da concentração na amostra de água superficial é como mostrada na Equação 1.15:

$$x = \frac{(y + 12) * V_1}{234 * V_2 * R} \quad \text{Equação 1.15}$$

Sendo V_1 , volume da amostra; V_2 , o volume do extrato e R , a recuperação do método de extração. Pela equação de cálculo, também podemos observar mais algumas fontes de incerteza: a curva de calibração e a recuperação do método. Os dois volumes já tinham sido identificados pelo fluxograma do método.

Aqui vai uma boa notícia: nem todas as fontes de incerteza que foram identificadas precisam ser consideradas pois já estão embutidas em muitos resultados da validação, como por exemplo: ambientação das amostras, as quantidades de solventes 1 e 2, os cartuchos de SPE e evaporação do solvente 2, pois quando se replicou o processo para gerar os resultados de validação, a incerteza associada a cada uma dessas etapas são agrupadas na incerteza do resultado de Precisão, Exatidão/Veracidade e Linearidade da Curva de Calibração. Porém, balanças e vidrarias volumétricas como provetas, balão e micropipetas, devem ser considerados como fontes de incerteza, pois é necessário haver uma consideração do erro sistemático no uso desses equipamentos.

Recapitulando as fontes de incerteza identificadas: Precisão, Recuperação, Curva de Calibração, Volume da amostra e Volume do extrato. Os outros parâmetros da validação, como Seletividade e Robustez, quando apresentam resultados satisfatórios, não precisam ser identificados como fontes de incerteza. O limite de detecção não influi diretamente no resultado e por isso não é identificado como fonte de incerteza, mas atenção especial deve ser tomada quando o resultado fica próximo ao limite de detecção, pela maximização da incerteza às baixas concentrações.

Encontradas as fontes, falta organiza-las em um diagrama conhecido como Ishikawa ou diagrama de causa e efeito ou popularmente, “espinha de peixe”. Esse diagrama foi

implementado por Kaoru Ishikawa, engenheiro químico japonês (GUPTA, 2006). Consiste basicamente em traçar uma reta horizontal que representa o efeito, no nosso caso, a incerteza, e através de retas adjacentes, representar as causas (Figura 1.5).

Pensando agora em cada fonte de incerteza, existem para cada uma delas, outras componentes? Com certeza sim. Tome-se por exemplo, o Volume da amostra. Como é aferido? Através de uma proveta, por exemplo. Se a proveta for calibrada, ela tem uma incerteza associada à calibração, então a calibração é uma componente da fonte de incerteza Volume da amostra. Deve-se tomar muito cuidado para se utilizar da Incerteza-padrão Combinada da calibração e não a incerteza expandida. Se a incerteza-padrão combinada não estiver visível no certificado de calibração, basta dividir a incerteza expandida pelo fator de expansão, que também é encontrado no certificado de calibração. Se a proveta não for calibrada, pode-se utilizar o valor de tolerância para a classe da vidraria (classe A, por exemplo) extraída da norma ISO 1042:1998, utilizando-se do desvio padrão de uma distribuição adequada.

Figura 1.5 Diagrama de causa e efeito ou espinha de peixe para incerteza

Outra componente se refere a temperatura durante a aferição do volume: todas as vidrarias e micropipetas são calibradas e verificadas na temperatura de $20,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$, no entanto, se for utilizada numa temperatura diferente dessa, um erro sistemático ocorre, pois há expansão do volume e é necessário contabilizar essa incerteza. A Figura 1.6 mostra as duas componentes dessa fonte de incerteza no diagrama de Ishikawa.

O mesmo raciocínio é aplicado para a fonte de incerteza Volume do extrato, apresentando as mesmas duas componentes. As fontes de incerteza que advêm da etapa de Validação apresentam como componentes de sua incerteza o branco fortificado, que é uma amostra sem os analitos de interesse (branco) a qual é adicionada de uma quantidade conhecida desses analitos para se fazer os estudos de validação.

Para a preparação do branco fortificado utilizou-se uma proveta, para aferir 1 L do branco de amostra. A solução padrão que foi utilizada para fortificar o branco foi feita da seguinte forma: aferiu-se a massa de bisfenol A em balança analítica, posteriormente sendo transferida para um balão volumétrico de 10 mL e adicionado solvente até completar o volume. Dessa primeira solução (Solução padrão 1), foram feitas duas diluições (Solução padrão 2 e 3), utilizando-se de uma micropipeta de 100 μL para a primeira e uma de 10 μL para a segunda diluição e ambos os volumes foram transferidos para balões volumétricos de 10 mL. Dessa última solução diluída (solução padrão 3), 100 μL foram adicionados à 1 L do branco de amostra.

Figura 1.6 Diagrama de causa e efeito, adicionadas as subcomponentes de incerteza

O branco fortificado possui várias componentes de incerteza: aferição de massa, diluição, que engloba as incertezas das micropipetas e dos balões volumétricos. Assim, muitas componentes precisam ser expostas no diagrama. Contudo, como o mesmo branco fortificado é utilizado nas três fontes de incerteza da validação (Precisão, Recuperação e Curva de Calibração), o branco fortificado pode ser exposto no diagrama como uma fonte principal de

incerteza (Figura 1.7). Esse rearranjo é feito para que a mesma componente não seja contabilizada várias vezes, superestimando o resultado de incerteza.

Apesar de haver duas componentes de temperatura de calibração, elas não podem ser unidas e contabilizadas como uma fonte principal de incerteza como foi feito para o branco fortificado porque são diferentes: a calibração de uma se refere à proveta e a outra, a uma micropipeta. Os componentes de temperatura também são diferentes, pois uma se refere à expansão do volume de água e a outra para solvente orgânico do extrato.

A primeira solução foi feita aferindo a massa de padrão bisfenol A (que possui uma incerteza) e transferindo para um balão volumétrico de 10 mL. A aferição de massa foi feita da seguinte forma: um recipiente de vidro foi colocado no prato de pesagem da balança e tarou-se a balança. Depois a massa requerida foi adicionada ao recipiente e a massa foi aferida. Foram feitas, nesse procedimento duas aferições: uma da tara e outra da pesagem da massa de bisfenol A. Assim, a subcomponente de aferição de massa possui mais duas subcomponentes, a de tara e a de massa bruta, na qual a calibração da balança é a incerteza em questão. Já o balão volumétrico teve seu volume ajustado para 10 mL com solvente adequado e duas são suas subcomponentes de incerteza: temperatura e calibração (mesmo raciocínio de Volume da amostra e do extrato).

Figura 1.7 Diagrama de causa e efeito, mostrando a reorganização da subcomponente branco fortificado agora como componente principal de incerteza

A segunda solução foi feita retirando-se uma alíquota de 100 μL da solução 1 (por isso a incerteza da concentração da solução 1 é um componente da incerteza da solução 2) e transferindo para outro balão de 10 mL sendo ajustado o volume. A segunda solução então tem

como subcomponentes o volume do balão e da micropipeta. O mesmo ocorre para a solução 3, só que agora utilizando uma micropipeta de 10 µL. Da solução 3, foram retirados 100 µL, que é o volume de fortificação, adicionado a 1 L de amostra branco (volume do branco). Todas as subcomponentes do branco fortificado podem ser vistas no diagrama de Ishikawa (Figura 1.8). Assim, a etapa de identificar as fontes de incerteza se findou.

Figura 1.8 Diagrama de causa e efeito finalizado

1.3.1.3. Quantificar os componentes da incerteza

Para quantificar a incerteza é necessário saber duas regras de combinação de variâncias:

Regra 1: para equações de cálculo do valor do mensurando em que apenas as operações de soma e subtração ocorrem, tal como $y = (p + q - r + \dots)$, a incerteza combinada deve ser calculada como na Equação 1.16:

$$u_c(y(p, q, r, \dots)) = \sqrt{u(p)^2 + u(q)^2 + u(r)^2 + \dots} \quad \text{Equação 1.16}$$

Regra 2: para equações que além de subtração e soma possuam produtos ou divisões, tal como $y = (p + q)/r + \dots$, a incerteza combinada deve ser calculada como na Equação 1.17:

$$u_c(y(p, q, r, \dots)) = \sqrt{\left(\frac{u(p)}{p}\right)^2 + \left(\frac{u(q)}{q}\right)^2 + \left(\frac{u(r)}{r}\right)^2 + \dots} \quad \text{Equação 1.17}$$

Sabendo das regras agora pode-se calcular as componentes e subcomponentes de cada fonte de incerteza. Quando se calculam as subcomponentes, deve-se imaginar que cada subcomponente é um mensurando, por exemplo o volume ou a concentração das soluções padrão que foram diluídas para fazer a fortificação do branco. Iniciando pelo cálculo das fontes de incerteza Volume da amostra e Volume do extrato; os componentes Volume do branco e Volume de fortificação e também as subcomponentes Volume balão e Volume da micropipeta são calculadas da mesma forma. Deve-se atentar para qual equipamento foi utilizado, pois em algumas foi utilizado uma micropipeta de 10 µL e em outras a de 100 µL. A incerteza da subcomponente Temperatura é calculada pela Equação 1.18:

$$u_{(T)} = \frac{\Delta T \cdot C_{exp} \cdot V}{\sqrt{3}} \quad \text{Equação 1.18}$$

ΔT : diferença de temperatura de calibração e a temperatura de operação;

C_{exp} : coeficiente de expansão do líquido;

V : volume aferido.

Para a subcomponente Calibração, nos casos em que há um certificado de calibração, deve-se utilizar o valor de incerteza-padrão combinada, ou dividir o valor de incerteza expandida pelo fator de expansão que é mostrado no certificado (Equação 1.19). Porém, se não forem calibradas, pode-se utilizar os valores de tolerância para cada classe de vidraria, dividindo a tolerância por $\sqrt{3}$ (Equação 1.20), caso assuma-se uma distribuição retangular ou $\sqrt{6}$, caso se assuma uma distribuição triangular (Equação 1.21).

$$u_{(Cal)} = U/k \quad \text{Equação 1.19}$$

$$u_{(Cal)} = a/\sqrt{3} \quad \text{Equação 1.20}$$

$$u_{(Cal)} = a/\sqrt{6} \quad \text{Equação 1.21}$$

No caso da micropipeta, é difícil imaginar que os valores de tolerância possam ser utilizados, pois é um equipamento frágil e sujeito a muita deriva, sendo que se houver uma colisão forte desse equipamento, já não há garantias quanto à exatidão do volume aferido. Por isso é premente que esse tipo de equipamento esteja sujeito a calibrações periódicas ou verificações de eficácia e esses dados sejam utilizados no cálculo de incerteza.

Considerando para o cálculo de combinação de variâncias o mensurando como o volume, e que não há nenhuma equação para cálculo do mesmo, sendo a aferição feita por observação e que os componentes de incerteza estão nas mesmas unidades dimensionais, pode-se utilizar a Regra 1 de combinação (Equação 1.22):

$$u(V) = \sqrt{\left(\frac{\Delta T \cdot C_{exp} \cdot V}{\sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{U}{k}\right)^2} \quad \text{Equação 1.22}$$

A incerteza da massa é simples, pois apenas basta utilizar a incerteza-padrão combinada da calibração da balança ou a incerteza expandida e dividir pelo fator de expansão e utilizar a regra 1 para combinar as duas incertezas, pois são feitas duas aferições, uma da tara e outra da massa bruta (Equação 1.23). A balança é outro equipamento que não pode ser dispensado de calibração ou verificação intermediária.

$$u(m) = \sqrt{\left(\frac{U}{k}\right)^2 + \left(\frac{U}{k}\right)^2} \quad \text{Equação 1.23}$$

Para as subcomponentes Solução padrão 1, cujo mensurando é a concentração, e existe uma equação para o cálculo da mesma, sendo $C_{sol. 1} = m/V$, é utilizada a Regra 2 para combinação da incerteza (Equação 1.24):

$$u(sol. 1) = C_{sol. 1} \cdot \sqrt{\left(\frac{u(m)}{m}\right)^2 + \left(\frac{u(V)}{V}\right)^2} \quad \text{Equação 1.24}$$

A subcomponente Solução padrão 2, tem como mensurando a concentração e o cálculo é feito da seguinte maneira: $C_{sol. 2} = (C_{sol. 1} \cdot V_{microp.})/V_{balão}$, também se utilizando da Regra 2 (Equação 1.25). A componente Solução padrão 3 segue o mesmo raciocínio (Equação 1.26).

$$u(sol. 2) = C_{sol. 2} \cdot \sqrt{\left(\frac{u(C_{sol. 1})}{C_{sol. 1}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{microp.})}{V_{microp.}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{balão})}{V_{balão}}\right)^2} \quad \text{Equação 1.25}$$

$$u(sol. 3) = C_{sol. 3} \cdot \sqrt{\left(\frac{u(C_{sol. 2})}{C_{sol. 2}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{microp.})}{V_{microp.}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{balão})}{V_{balão}}\right)^2} \quad \text{Equação 1.26}$$

Para finalizar a contribuição do cálculo da fonte de incerteza Branco fortificado, falta a incerteza do padrão analítico, que é encontrada no certificado de análise do mesmo. A fonte Branco fortificado tem seu mensurando, que é a concentração do mesmo sendo calculada pela equação $C_{branco fort.} = (C_{sol. 3} \cdot V_{fort.})/V_{branco}$. Utilizando-se da Regra 2 para o cálculo, tem-se a Equação 1.27:

$$u(C_{branco fort.}) = C_{branco fort.} \cdot \sqrt{\left(\frac{u(C_{sol. 3})}{C_{sol. 3}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{fort.})}{V_{fort.}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{branco})}{V_{branco}}\right)^2 + \left(\frac{u(pureza)}{pureza}\right)^2} \quad \text{Equação 1.27}$$

Assim, toda a contribuição do Branco fortificado foi calculada. Faltam agora os dados de Validação. O desvio-padrão em condições de Precisão Intermediária é o melhor indicativo da incerteza padrão da Precisão. Para a Recuperação, utiliza-se o desvio padrão para replicatas dos valores de Recuperação em uma dada concentração. Os desvios padrão já são incertezas-padrão e não precisam de tratamento matemático adicional, podem ser incluídos diretamente no cálculo da incerteza da concentração de bisfenol A. A curva de calibração contribui de uma forma diferente dos parâmetros já citados e é preciso calcular essa contribuição. O mensurando da curva de calibração é a concentração, sendo sua incerteza dada pela Equação 1.28, Equação 1.29 e Equação 1.30.

$$u(cal) = \frac{S}{B_1} \cdot \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_{0(cal)} - \bar{c})^2}{S_{xx}}} \quad \text{Equação 1.28}$$

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

Equação 1.29

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

Equação 1.30

Sendo:

S , o desvio padrão dos resíduos da curva;

B_1 , o coeficiente angular da curva;

B_0 , é o coeficiente linear da curva

p , o número de replicatas de análise da amostra;

n , o número total de dados usados na regressão (5 pontos em 5 replicas, $n = 25$);

c_0 (cal), o resultado de concentração gerado pela curva;

$\bar{c}$, é a média dos pontos de calibração escolhidos;

S_{xx} , é um fator de correção;

A_j , é a área para cada replicata de cada ponto da curva;

c_j , cada ponto de calibração sendo repetido conforme suas replicatas;

1.3.1.4. Cálculo da incerteza padrão combinada e expandida

Após o cálculo da incerteza da curva de calibração, é possível então finalizar o cálculo de incerteza-padrão combinada para o mensurando “concentração em ng L⁻¹ de bisfenol A em água superficial pelo método de preparo de amostras *solid phase extraction* e análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas em modo tandem”. A equação para o cálculo é a que se segue: $c_0 = [(A + 12) * V_1] / (234 * V_2 * R)$ e utilizando-se da Regra 2 de combinação, tem-se a Equação 1.31:

$$u(c_0) = c_0 \cdot \sqrt{\left(\frac{u(C_{branco\ fort.})}{C_{branco\ fort.}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_1)}{V_1}\right)^2 + \left(\frac{u(V_2)}{V_2}\right)^2 + \left(\frac{u(Prec.)}{Prec.}\right)^2 + \left(\frac{u(Rec.)}{Rec.}\right)^2 + \left(\frac{u(cal)}{c_0\ cal}\right)^2}$$

Equação 1.31

Para calcular a incerteza expandida, basta escolher um fator de expansão, que geralmente é 2 e multiplicar pelo valor de incerteza-padrão combinada (Equação 1.32).

$$U(c_0) = u_c(c_0) \cdot k \quad \text{Equação 1.32}$$

A incerteza pode ser relatada na forma de incerteza expandida, nas mesmas concentrações do mensurando ou percentual, sendo mais fácil a análise da dispersão dos valores (Equação 1.33). Desta maneira, para o exemplo apresentado, o cálculo de incerteza da parte analítica é finalizado.

$$U(\%) = \frac{U(c_0)}{c_0} \cdot 100 \quad \text{Equação 1.33}$$

1.3.2. Cálculo de Incerteza da Amostragem

O objetivo de uma coleta de amostra é a representação do ambiente da qual foi retirada. Para que essa representação seja fiel, é necessária muita cautela nesse procedimento (AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS; COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2011). Porém, mesmo que todo o planejamento amostral estivesse no limite da perfeição, evitando todos os erros humanos, a incerteza da amostragem será maior que a analítica. Os dois guias de cálculo de incerteza da amostragem utilizados, o NordTest e Eurachem afirmam que a componente de maior peso na incerteza da amostragem é a variabilidade espaço-temporal do ambiente. Essa variabilidade é intrínseca e não pode ser minimizada, apenas quantificada (ELLISON, S. R. L.; RAMSEY, 2007; GRØN et al., 2007).

A identificação de fontes de incerteza na amostragem é um trabalho extenso e só é utilizado para o caso de modelagem, um caso específico de cálculo. Porém é interessante observar que várias fontes existentes são difíceis de quantificar, como por exemplo a contaminação ou o tipo de amostra coletada. A Figura 1.9 traz algumas fontes já esquadrinhadas na incerteza de amostras de solo, que é uma matriz que apresenta vários trabalhos de modelagem.

Figura 1.9 Diagrama de Ishikawa para as principais fontes de incerteza para amostragem de solo

Fonte: adaptado de (GRØN et al., 2007).

Visto que é difícil quantificar cada fonte de incerteza separadamente, como no cálculo da incerteza analítica, é preferível utilizar métodos que remetam ao cálculo para o valor total de incerteza amostral. Um dos métodos de quantificação proposto pelos guias é simples, exigindo apenas que a coleta seja realizada em duplicata. Dois tipos de planejamento são utilizados: o de divisão única (*Single Split*) e divisão dupla (*Double Split*), conforme pode ser visto na Figura 1.10.

Figura 1.10 Planejamentos de coleta de amostras para cálculo de incerteza da amostragem. a) Divisão simples e b) Divisão dupla

Fonte: adaptado de (GRØN et al., 2007).

Os cálculos são um pouco diferentes quando se utiliza o método de divisão simples e de divisão dupla. Mas os dois partem do mesmo princípio: que a incerteza-padrão combinada de medição é a raiz da soma quadrática das incertezas-padrão combinadas da análise e da amostragem (Equação 1.34). A raiz da soma quadrática é uma regra de combinação de variâncias.

$$u_{c(\text{medição})} = \sqrt{\left(u_{c(\text{análise})}\right)^2 + \left(u_{c(\text{amostragem})}\right)^2} \quad \text{Equação 1.34}$$

1.3.2.1. Método de divisão simples (Single Split)

Os cálculos são feitos com os resultados das duplicatas, para cada alvo amostral (i). Os resultados para cada conjunto de duplicatas são x_{i1} e x_{i2} . A diferença absoluta, D_i , para cada conjunto de duplicatas é representada na Equação 1.35. A média, $\bar{x}_i$, é calculada como na Equação 1.36.

$$D_i = |x_{i1} - x_{i2}| \quad \text{Equação 1.35}$$

$$\bar{x}_i = \frac{(x_{i1} + x_{i2})}{2} \quad \text{Equação 1.36}$$

A diferença relativa entre as duplicatas, d_i é calculada seguindo-se a Equação 1.37. E a diferença relativa média, $\bar{d}$, caso haja mais de um alvo amostral, é calculada pela Equação 1.38.

$$d_i = \frac{D_i}{\bar{x}} \quad \text{Equação 1.37}$$

$$\bar{d} = \frac{\sum d_i}{n} \quad \text{Equação 1.38}$$

O desvio padrão relativo da medição, RSD , é calculado pela Equação 1.39. A constante de 1,128 é utilizada quando se analisa duplicatas. E o desvio padrão, s_{c_0} , a uma dada concentração, c_0 , é calculado pela equação Equação 1.40.

$$RSD = \frac{\bar{d} \cdot 100}{1,128} \% \quad \text{Equação 1.39}$$

$$s_{c_0} = \frac{RSD \cdot c_0}{100} \quad \text{Equação 1.40}$$

O desvio padrão, s_{c_0} , é a incerteza padrão combinada de medição e como na etapa anterior, se calculou a incerteza-padrão combinada da análise, $u_c(c_0)$, é possível calcular a incerteza-padrão combinada da amostragem através da Equação 1.41, que é rearranjo da Equação 1.34.

$$u_{c(amostragem)} = \sqrt{(s_{c_0})^2 - (u_c(c_0))^2} \quad \text{Equação 1.41}$$

Basta apenas multiplicar o valor de incerteza da amostragem por k para obter a incerteza expandida (Equação 1.42) em unidades de concentração ou de forma percentual (Equação 1.43).

$$U_{(amostragem)} = u_{c(amostragem)} \cdot k \quad \text{Equação 1.42}$$

$$U(\%)_{(amostragem)} = \frac{U_{(amostragem)} \cdot 100}{c_0} \quad \text{Equação 1.43}$$

1.3.2.2. Método de divisão dupla (Double Split)

Os cálculos são feitos com os resultados das duplicatas, para cada alvo amostral (i). Os resultados para cada conjunto de duplicatas são x_{i1} , x_{i2} , x_{i3} e x_{i4} . As médias das análises de cada amostra são dadas pela Equação 1.44 e Equação 1.45.

$$\bar{x}_{i1} = \frac{(x_{i1} + x_{i2})}{2} \quad \text{Equação 1.44}$$

$$\bar{x}_{i2} = \frac{(x_{i3} + x_{i4})}{2} \quad \text{Equação 1.45}$$

As diferenças absolutas das análises, D_{i1} e D_{i2} , são representadas na Equação 1.46 e Equação 1.47.

$$D_{i1} = |x_{i1} - x_{i2}| \quad \text{Equação 1.46}$$

$$D_{i2} = |x_{i3} - x_{i4}| \quad \text{Equação 1.47}$$

Caso sejam tomados vários alvos amostrais, é necessário tomar a diferença absoluta média das análises, $\bar{D}_1$ e $\bar{D}_2$, como na Equação 1.48 e Equação 1.49.

$$\bar{D}_1 = \frac{\sum D_{i1}}{n} \quad \text{Equação 1.48}$$

$$\bar{D}_2 = \frac{\sum D_{i2}}{n} \quad \text{Equação 1.49}$$

A média das diferenças absolutas médias das análises é calculada segundo a Equação 1.50. E o desvio padrão da análise é tomado pela Equação 1.51. Essa é a primeira etapa do cálculo.

$$\bar{D}_{análise} = \frac{\bar{D}_1 + \bar{D}_2}{2} \quad \text{Equação 1.50}$$

$$s_{análise} = \frac{\bar{D}_{análise}}{1,128} \quad \text{Equação 1.51}$$

Agora, é necessário estimar os desvios considerando as quatro análises em conjunto, gerando o desvio absoluto da medição, D_i , como na Equação 1.52.

$$D_i = |\bar{x}_{i1} - \bar{x}_{i2}| \quad \text{Equação 1.52}$$

Se forem tomados vários alvos amostrais, então é necessário utilizar a Equação 1.53 e para calcular o desvio absoluto médio de medição. E o desvio padrão da medição é calculado pela Equação 1.54.

$$\bar{D}_{\text{medição}} = \frac{\sum D_i}{n} \quad \text{Equação 1.53}$$

$$s_{\text{medição}} = \frac{\bar{D}_{\text{medição}}}{1,128} \quad \text{Equação 1.54}$$

Para calcular o desvio padrão da amostragem, que será a incerteza-padrão combinada da mesma, basta utilizar a Equação 1.55. O desvio padrão da análise é calculado como uma média de dois valores que são médias também (Equação 1.50). Por essa razão, se utiliza o desvio padrão da média para esse resultado ($s/\sqrt{n}$).

$$s_{\text{amostragem}} = \sqrt{(s_{\text{medição}})^2 - \left(\frac{s_{\text{análise}}}{\sqrt{2}}\right)^2} \quad \text{Equação 1.55}$$

Multiplicando-se o valor do desvio padrão da amostragem por k obtém-se a incerteza expandida (Equação 1.56) em unidades de concentração ou de forma percentual (Equação 1.57).

$$U_{(\text{amostragem})} = s_{\text{amostragem}} \cdot k \quad \text{Equação 1.56}$$

$$U(\%)_{(\text{amostragem})} = \frac{U_{(\text{amostragem})} \cdot 100}{c_0} \quad \text{Equação 1.57}$$

Vale salientar que essa estimativa, utilizando-se duplicatas, é válida apenas para o cálculo da incerteza da amostragem. O desvio padrão da análise, calculado pela Equação 1.51, subestima várias fontes de incerteza, não podendo ser utilizado como a incerteza-padrão combinada analítica.

1.4. Controle de Qualidade Intralaboratorial

Após as etapas de validação do método e cálculo da incerteza do resultado analítico, seria errôneo imaginar que o mesmo método analítico poderia ser utilizado por anos a fio, inferindo que não haverá variação nenhuma nos parâmetros testados. Se o equipamento quebra e é necessário um reparo, não seria possível garantir que esse equipamento mantém as mesmas características testadas na validação inicial. A menos que se submeta os resultados a um controle de qualidade, não existe essa garantia.

O controle de qualidade surge do requisito mínimo de que o método validado mantenha seus parâmetros nas análises subsequentes e quando não é possível, nova validação deve ser realizada. Em 1931, Shewhart desenvolveu essa ferramenta, a princípio, para controle de produção na indústria. Verificava-se que a qualidade do produto decaía em função do tempo e o desperdício era enorme. Avaliando-se algumas características e estabelecendo limites aceitáveis para elas, era possível verificar onde estava ocorrendo o problema que inutilizava o produto e corrigi-lo (FUNK; DAMMANN; DONNEVERT, 2007).

O controle de qualidade é dito intralaboratorial quando é feito internamente, no próprio laboratório e, interlaboratorial quando feito externamente, através de testes de proficiência e avaliações externas de qualidade, pois os resultados são comparados com outros laboratórios. O controle de qualidade intralaboratorial refere-se a todos os procedimentos utilizados no laboratório para o monitoramento contínuo das operações e resultados de medição para que se decida sobre quais resultados são confiáveis e passíveis de serem relatados (MAGNUSSON; ÖRNEMARK, 2014).

A principal ferramenta do controle de qualidade é a carta-controle, que nada mais é que um gráfico onde são definidos dois parâmetros principais: i) a quantidade desejada ou linha central e ii) os limites de qualidade para essa quantidade. Dentre esses limites destacam-se: os limites de atenção e os limites de controle (FUNK; DAMMANN; DONNEVERT, 2007; KONIECZKA; NAMIESNIK, 2009; MILLER; MILLER, 2005). Um exemplo de carta-controle é mostrado na Figura 1.11. A carta-controle é baseada na distribuição normal dos

resultados. Por essa razão, os limites de qualidade são baseados, muitas vezes na variância dos resultados.

Os resultados, segundo a Figura 1.11, analisados dia a dia (mas podem ser feitos conforme a disponibilidade e função da carta-controlle) são inseridos no gráfico e deve haver uma análise crítica para saber se esses resultados são aceitáveis ou há uma situação dita “fora de controle” (FUNK; DAMMANN; DONNEVERT, 2007). Eis alguns requisitos para se declarar uma situação fora de controle (Figura 1.12):

- i. 1 valor fora dos limites de controle;
- ii. 7 valores consecutivos de um lado da linha de quantidade desejada;
- iii. 10 de 11 valores consecutivos de um lado da linha de quantidade desejada;
- iv. 7 valores consecutivos em tendência ascendente ou descendente;
- v. Dois de três valores consecutivos fora dos limites de atenção.

Figura 1.11 Carta-controlle típica, com limites superiores e inferiores de atenção (amarelo) e de ação (vermelho)

Quando uma situação fora de controle é detectada, é necessário remediar imediatamente e depois, proceder uma averiguação de porquê ocorreu. Várias podem ser as causas e um diagrama de causa e efeito (Ishikawa) pode ser útil para encontrar a causa raiz. Encontrada a causa raiz do problema, a mesma deve ser corrigida. E uma nova análise deve ser processada para observar se a medida foi efetiva para resolver a situação.

Existem vários tipos de carta-controlle e algumas das principais serão citadas, cada uma com sua especificidade de cálculo dos limites de qualidade e aplicações.

Figura 1.12 Critérios para declaração de uma situação fora de controle

Fonte: adaptado de (FUNK; DAMMANN; DONNEVERT, 2007).

1.4.1. Shewhart

A carta-controle de Shewhart é, sem dúvida, a mais utilizada. Ela também é chamada de Carta de Shewhart de Média. É aplicada para monitorar a precisão em valores médios em várias ou em única análise. Os tipos de amostras que podem ser usadas na carta de Shewhart são: solução padrão, materiais de referência certificados, amostras fortificadas e amostras tal qual (FUNK; DAMMANN; DONNEVERT, 2007; KONIECZKA; NAMIESNIK, 2009; MILLER; MILLER, 2005).

Para o cálculo da média, um estudo prévio de 10 a 20 análises é requerido. É necessário a exclusão de outliers pelo teste de Grubbs (Equação 1.58). Se G calculado for maior que G tabelado, então x é um *outlier*. Após o teste de Grubbs, é calculada a média e o desvio padrão dos resultados e por fim é necessário fazer um teste de significância da diferença entre a média e o valor designado, o teste t de Student (Equação 1.59). Se t calculado for menor que t tabelado (considerando o nível de confiança e graus de liberdade), então não há diferença significativa entre a média e o valor assumido e a carta pode ser construída (KONIECZKA; NAMIESNIK, 2009; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2014).

$$G = \frac{x - \bar{x}}{s} \quad \text{Equação 1.58}$$

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{s} \cdot \sqrt{n} \quad \text{Equação 1.59}$$

x : valor suspeito de ser *outlier*;
 $\bar{x}$: média dos resultados;
 s : desvio padrão dos resultados;
 μ : valor designado;
 n : número de resultados.

O eixo x do gráfico será o número consecutivo de resultados e o eixo y será composto pelos resultados. A linha central do gráfico será a média dos resultados prévios. As linhas do limite de controle superior e inferior serão calculadas levando em conta três vezes o desvio-padrão dos resultados prévios ($L.C. = \pm 3 \cdot s$) e os limites de atenção serão iguais a 2 vezes o desvio padrão ($L.A. = \pm 2 \cdot s$). A Figura 1.13 ilustra uma carta de Shewhart.

Figura 1.13 Construção de uma carta-controle de Shewhart

1.4.2. Carta de amplitude (R-charts)

A carta de Shewhart compara valores individuais com a média, mas não trata da interação entre os resultados. A carta de amplitude (R-chart) serve para esse propósito,

analisando a diferença de replicatas, detectando diferenças significativas entre os desvios padrão que aparecem nas séries de resultados. Apenas amostras fortificadas podem ser utilizadas nesse tipo de carta (FUNK; DAMMANN; DONNEVERT, 2007; MILLER; MILLER, 2005).

Para a construção da carta de amplitude é necessário analisar de 10 a 20 amostras em replicatas. Sabendo-se então: i) o número de replicatas (n) que serão utilizadas para o cálculo da amplitude, sendo que a amplitude R_i será a diferença entre o maior e o menor valor dessas replicatas (por isso, tem que ser no mínimo 2); ii) o número de séries de replicatas, (N), que está entre 10 e 20; iii) a médias das amplitudes ($\bar{R}$), como na Equação 1.60.

$$\bar{R} = \frac{\sum R_i}{N} \quad \text{Equação 1.60}$$

Os limites de qualidade são calculados utilizando-se a Equação 1.61, Equação 1.62, Equação 1.63 e Equação 1.64. Cada fator é utilizado segundo a Tabela 1.4, em uma combinação da significância de 95% para o limite de atenção e 99 ou 99,7% para o limite de controle. A Figura 1.14 traz um exemplo, considerando a combinação de 95% e 99,7% para $n = 2$.

$$LSC = D_{Cup} \cdot \bar{R} \quad \text{Equação 1.61}$$

$$LIC = D_{Clo} \cdot \bar{R} \quad \text{Equação 1.62}$$

$$LSA = D_{Wup} \cdot \bar{R} \quad \text{Equação 1.63}$$

$$LIA = D_{Wlo} \cdot \bar{R} \quad \text{Equação 1.64}$$

Tabela 1.4 Valores para os fatores D de cálculo dos limites da carta de amplitude

<i>n</i>	<i>P</i> = 95 % [23]		<i>P</i> = 99 % [23]		<i>P</i> = 99,7 % [3, 4]	
	<i>D</i> _{Wlo}	<i>D</i> _{Wup}	<i>D</i> _{Clo}	<i>D</i> _{Cup}	<i>D</i> _{Clo}	<i>D</i> _{Cup}
2	0.039	2.809	0.008	3.518	0.000	3.267
3	0.179	2.176	0.080	2.614	0.000	2.575
4	0.289	1.935	0.166	2.280	0.000	2.282
5	0.365	1.804	0.239	2.100	0.000	2.115
6	0.421	1.721	0.296	1.986	0.000	2.004
7	0.462	1.662	0.341	1.906	0.076	1.924
8	0.495	1.617	0.378	1.846	0.136	1.864
9	0.522	1.583	0.408	1.798	0.184	1.816
10	0.544	1.555	0.434	1.760	0.223	1.777
11	0.562	1.531	0.456	1.729	0.256	1.744
12	0.578	1.511	0.475	1.702	0.284	1.716
13	0.592	1.494	0.491	1.679	0.308	1.692
14	0.604	1.480	0.506	1.659	0.329	1.671
15	0.615	1.467	0.519	1.642	0.348	1.652
16	0.625	1.455	0.531	1.626	0.364	1.636
17	0.634	1.445	0.542	1.612	0.379	1.621
18	0.642	1.435	0.552	1.599	0.392	1.608
19	0.649	1.427	0.561	1.587	0.404	1.596
20	0.656	1.419	0.569	1.577	0.414	1.586

Fonte: (FUNK; DAMMANN; DONNEVERT, 2007)

Figura 1.14 Construção de carta de amplitude, utilizando a combinação de 95% de confiança para os limites de atenção e 99,7% para os limites de controle com n=2

1.4.3. Carta de média por amplitude

Essa carta-controle é uma junção das cartas de Shewhart de média e a carta de amplitude. Essa carta é hábil para o monitoramento de precisão em replicatas. Apenas amostras fortificadas podem ser utilizadas (TURUTA, 2015).

Sua construção requer também de 10 a 20 amostras analisadas em replicatas. Calcula-se a média de todas as análises, $\bar{x}$, e a média das amplitudes das amostras, $\bar{R}$ (Equação 1.65 e Equação 1.66).

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad \text{Equação 1.65}$$

$$\bar{R} = \frac{\sum R_i}{N} \quad \text{Equação 1.66}$$

n : número total de análises;

N : número de amostras.

Nessa carta apenas os limites de controle são utilizados. A linha central é composta pela média, $\bar{x}$, e os limites de controle são calculados pela Equação 1.67 e Equação 1.68. Os valores do fator A_2 são apresentados na Tabela 1.5. A Figura 1.15 ilustra a construção de uma carta-controle de média pela amplitude.

Tabela 1.5 Fator A_2 em função do número de replicatas de cada amostra

Quantidade de replicatas	A_2
2	1,88
3	1,023
4	0,729
5	0,577
6	0,483
7	0,419
8	0,373
9	0,337
10	0,308

Fonte: adaptado de TURUTA, (2015).

$$LSC = \bar{x} + A_2 \cdot \bar{R} \quad \text{Equação 1.67}$$

$$LIC = \bar{x} - A_2 \cdot \bar{R} \quad \text{Equação 1.68}$$

Figura 1.15 Carta de média pela amplitude, utilizando n=2.

1.4.4. Carta de diferença (Difference Chart)

A carta de diferença se baseia apenas na diferença de duplicatas de uma amostra de cada série (batelada). Essa carta é eficaz para detectar erros sistemáticos que ocorrem pela primeira vez durante uma análise de batelada. As amostras para esse tipo de carta podem ser brancas ou amostras fortificadas (FUNK; DAMMANN; DONNEVERT, 2007).

Para a construção da carta de diferença, 10 a 20 amostras são analisadas em duplicata. A linha central de uma carta de diferença é zero (0), pois é o valor ideal, considerando a diferença de duplicatas de uma mesma amostra. Os limites de qualidade são calculados:

- Pelo desvio padrão (s_d), como na Equação 1.69, sendo que os limites de atenção será duas vezes o desvio padrão ($L.A. = \pm 2 \cdot s_d$) e os limites serão 3 vezes o desvio padrão ($L.C. = \pm 3 \cdot s_d$).

$$s_d = \sqrt{\frac{\sum (d_i - \bar{d})^2}{n - 1}} \quad \text{Equação 1.69}$$

d_i : diferença da duplicata de cada amostra;

$\bar{d}$: média das diferenças;

n : número de amostras.

- b) Pela amplitude média (Equação 1.60), sendo o limite de atenção como 1,77 vezes a amplitude média ($L. A. = \pm 1,77 \cdot \bar{R}$) e os limites de controle sendo 2,65 vezes a amplitude média ($L. C. = \pm 2,65 \cdot \bar{R}$).

1.4.5. Carta de Valor alvo (Target Value Chart)

Como comentado anteriormente, as cartas controle se baseiam na distribuição normal dos resultados. A carta de valor alvo serve para aquelas situações em que a distribuição normal não rege os resultados. Os limites de qualidade são baseados em estudos empíricos ou em especificações legais. Os mesmos tipos de amostra da carta de Shewhart são possíveis de serem utilizadas para essa carta (FUNK; DAMMANN; DONNEVERT, 2007).

1.5. Analytical Quality Assurance Cycle

A validade e confiabilidade de um resultado analítico, como visto anteriormente, depende de três ferramentas da qualidade: Validação; Incerteza e Controle de Qualidade. É de se esperar que essas três ferramentas estejam ligadas umas às outras, já que se aplicam ao mesmo resultado. Essa interdependência entre as ferramentas foi mostrada através do Ciclo de Garantia da Qualidade Analítica (*Analytical Quality Assurance Cycle*, AQAC) (OLIVARES; LOPES, 2012).

O AQAC é representado na Figura 1.16. A validação é a primeira ferramenta a ser utilizada, fornecendo as informações necessárias para que o método seja considerado adequado ao uso ou não, fornecendo informações para a segunda ferramenta, que é o cálculo de incerteza, que, por sua vez, fornece a margem de confiança dos resultados, porém esses resultados só podem ser relatados, se for confirmada a manutenção das características iniciais de validação, confirmação essa, feita pelo controle de qualidade.

Figura 1.16 Diagrama que representa o Analytical Quality Assurance Cycle

Fonte: Reimpresso e traduzido de TrAC Trends in Analytical Chemistry, v. 35, Olivares, I. R. B.; Lopes, F. A., Essential steps to providing reliable results using the Analytical Quality Assurance Cycle, p. 109-21, Copyright (2012), com permissão da Elsevier.

Porém, essas ferramentas só podem ser ligadas se forem utilizados equipamentos calibrados e padrões analíticos certificados. Mas porque isso é importante? No centro do ciclo, está uma palavra, de importância extrema para o AQAC e também para a gestão de qualidade como um todo: Rastreabilidade.

1.6. Rastreabilidade Metrológica

Rastreabilidade é um termo amplo, mas especificamente, pode-se utilizar a definição de Rastreabilidade Metrológica. É a “propriedade dum resultado de medição pela qual tal resultado por ser relacionado a uma referência através duma cadeia ininterrupta e documentada de calibrações, cada uma contribuindo para a incerteza de medição” (Vocabulário Internacional de Metrologia, 2012).

Metrologia é a “ciência da medição e suas aplicações” (Vocabulário Internacional de Metrologia, 2012). Então quando se faz uma análise para saber a concentração de bisfenol A em amostra de água superficial, está se utilizando da metrologia, pois uma medição está sendo realizada.

De maneira mais simples, podemos avaliar uma situação cotidiana, que consiste em realizar uma pesagem na balança da farmácia. Onde está a garantia que um peso de, por exemplo, 75 kg referente a alguma pessoa, são realmente 75 kg? Poderíamos iniciar indagando o que é um quilograma?

O padrão do quilograma foi definido pelo Bureau International des Poids et Mesures (BIPM), na França. O BIPM tem um material feito de uma liga metálica, que se convencionou que sua massa era um quilograma. Tudo que se mede em relação à massa, tem como referência esse padrão. Mas o fabricante de cada balança teve que ir à França para adquirir esse padrão de referência para então fabricar a balança?

Os institutos metroológicos de cada país têm uma réplica do quilograma, que foi fabricado e calibrado seguindo normas internacionais tendo como referência o quilograma do BIPM. Em cada fábrica de balanças, existe uma outra réplica, que foi fabricada e calibrada tendo como referência o quilograma do instituto metroológico nacional. Assim, a balança é fabricada segundo a referência da fábrica, que por sua vez segue a referência do instituto nacional, que tem como referência o padrão do BIPM. Dessa forma, o resultado da medição da balança é indiretamente ligada por várias calibrações ao padrão internacional. Ou seja, é equivalente dizer que o resultado é rastreável ao Sistema Internacional de Unidades (SI).

Figura 1.17 Ilustração da Rastreabilidade Metroológica e sua relação com a cadeia ininterrupta de calibrações

Fonte: Autoria Própria.

Quando foi feita a réplica do quilograma para o instituto metroológico de cada país, uma incerteza foi associada à essa réplica. Por mais preciso que seja a fabricação, nada é exatamente igual e essa diferença, mesmo que mínima, é sentida quando se desce na cadeia de calibrações.

Por isso, cada calibração tem sua incerteza associada e vai ser embutida no resultado final, que foi medir $75,98 \pm 0,05$ kg (agora com uma incerteza hipotética de $\pm 0,05$ kg). A Figura 1.17 ilustra a rastreabilidade metrológica para melhorar a explicação.

Retornando ao exemplo da medição de concentração de bisfenol A em água superficial, é possível haver rastreabilidade metrológica ao SI? Com certeza, mas algumas considerações precisam ser feitas. A primeira delas é que a concentração de substância não é uma das sete grandezas do Sistema Internacional (massa, comprimento, tempo, corrente elétrica, temperatura termodinâmica, quantidade de substância e intensidade luminosa). Mas como a concentração em unidades de g/L se utiliza de uma grandeza do SI (massa), é sim possível que o resultado final seja rastreável ao Sistema Internacional.

A segunda consideração é que não existe um padrão de referência internacional para concentração. A única maneira de manter a rastreabilidade é calibrar os equipamentos utilizados nos ensaios, principalmente a balança analítica, vidraria volumétrica e micropipetas.

A terceira consideração é de que apesar do volume não ser uma grandeza SI, os equipamentos volumétricos também são calibrados por medições de massa e por isso também são rastreáveis.

A quarta e última consideração é a de que utilizando padrões certificados (fabricados em conformidade com a ISO Guia 34 e com incerteza associada), todas as análises da etapa de validação e controle de qualidade passam a ser rastreáveis ao SI. Essas considerações devem responder por quê é importante calibrar os equipamentos e utilizar padrões analíticos certificados. Agora, será que utilizando-se de apenas um desses: calibrar equipamentos ou utilizar padrões certificados, o resultado final continua rastreável?

Sim. Continua rastreável. Porém, a incerteza associada ou à calibração dos equipamentos ou do padrão certificado ficará negligenciada, gerando um resultado com incerteza subestimada, o que já é um problema frequente no cálculo de incerteza (THOMPSON; ELLISON, 2012). No entanto, é melhor tornar o resultado rastreável do que não ter nenhuma fonte de rastreabilidade.

Deve se perceber que Rastreabilidade está intimamente ligada à Incerteza da medição. Entende-se que Rastreabilidade provê o meio pelo qual duas medidas podem ser comparadas e a Incerteza é a métrica da comparação (ELLISON; WILLIAMS, 2012).

A falta de rastreabilidade metrológica, por fim, é a última e maior explicação de porque os resultados de artigos, teses, dissertações e demais textos científicos muitas vezes, podem não ser reproduzíveis. Sem rastreabilidade, não há comparação. Se duas medidas não possuem a

mesma referência, não podem ser comparadas. Ainda mais, duas medidas sem referência alguma!

1.7. Considerações finais

O *Analytical Quality Assurance Cycle* reúne as três ferramentas da qualidade mais importantes para aplicação em laboratórios de análises: Validação, Incerteza e Controle de Qualidade. Além disso destaca que, no mesmo nível de importância, a calibração de equipamentos e uso de padrões analíticos certificados são essenciais para conquistar a Rastreabilidade Metrológica dos resultados de medição.

Sem Rastreabilidade a comparação de duas medições feitas em laboratórios diferentes é muito dificultada pois é extremamente complicado comparar medições sem o mesmo padrão de referência. Por isso é necessário que laboratórios de pesquisa e desenvolvimento, não só os universitários, apliquem os conceitos de Garantia da Qualidade e Controle de Qualidade para prover Rastreabilidade Metrológica a seus resultados de medição para que a Reprodutibilidade dos resultados seja favorecida.

1.8. Referências Bibliográficas

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (ANA); COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). **Guia nacional de coleta e preservação de amostras guia nacional de coleta e preservação de amostras:** água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos. Brasília: ANA, 2011. 327 p.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA); AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION(AWWA); WATER ENVIRONMENT FEDERATION (WEF). **Standard methods for the examination of water and wastewater.** 22nd ed. Washington: APHA, 2012. 1469 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR ISO/IEC 17025:** Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2005. 37 p.

COORDENAÇÃO GERAL DE ACREDITAÇÃO (CGCRE). **DOQ-CGCRE-008:** Orientação sobre validação de métodos analíticos. 2011. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?tOrganismo=C alibEnsaio> Acesso em: 10 out. 2012.

COORDENAÇÃO GERAL DE ACREDITAÇÃO (CGCRE). **DOQ-CGCRE-020:** Definições de termos utilizados nos documentos relacionados à acreditação de laboratórios, produtores de materiais de referência e provedores de ensaios de proficiência. 2013. Disponível em:

<http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?tOrganismo=C_alibEnsaio> Acesso em: 20 out. 2012.

COSTA, Sérgio Pereira da. **Aplicação de ferramentas da qualidade no desenvolvimento de métodos multiresíduos**. 2012. 137 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

ELLISON, S. R. L.; RAMSEY, M. H. (Ed.). **Eurachem/Citac Guide: Measurement uncertainty arising from sampling: a guide to methods and approaches**. 2007. Disponível em: <www.eurachem.org>. Acesso em: 15 jul. 2013.

ELLISON, S. R. L.; WILLIAMS, A. (Ed.). **Eurachem/Citac Guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement**. 3rd ed. 2012. Disponível em: <<http://www.measurementuncertainty.org/mu/QUAM2000-1.pdf>> Acesso em: 15 jul. 2013.

EUROPEAN COMMISSION HEALTH; CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL. **SANCO/12571/2013**: Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. 2014. Disponível em: <http://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/allcrl/AqcGuidance_Sanco_2013_12571.pdf> Acesso em: 30 maio 2014.

FUNK, W.; DAMMANN, V.; DONNEVERT, G. **Quality assurance in analytical chemistry**. Weinheim: WILEY-VCH, 2007. 302 p.

GRØN, C.; HANSEN, J. B.; MAGNUSSON, B.; NORDBOTTEN, A.; KRYSELL, M.; ANDERSEN, K. J.; LUND, U. **NT Technical Report 604: Uncertainty from sampling - a nordtest handbook for sampling planners on sampling quality assurance and uncertainty estimation**. 2007. Disponível em: <www.nordicinnovation.net>. Acesso em: 02 abr. 2012.

GUPTA, P. Beyond PDCA – a new process management model. **Quality Progress**, v.39, n 7, p. 45-52, 2006.

HARVEY, D. **Modern Analytical Chemistry**. Toronto: McGraw-Hill, 2000. 230 p.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). **Compendium of chemical terminology, 2nd ed. (the “Gold Book”)**. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 2014. 1670 p.

JOINT COMMITTEE FOR GUIDES IN METROLOGY. **Vocabulário internacional de metrologia** – Conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM 2012). 2012. Disponível em: <www.inmetro.gov.br/inovacao/publicacoes/vim_2012.pdf> Acesso em: 31 out. 2014.

KANE, J. S. Analytical bias: the neglected component of measurement uncertainty. **The Analyst**, v. 122, n. 11, p. 1283–88, 1997.

KONIECZKA, P.; NAMIESNIK, J. **Quality assurance and quality control in the analytical chemical laboratory**. New York: CRC, 2009. 239 p.

MAGNUSSON B. ; ÖRNEMARK U. (Ed.). **Eurachem guide**: the fitness for purpose of analytical methods – a laboratory guide to method validation and related topics. 2nd ed. 2014. Disponível em :< www.eurachem.org>. Acesso em: 23 fev. 2015.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H. I.; JARDIM, C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–80, 2004.

MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. 5th ed. Harlow: Pearson Education Limited, 2005. 285 p.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Manual de validação, verificação/confirmação de desempenho, estimativa da incerteza de medição e controle de qualidade intralaboratorial**. Brasília: CGAL, 2014. 38 p.

OLIVARES, I. R. B.; LOPES, F. A. Essential steps to providing reliable results using the analytical quality assurance cycle. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 35, p. 109–21, 2012.

THOMPSON, M (Ed.). The amazing Horwitz function. **AMC Technical Brief**, n 17, 2004. Disponível em:< [amc\amctb\statssc\horwitztb_v2.doc](#) > Acesso em: 01 maio 2014.

THOMPSON, M (Ed). Why are we weighting? **AMC Technical Brief**, n. 27, 2007. Disponível em:< [Data\amc\amctb\stats\calibration\weighting_v4](#)> Acesso em: 11 nov. 2014.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R. Dark uncertainty. **Analytical Methods**, v. 4, n. 9, p. 2609, 2012.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Quality assurance schemes for analytical laboratories: harmonized guidelines for single- laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835–55, 2002.

TURUTA, Tatiana Barbosa. **Aplicação de cartas de controle como ferramenta de melhoria frente às dificuldades operacionais de laboratórios acreditados na ABNT NBR ISO/IEC 17025**. 2015. 67 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. (USEPA). **Guidance for methods development and methods validation for the RCRA program**. 2006. Disponível em: <<http://www.epa.gov/wastes/hazard/testmethods/pdfs/methdev.pdf>> Acesso em: 05 set. 2011.

VANDER HEYDEN, Y.; NIJHUIS, A.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDEGINSTE, B.G.M; MASSART, D.L. Guidance for robustness / ruggedness tests in method validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, n. 5-6, p. 723– 753, 2001.

Capítulo 2: Aperfeiçoamento de técnica de preparo de amostras e aplicação de conceitos de Garantia da Qualidade

2.1.Introdução

Os anos de 2014 e 2015 foram terríveis para a população de São Paulo, mais especificamente da metrópole, no tocante ao desabastecimento hídrico. Diante das soluções apresentadas pela governança pública, entre eles, o racionamento, a transposição de águas de rios próximos à capital e mais recentemente a reversão do curso do rio Pinheiros para a Represa Billings e retomada do projeto de saneamento da mesma, geraram uma demanda altíssima no Planejamento Ambiental dessas medidas e do Gerenciamento Integrado dos Recursos Hídricos (LOBEL, 2015). Ao envolver planejamento e execução de medidas, uma linguagem harmonizada precisa ser utilizada para que pesquisadores, planejadores e entidades públicas se compreendam mutuamente e menos esforço seja empregado para entender a situação. Nessa linha, o conceito de serviços ecossistêmicos tem sido muito utilizado por pesquisadores e planejadores, pois é um conceito completo, descrevendo todos os benefícios que a sociedade pode obter dos ecossistemas (CONSELHO DE AVALIAÇÃO ECOSSISTÊMICA DO MILÊNIO, 2005).

Diante das opções frente ao desabastecimento uma, em especial, tem tido maior atenção, tanto no cenário nacional quanto mundial: o reuso de água. O tratamento anaeróbico, necessário para tornar os efluentes em água potável, consome menos energia do que o tratamento convencional aeróbio e pode gerar biogás. Dessa forma o efluente pode ser considerado como uma fonte de recursos hídricos e de energia. A água de reuso seria melhor aproveitada se fosse tratada em unidades menores, descentralizadas e então o maior problema surge: controle da qualidade da mesma (HERING et al., 2013).

Para isso, um contínuo avanço nas técnicas analíticas é requerido, para que cada vez seja mais fácil e rápido analisar contaminantes e patógenos. Esta tese trata desse requisito, pelo aprimoramento de uma técnica de preparo de amostras para aplicação em diagnóstico ambiental de microbacias hidrográficas para alguns contaminantes, porém, sempre visando a rastreabilidade metrológica anteriormente discutida. Todos os procedimentos que permeiam esse desenvolvimento, desde a amostragem à determinação, também são descritos.

2.1.1. Recursos hídricos e paisagem

A zona litorânea e algumas áreas do interior do estado de São Paulo, que concentram bacias hidrográficas importantes para o abastecimento da população, são exemplos de áreas que têm sido muito afetadas pela poluição provinda das concentrações urbanas, através de descartes de esgotos sanitários nos rios e descartes diretos no mar além da presença de indústrias de grande porte e atividades petrolíferas. Em razão disso, é necessário que hajam esforços na identificação dos poluentes e de suas fontes e no planejamento para evitar e também remediar a degradação dessas áreas com grande importância econômica e rica biodiversidade.

Áreas de estudo com microbacias hidrográficas de diferentes usos, como o uso antrópico (pastagem, área urbana, etc.), de reflorestamento (silvicultura) e também com mata nativa são ótimos lugares para se estudar a influência do uso da paisagem e sua correlação com a qualidade da água.

A “paisagem”, entendida como tudo aquilo que cerca o curso fluvial (mata ciliar, presença de indústrias, casas, etc.), tem influência direta nos fluxos de matéria e energia de um rio. Por essa razão, a análise de parâmetros de qualidade de água aliando-se à observação da paisagem permite uma avaliação mais completa da modificação da oferta de serviços ecossistêmicos hídricos, que por fim permite planejar o manejo integrado das bacias, conservando esse recurso indispensável para as atividades humanas (LIMA, 2011).

2.1.2. Compostos de Interesse

Alguns compostos como hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs), benzeno, tolueno, etilbenzeno, misturas de xilenos (conhecidos pela sigla BTEX) e surfactantes, bem como seus produtos de degradação, podem ser facilmente encontrados em compartimentos ambientais pela facilidade de entrada no ambiente por se tratarem de resíduos de atividades cotidianas dos centros urbanos, podendo ser quantificados e utilizados para avaliar a contaminação de áreas próximas e distantes de áreas urbanizadas.

Hidrocarbonetos poliaromáticos são compostos que possuem dois ou mais anéis aromáticos conectados (Figura 2.1). Essa classe de contaminantes entra no ambiente através da atmosfera, tendo sua gênese na queima de combustíveis fósseis, queimadas de florestas, pirólise, incineração de resíduos e refinarias de petróleo. Por apresentarem uma maior lipofilicidade, são majoritariamente encontrados em sedimentos (com alto teor de matéria orgânica), material particulado na atmosfera (fuligem), mas também podem ser encontrados em

matrizes aquosas, ainda que em baixas concentrações. Através de processos de bioacumulação e biomagnificação, estes compostos, presentes principalmente em sedimentos e em menores quantidades nas águas, podem ser encontrados em diferentes níveis tróficos, tornando-se disponíveis aos seres humanos podendo causar, muitas vezes, diferentes tipos de câncer (BOFFETTA; JOURENKOVA; GUSTAVSSON, 1997; GORDON; CALLAN; VICKERS, 2008; RODRIGUES et al., 2010).

Figura 2.1 Hidrocarbonetos aromáticos escolhidos para análise.

O benzeno, o tolueno, o etilbenzeno e os xilenos são compostos com apenas um anel aromático e caracterizados pela alta volatilidade, se enquadrando na classe de Contaminantes Orgânicos Voláteis (*Volatile Organic Contaminants*, VOCs) e estão representados na Figura 2.2. Todos eles podem ser encontrados de forma natural (no petróleo, em emissões de vulcões, em frutas, legumes e plantas), porém as ações antrópicas são as maiores fontes desses poluentes. Por estarem presentes no petróleo cru (com exceção do etilbenzeno, que é adicionado ao combustível refinado como aditivo), majoritariamente são emitidos durante a queima de combustíveis derivados do mesmo (principalmente gasolina e diesel). Além disso, são muito utilizados como solventes para tintas e recobrimentos, em resinas, borrachas, adesivos e ainda

como intermediários na indústria para produção de vários produtos (explosivos, detergentes, fármacos, entre outros). A exposição crônica a esses compostos também pode provocar câncer (INTERNATION AGENCY OF RESEARCH IN CANCER, 1989, 1992, 1996; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

Figura 2.2 Benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos

Alquilfenóis (nonilfenol, octilfenol, entre outros) são compostos xenobióticos, produtos de degradação de surfactantes alquilfenóis etoxilados (Figura 2.3). O surfactante nonilfenol etoxilado apresenta uma vasta aplicação na indústria e também no trato doméstico sendo utilizado como detergente, emulsificante, agente de dispersão, umidificador entre outras aplicações. O nonilfenol etoxilado é parcialmente degradado a nonilfenol nas Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs), tornando as ETEs as maiores fontes de contaminação de nonilfenol no ambiente.

Figura 2.3 Nonilfenol e octilfenol

Nonilfenol e octilfenol são compostos de um anel aromático e uma cadeia de nove e oito carbonos respectivamente, que são para-posicionadas à hidroxila. Por ser uma molécula lipofílica encontra-se em maior quantidade em sedimentos, podendo ser também encontrada

dissolvida em água em pequenas quantidades. O nonilfenol é um disruptor endócrino (*Endocrine Disrupting Compounds*, EDC), caracterizado por induzir proliferação de células cancerígenas da mama e mimetizar o hormônio natural 17 β -estradiol, competindo pelo receptor hormonal (FIEDLER et al., 2007; SOARES et al., 2008).

2.1.3. Técnicas de preparo de amostras

Para avaliar essa contaminação no ambiente precisa-se de uma ferramenta de extrema importância: a Química Analítica. No entanto, os próprios procedimentos analíticos podem gerar novos resíduos que às vezes são até mais danosos do que os compostos analisados, corroborando para que o círculo de insustentabilidade continue. Diante disso, em meados da década de 1980, surgiu uma nova perspectiva para que os métodos analíticos fossem “amigos” do meio ambiente. Essa nova perspectiva, denominada Química Analítica Verde tem como intuito a busca de alternativas práticas para tratamento dos resíduos e rejeitos e, substituir os métodos de análise poluidores por tecnologias mais limpas (ARMENTA; GARRIGUES; DE LA GUARDIA, 2008).

A Química Analítica Verde propõe algumas formas de reduzir o impacto dos processos analíticos. Em primeiro lugar lista-se a diminuição do uso de solventes no pré-tratamento da amostra; em segundo lugar, a redução da toxicidade dos solventes e reagentes utilizados; em terceiro, o desenvolvimento de técnicas diretas, que não necessitem de solventes e reagentes na análise. A última proposta pode-se dizer que é o ponto chave, pois uma metodologia direta dispensa as duas primeiras propostas (ARMENTA; GARRIGUES; DE LA GUARDIA, 2008; LAAKS; JOCHMANN; SCHMIDT, 2012).

Infelizmente, na maioria das vezes, é impossível analisar diretamente uma amostra coletada. Por isso, a amostra precisa passar pela etapa de Preparo de Amostra. O objetivo da etapa de preparo de amostras é retirar o analito da matriz (que não pode ser inserida no equipamento diretamente) de uma forma que seja passível de ser analisado. As melhores técnicas são aquelas que conseguem combinar a extração do analito, sua pré-concentração e o clean-up (por causa da seletividade, os interferentes não são extraídos). É uma das etapas do processo analítico em que contaminações podem ocorrer facilmente (PRIETO et al., 2010).

Existem, principalmente, as técnicas adsortivas e sortivas de preparo de amostras. As adsortivas se pautam no preenchimento de sítios livres na superfície de suas fases extratoras e os mecanismos de adsorção podem ser físicos (mais fáceis de desorver) e químicos (muito difíceis de desorver). A grande desvantagem dos métodos adsortivos é que está limitada à

extração de compostos muito apolares e a dessorção térmica resulta em uma baixa recuperação (não consegue quebrar as interações mais fortes). Já as técnicas sortivas de preparo de amostras, se utilizam da absorção dos analitos pela fase extratora e a taxa com que o analito é extraído é ditado pelo coeficiente de partição, por isso são denominadas técnicas de equilíbrio. A dessorção pode ser realizada por um solvente com o qual o analito tenha mais afinidade ou termicamente (BALTUSSEN; CRAMERS; SANDRA, 2002).

Os sorventes são materiais que possuem temperatura de transição vítrea (T_g) muito baixa (menor que a temperatura ambiente). A consequência disso é que o material se comporta como um líquido, e como geralmente são polímeros, assemelham-se ao comportamento de solventes orgânicos. A principal fase sortiva utilizada é o polidimetilsiloxano (PDMS), que possui uma T_g de -127°C . PDMS é não tóxico, altamente hidrofóbico, termoestável, translucido e não bioacumula. Quando imerso em solventes apolares, apresenta “inchamento” comum aos polímeros que absorvem o solvente. Ao contrário, em solventes polares como a água, não apresenta o inchamento. Essa propriedade frente aos solventes polares é o que habilita o PDMS a ser usado para a extração, pois apenas os compostos com maior afinidade são extraídos (BALTUSSEN; CRAMERS; SANDRA, 2002; SEETHAPATHY; GÓRECKI, 2012).

As propriedades de partição e permeabilidade do PDMS são os fatores que regem a extração. O tempo de extração de um composto a uma dada temperatura é função do volume de fase, a razão entre volume e superfície da fase sortiva, agitação da matriz, coeficiente de partição do composto, condição de camada no entorno da superfície e o coeficiente de difusão do analito. Por causa de sua baixa temperatura de transição vítrea (e ser utilizado a temperaturas muito mais altas que a T_g) as diferenças de permeabilidade dos compostos através do PDMS são governadas principalmente pelo coeficiente de partição dos analitos (SEETHAPATHY; GÓRECKI, 2012).

Desde 1980 as técnicas sortivas têm sido introduzidas. Nas últimas décadas, foram desenvolvidas várias técnicas, como a *Solid Phase Microextraction* (SPME) e *Stir Bar Sorptive Extraction* (SBSE), que são técnicas que se apoiam na última proposta da Química Analítica Verde, ou seja, técnicas diretas (ARMENTA; GARRIGUES; DE LA GUARDIA, 2008; LAAKS; JOCHMANN; SCHMIDT, 2012).

A SPME foi introduzida por Pawliszyn como uma miniaturização da técnica *Solid Phase Extraction* (SPE) (ARTHUR; PAWLISZYN, 1990). Enquanto a SPE utilizava pouco solvente para a dessorção dos analitos da fase sólida na qual estavam retidos, a SPME foi introduzida como uma técnica isenta de solventes, na qual um fio de sílica fundida é recoberto, numa extremidade, por uma camada de material sorvente ou adsorvente, o qual é mergulhada

na amostra, ocorrendo a retenção de analitos e posterior dessorção térmica em cromatógrafo. Pode-se utilizar essa fibra também em *headspace* para retenção de analitos voláteis e semivoláteis. A SPME abrange várias etapas combinadas como extração, pré-concentração e clean-up. Porém, possui desvantagens como a facilidade em quebrar a fibra de sílica e baixa capacidade de extração devido ao pequeno volume de fase empregado (LAAKS; JOCHMANN; SCHMIDT, 2012; RAMOS, 2012).

O desenvolvimento dessa técnica envolve a busca por novas fases sortivas e o desenvolvimento de adaptações analíticas para melhoras nos limites de detecção do método. Uma das otimizações em SPME foi o emprego da refrigeração da fase sortiva utilizando-se CO₂ ou N₂ líquido, o que acarreta num deslocamento da constante de distribuição dos analitos na fase, aumentando assim a concentração de analitos (FARRÉ et al., 2010; MARTENDAL; CARASEK, 2011a; MENEZES; DE LOURDES CARDEAL, 2011; RAMOS, 2012)

A técnica *Stir Bar Sorptive Extraction* foi introduzida por Baltussen et al. (1999) e consiste de uma barra magnética envolta por vidro com recobrimento de fase sortiva na superfície do vidro. Essa barra é então introduzida na solução e promove a agitação da solução e a sorção dos analitos. O princípio de funcionamento é similar a SPME, só que como o volume de fase sortiva é maior, a capacidade de extração também é maior. Também como na SPME, pode ser dessorvida termicamente ou em solvente (dessorção líquida). A principal desvantagem é a dificuldade em automatização do processo e haver poucas fases disponíveis comercialmente (RAMOS, 2012).

Por essa razão vários esforços foram feitos para desenvolver novas fases sortivas através dos mais variados modos de polimerização, entre eles a técnica sol-gel, processo de cura com molde, blocos monolíticos, por aderência química e física, precipitação por imersão, entre outros. Entre as fases desenvolvidas pode-se citar: poliuretanas, polivinil-álcool, carbowax, β -ciclodextrina, divinilbenzeno, carvão ativado, polipirrol, polímeros impressos molecularmente (MIPs), vinilpiridina, octilmetacrilato, entre muitos outros (GILART et al., 2014).

As adaptações da técnica passam por sua aplicação *on-site*, no qual a barra é presa a um agitador portátil e o preparo de amostras é feito em campo e a barra armazenada sob refrigeração para posterior análise em laboratório. Outra adaptação foi fazer uma barra de vidro em forma de alteres (o formato do vidro nas extremidades é como bolas). Como a fase sortiva fica entre essas bolas, a fase não fica em contato direto com o fundo do frasco de extração, evitando perdas de fase por fricção (GILART et al., 2014; HE; CHEN; HU, 2014).

Para métodos multirresíduos, foram desenvolvidas as *dual-phases twister*, nas quais numa mesma barra são depositados dois tipos de fase (uma apolar e outra polar) para extração

simultânea de compostos com coeficientes de partição muito diferentes. O esquema *multi-shot*, no qual várias barras, cada uma com uma fase diferente são colocadas na mesma amostra e depois dessorvidas simultaneamente no sistema de dessorção foi uma alternativa para compostos com diferenças no coeficiente de partição. O multi-shot também pode ser utilizado em condições diferentes de extração, com uma barra específica para cada condição, sempre dessorvendo as mesmas simultaneamente. E também a SBSE sequencial pode ser empregada, nas quais as condições de extração são modificadas sequencialmente na mesma amostra, com uma barra ou mais de uma (PRIETO et al., 2010).

A adaptação da técnica SBSE com refrigeração, ao contrário da SPME, não é tão desenvolvida. Contudo, esse desenvolvimento teve início no Instituto de Química de São Carlos, onde pesquisadores desenvolveram uma barra sortiva em tubo oco, na qual era possível fluir líquido refrigerante (água a 0°C) de forma a operar em *headspace* (a barra fica suspensa, acima da solução e os analitos volatilizados são absorvidos pela fase sortiva). Essa técnica foi nomeada de *Refrigerated Sorptive Extraction* (RSE) e suas vantagens ficam por conta da diminuição da quantidade de solventes utilizados no processo, a diminuição do efeito matriz e melhor capacidade de extração (CARMI et al., 2009; GROSSI, 2009). A miniaturização dessa barra pode ainda fornecer a possibilidade de dessorver termicamente, o que ainda não foi realizado.

2.1.4. Amostragem

A amostragem é uma das etapas de maior preocupação em um estudo ambiental (ou em qualquer outro estudo que empregue essa etapa). Segundo Leite (2005), a amostragem é o estágio mais importante na conquista de um resultado final sendo que, feito de forma errônea, a análise seja ela qualitativa ou quantitativa, perde seu valor científico, pois não corresponde à realidade. A amostragem é um termo amplo que abrange o planejamento, os equipamentos que se utilizam no processo, os locais que serão amostrados, a representatividade dos locais, os técnicos que farão a amostragem, a preservação dessas amostras e o transporte dessa amostra até o laboratório e acondicionamento na estrutura laboratorial.

Como se pode observar, são muitos os fatores que interferem na amostragem, tendo um componente de incerteza muito alto que influencia todo o método e a medida dessa incerteza é um parâmetro importante para descrever a qualidade dos resultados. No entanto, essa incerteza é pouco avaliada e métodos para controle e gerenciamento da amostragem são pouco aplicados. Por essa razão, existem guias de validação e cálculo de incerteza na amostragem, como o guia

Eurachem (EURACHEM/CITAC, 2007) e NordTest (GRØN et al., 2007), que trazem explicações sobre como estimar a incerteza da amostragem, obtendo-se assim resultados mais confiáveis.

A Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) e a Agência Nacional de Águas (ANA) empreenderam em conjunto a elaboração de um guia para coleta de água e sedimento e biota aquática. Nesse guia, as técnicas, equipamentos, soluções de preservação, planejamento e controle de qualidade são abordados, trazendo um padrão de como a coleta é feita (AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS; COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2011).

2.1.5. Sistemas de Gestão da Qualidade

A acreditação formal em normas internacionais tem sido extensivamente aplicada em laboratórios de rotina, em sua maioria, privados. Como exemplo destacam-se os laboratórios ambientais, que apresentam a obrigatoriedade em serem acreditados pela NBR ISO/IEC 17025:2005 para prestar serviços no estado de São Paulo para os órgãos integrantes do Sistema Estadual de Administração da Qualidade Ambiental, Proteção, Controle e Desenvolvimento do Meio Ambiente e Uso Adequado dos Recursos Naturais – SEAQUA conforme definido pela Portaria SMA 100 de 2013 (ESTADO DE SÃO PAULO, 2013), ou ainda para as análises de potabilidade de água, que, segundo a Portaria MS 2914 de 2011 (BRASIL, 2011) exige que os laboratórios comprovem a existência de sistema de gestão da qualidade, conforme os requisitos especificados na NBR ISO/IEC 17025:2005.

Destaca-se que o investimento em implementar um Sistema de Gestão de Qualidade (SGQ) é recuperado, pois o laboratório presta serviços para essas entidades. Laboratórios de pesquisa e desenvolvimento, em sua maioria alocados em universidades, tem muita dificuldade para implantar e manter a acreditação formal nessas normas, porque o investimento não é recuperado já que o objetivo desses laboratórios não é a prestação serviços e dependem de agências de fomento cujo repasse por projeto é fixo. No entanto, como elucidado no capítulo anterior, existe o problema de não se conseguir a reprodutibilidade de resultados gerados pelos laboratórios de pesquisa de universidades quando não são aplicados conceitos de Garantia e Controle de Qualidade no laboratório. Dessa forma, a credibilidade dos resultados é posta em xeque (ADAMS et al., 1998).

Uma alternativa para os laboratórios de pesquisa e desenvolvimento para garantir a rastreabilidade e credibilidade de seus resultados é aplicar ferramentas da qualidade

apropriadas. Alguns guias foram publicados para auxiliar nessa implantação, como o Guia Eurachem/Citac (ADAMS, et al., 1998) e mais recentemente, Olivares e Lopes (2012) criaram a ferramenta *Analytical Quality Assurance Cycle* (AQAC) que traz os mais importantes requisitos técnicos da norma ISO/IEC 17025:2005, a saber, a Validação de métodos, a estimativa de Incerteza e o Controle de Qualidade Intralaboratorial. A ferramenta AQAC é um meio fácil de implantar um Sistema de Gestão de Qualidade adaptado às realidades dos laboratórios de pesquisa universitários.

2.2. Objetivos

Objetivo 1

Desenvolvimento de método para análise de compostos voláteis e semivoláteis pelo acoplamento das técnicas *Refrigerated Sorptive Extraction* e *Gas Chromatography* (RSE/GC).

Metas

- i) Aperfeiçoamento instrumental da técnica *Refrigerated Sorptive Extraction*;
- ii) Planejamento de Experimentos;
- iii) Validação do método;
- iv) Amostragem;
- v) Análise das amostras e interpretação dos resultados.

Objetivo 2

Aplicação da ferramenta *Analytical Quality Assurance Cycle* como meio de garantir a confiabilidade e rastreabilidade dos resultados em laboratórios de pesquisa universitários.

Metas

- i) Aplicação dos conceitos de Validação, Cálculo de Incerteza da Amostragem e da Análise e Controle de Qualidade;
- ii) Prover um meio de calibrar os equipamentos e utilizar padrões certificados.

2.3. Materiais e métodos

2.3.1. Reagentes e Materiais

O solvente acetona grau HPLC foi adquirido da Panreac (Barcelona, ESP). Polidimetilsiloxano (PDMS) e agente de cura Sylgard 184, Dow Corning (Midland, USA). Os 16 hidrocarbonetos poliaromáticos (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, indeno[1,2,3-c,d]pireno, dibenzo[a,h]antraceno e benzo[g,h,i]perileno), BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) e alquilfenóis (n-octilfenol e n-nonilfenol) foram adquiridos da Fluka e Supelco (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Para a etapa de amostragem, frascos de vidro de borossilicato cor âmbar foram utilizados. Por não haver septo de teflon, foram aplicados pedaços de papel alumínio para evitar o contato entre amostra e tampa de plástico. Sondas de oxigênio dissolvido, pH, sólidos totais dissolvidos, temperatura e condutividade (Hanna Instruments, Ronchi di Illafranca, ITA). Foi utilizado 1 balde de aço inoxidável (5L), caixas de isopor (de tamanhos variados), recipiente com água destilada (5 L), pisseta, luvas nitrílicas, câmera fotográfica, GPS, pilhas, fita adesiva transparente, fita marrom para etiquetagem, caneta permanente/lápis, prancheta e papel, gelo, cabos/suporte para o balde de inox e canivete.

Para etapa analítica, foram utilizados: proveta de 25 mL, micropipetas de 10 e 100 µL (Eppendorf, USA) e microseringa de 10 µL (Hammilton, USA).

2.3.2. Equipamentos

Para a confecção da barra sortiva foi utilizado um molde usinado em teflon® na oficina mecânica do Instituto de Química de São Carlos. Foi utilizado também um tubo de aço oco (comprimento (L) de: 21,92 mm; diâmetro externo (d.e.) de 1,48 mm e diâmetro interno (d.i.) de 0,95 mm), além de bomba de vácuo modelo 166 da Fabbe-Primar Industrial Ltda (São Paulo, SP), uma estufa modelo 315 SE de marca Fanem (São Paulo, SP) e forno mufla Edgon 7000 3P da EDG Equipamentos (São Carlos, SP).

Para montagem do equipamento de extração sortiva, foi utilizado um vial para análises em headspace de marca Agilent com tubo de vidro soldado de cada lado; duas peças usinadas em teflon® com encaixe para a barra sortiva numa extremidade e mangueira na outra extremidade, ambas com anel de borracha (o-ring) para vedação do headspace; bloco de aquecimento em alumínio, revestido com manta isolante, para acoplar o vial e termômetro; agitador/aquecedor modelo C-MAG HS 7 da marca IKA; banho criostático modelo 521/3D Nova Ética.

As análises cromatográficas foram processadas em um cromatógrafo à gás com detector de ionização em chama (GC/FID 17 A Ver. 3 Shimadzu). A coluna cromatográfica foi RTX-XLB (5% de divinilbenzeno, 95% de dimetilsiloxano) 0,5 µm de fase e 30 m de comprimento.

2.3.3. Metodologia

2.3.3.1. Amostragem

A etapa de amostragem seguiu o Guia de Coleta e Preservação de Amostras para coleta de amostra de água bruta, sendo do tipo superficial, para análise de contaminantes orgânicos das classes pretendidas (AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS; COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2011). Para execução da amostragem, foi criado um procedimento, descrito no Apêndice 13.

2.3.3.2. Confecção da barra sortiva

A técnica de deposição do PDMS foi a cura em molde. A fase sortiva foi preparada misturando-se polidimetilsiloxano (PDMS) e agente de cura a 10% em massa, homogeneizando vigorosamente. A retirada das bolhas geradas na reação foi feita utilizando-se uma bomba de vácuo (30 minutos) e então, foi colocada no molde e novamente realizou-se vácuo (15 minutos). Após essa etapa, a barra de aço foi inserida para que a fase seja depositada sobre a superfície da mesma. A mistura foi então submetida à pré-cura a 100°C por 45 minutos e etapa de cura foi realizada logo após, a 200°C por 2 h. Esses parâmetros foram selecionados após Planejamento Experimental descrito em Costa (2012). Após essa etapa, a barra descansa até temperatura ambiente, sendo lavada em acetona. Após a secagem do solvente está pronta para uso.

2.4. Resultados e Discussão

2.4.1. Barra sortiva com recobrimento de PDMS

O esquema do molde desenvolvido na oficina mecânica do IQSC pode ser observado na Figura 2.4 e na Figura 2.5, as fotos do mesmo.

Figura 2.4 Diagrama esquemático do molde em teflon para deposição do PDMS na barra de aço

Fonte: (COSTA, 2012).

2.4.2. Montagem do protótipo para extração por RSE

A ideia inicial do projeto foi construir um equipamento que tivesse a refrigeração da fase sortiva pautada na mistura de gases CO_2 e ar comprimido. Esse sistema foi confeccionado por Costa (2012). Testes iniciais mostraram que era possível refrigerar a fase com o fluxo de gases, porém a maior dificuldade foi estabilizar a temperatura, pois a variabilidade da mesma foi muito grande ($\pm 5^\circ\text{C}$). No entanto, o que tornou a refrigeração com gases inviável foi o rápido consumo dos mesmos, sendo que um cilindro com 33 kg de CO_2 e custando R\$1200,00 teve seu volume diminuído à metade (aproximadamente) em apenas 5 testes realizados.

Diante dessa dificuldade, decidiu-se por uma alternativa mais viável de efetuar a refrigeração: um banho criostático. Apesar de o banho ter um custo mais elevado a princípio, o fluido refrigerante utilizado (no caso, o etanol) é mantido em refluxo dentro do sistema, ou seja, não há custos adicionais em adquirir mais fluido como no sistema com arrefecimento por gases. A maior vantagem em termos experimentais é o controle efetivo da variabilidade da temperatura de refrigeração, não sendo superior à $\pm 1^\circ\text{C}$, que irá refletir diretamente na precisão

do método, obtendo melhores resultados para esses parâmetros em comparação com o sistema com gases.

Figura 2.5 Molde em teflon. a) molde em teflon; b) barra de aço acoplada ao suporte; c) suporte e barra acoplados à uma das faces do molde; d) tarraxa envolvendo o molde; e) visão superior do molde completo; f) barra com fase sortiva acoplada ao suporte; g) barra confeccionada

Fonte: (COSTA, 2012).

O uso do banho criostático ocasionou um outro problema: vazamento do etanol no *headspace* do vial de extração (Figura 2.6). Isso ocorreu devido ao alto fluxo do bombeamento do etanol pelo banho (10 L/min) e por não haver um meio de vedar a junção entre barra de aço e a peça de teflon que sustenta a barra sortiva no headspace (por ter um diâmetro muito pequeno: 0,95 mm). Várias tentativas de vedação foram realizadas, incluindo fita veda-rosca e cola baseada em resina epóxi, ambas sem sucesso. A cola epóxi foi a que teve melhor chance de funcionar, porém o etanol conseguia dissolver a resina.

Ao observar a peça de teflon, foi possível identificar uma melhoria que possivelmente auxiliaria na resolução desse problema: a entrada da junção tinha um furo cônico, com diâmetro inicial maior que o diâmetro externo da barra de aço. Assim, um comprimento menor da barra fica em contato com a peça de teflon, o que favorecia o vazamento. A solução foi encontrada em usar uma nova peça, sem a abertura cônica e com um diâmetro ligeiramente menor que o anterior, fazendo com que a barra de aço fosse inserida de forma mais justa (Figura 2.7). Após essa modificação, não foram observados vazamento do etanol na junção em questão.

Para iniciar os estudos com a técnica, fixaram-se os parâmetros de extração baseando-se na literatura (COSTA, 2012; MARTENDAL; CARASEK, 2011a). A Tabela 2.1 descreve os parâmetros.

Figura 2.6: Detalhe da junção entre a peça de teflon e a barra de aço onde ocorria o vazamento de etanol

Figura 2.7: peças de teflon. Nova peça, à esquerda e antiga, à direita. Detalhe do furo cônico.

Outro problema de vazamento foi encontrado no próprio *headspace* para a atmosfera. Inicialmente, um único *o-ring* foi suficiente para garantir a vedação do *headspace* (Figura 2.8 a). No entanto, uma observação mais minuciosa pode averiguar que ao girar a peça de teflon em alguns ângulos, haviam pontos em que se podia observar vapores condensados além do *o-ring*, indicando vazamento. A primeira tentativa foi introduzir uma camada de fita veda-rosca para garantir a vedação, a qual não teve sucesso. Isso porque para uma camada muito espessa de fita, a peça não conseguia ser encaixada junto ao vidro, se pouco espessa, era ineficiente para vedar. Uma tentativa, indicada pelos mecânicos da oficina do IQSC, foi a inserção de um outro *o-ring* à frente do primeiro (Figura 2.8 b). Num primeiro momento, a questão do vazamento foi solucionada, mas, foi necessário muito cuidado no manuseio do sistema, pois em certas ocasiões a pressão interna expulsava a peça de teflon, ocasionando a perda do experimento.

Figura 2.8 Esquema de vedação com o-rings. a) vedação com 1 o-ring da peça antiga; b) peça nova com 2 o-rings

Tabela 2.1 Condições fixadas de extração por Refrigerated Sorptive Extraction

Parâmetros		Valores
Volume da matriz		10 mL
Temperatura de Aquecimento		113±5°C
Temperatura de Refrigeração*		5±1°C
Tempo total de extração*	60 minutos, sendo de 0 a 40 minutos aquecendo e de 40 a 60 minutos aquecendo e refrigerando simultaneamente	

* Parâmetros estudados por Martendal e Carasek (2011) para SPME refrigerada.

A dessorção líquida da barra após a extração não concentrava adequadamente os compostos para que fossem detectados nos limites descritos na Portaria MS 2914/2011 (BRASIL, 2011), que foi tomada como referência para os experimentos (Tabela 2.2). Entre a várias possibilidades levantadas, a ideia de se fazer a dessorção térmica da barra era uma ótima opção, mas o equipamento para acoplar ao GC/FID perfazia um total de R\$ 30.000,00, verba não disponível no projeto. Assim, a alternativa foi fazer a dessorção térmica no próprio injetor do GC (

Figura 2.9). Hoeck, David e Sandra (2007) compararam a dessorção térmica executada diretamente no injetor do GC e com equipamento comercial e os resultados demonstraram que a precisão em condições de repetibilidade, no primeiro caso, era um pouco afetada, mas que seria possível executar o experimento.

Muitos parâmetros necessitaram de ajuste. Os principais foram: fluxo de gás no injetor e temperatura do forno. O sistema comercial de dessorção térmica conta com uma câmara criostática para focalização dos compostos que vão sendo dessorvidos da barra. Como cada um

tem seu próprio equilíbrio na barra, são dessorvidos em tempos diferentes e a focalização serve para evitar alargamento dos picos. Assim, uma temperatura do forno da coluna mais baixa que o usual foi utilizada, para tentar focalizar os compostos na entrada da mesma. Durante o desenvolvimento do método, eliminar o *carry-over* na barra foi um grande desafio. Ao final dos experimentos, o método cromatográfico adaptado ao incremento da dessorção térmica no injetor foi estabelecido como apresentado nas Tabela 2.3 e Tabela 2.4.

Tabela 2.2 Limites para potabilidade definidos pela portaria MS 2914 (BRASIL, 2011)

Composto	Concentração Limite ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Benzeno	5
Tolueno	170
Etilbenzeno	200
Xilenos	300
Benzo[a]pireno	0,7

Tabela 2.3 Parâmetros do método cromatográfico desenvolvido para dessorção térmica no injetor

Parâmetros	Valores
Temperatura do forno da coluna	25°C
Temperatura do injetor	330°C
Modo de Injeção	Splitless
Tempo de Sampling	15 min
Modo de Controle de Fluxo	Pressão
Pressão	73 kPa
Fluxo Total	28 mL/min
Velocidade Linear	26,1 cm/s
Fluxo de Purga	0 mL/min
Razão do Split	01:25
Temperatura do Detector	350°C
Range	1
Sampling Rate	100 msec

Tabela 2.4 Programa de Temperatura do Forno (tempo total da corrida cromatográfica: 62 min)

Taxa ($^{\circ}\text{C/min}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo de Espera (min)
-	25	3
10	185	-
2	200	-
10	230	-
2	250	-
10	320	15,5

Figura 2.9 Ilustração do procedimento de inserção da barra sortiva no injetor do GC para dessorção térmica

1) Injetor; 2) injetor sendo aberto com chave específica; 3) desacoplando a parte superior com ajuda de luva de alta temperatura; 4) inserção da barra sortiva; 5) barra dentro do injetor; 6) fechamento do injetor.

Foram então determinados os tempos de retenção dos compostos. A Figura 2.10 traz o cromatograma dos compostos. Trata-se de uma extração de água destilada fortificada. Antes disso, cada composto foi injetado separadamente (solução-padrão) e observou-se um pequeno deslocamento dos tempos de retenção quando injetados em solvente e após a extração/dessorção térmica mas, a ordem de eluição não mudou. Para confirmar, água destilada foi fortificada com

compostos separados e extraídos, assim, foi possível observar que o tempo de retenção não mudou.

Os compostos menos voláteis (HPAs mais pesados) apresentam baixa recuperação, isso porque não se consegue atingir temperaturas mais elevadas para volatilizar os compostos que posteriormente são sorvidos na fase de PDMS refrigerada. Esse é o maior defeito do atual protótipo: se aumentar muito a temperatura, a pressão interna é capaz de lançar as peças de teflon e a barra sortiva para fora do sistema (vide Figura 2.8.b para esclarecimento). Como a vedação é feita apenas pelo contato entre *o-rings* e parede do vidro, a pressão é capaz de vencer o atrito entre *o-ring* e vidro e a peça de teflon é lançada para fora. É preferível então manter a temperatura de aquecimento mais baixa para que o sistema não “exploda” e o trabalho se perca (pois para vários compostos, essa temperatura já foi suficiente para alcançar bons resultados).

Figura 2.10 Cromatograma para extração água destilada fortificada na concentração de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ para HPAs e alquilfenóis e 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para BTEX

Como foi dito anteriormente, o *carry-over* foi um dos principais problemas para se resolver. Para comprovar que não havia mais *carry-over* ou que se houvesse, fosse não significativo, utilizou-se o resultado da extração do fortificado (50 $\mu\text{g L}^{-1}$ para HPAs e alquilfenóis e 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para BTEX) para comparação com um branco de água destilada

(experimentos em sequência com a mesma barra). A relação das áreas para os compostos na extração fortificada e do branco podem ser visualizadas na Tabela 2.5.

Tabela 2.5 Áreas do fortificado (50 µg L⁻¹ para HPAs e alquilfenóis e 2000 µg L⁻¹ para BTEX) e do branco e a porcentagem entre as áreas

<i>Composto</i>	<i>Fortificado</i>	<i>Branco</i>	<i>Branco/ Fortificado (%)</i>
Benzeno	44981,9	182,6	0,4
Tolueno	90122,4	474,3	0,5
Etilbenzeno	252440,4	1595,6	0,6
(m,p)-Xileno	701709,6	4917,8	0,7
o-Xileno	279964,8	2770,6	1,0
Naftaleno	99420,0	683,4	0,7
Acenaftileno	278647,0	2564,6	0,9
Acenafteno	307444,3	1847,0	0,6
Fluoreno	395874,2	5514,1	1,4
Octilfenol	163350,0	413,8	0,3
Fenantreno	352826,4	1372,3	0,4
Nonilfenol	344346,7	798,3	0,2
Antraceno	75294,5	1247,5	1,7
Fluoranteno	174800,9	858,2	0,5
Pireno	150364,3	726,4	0,5
Benzo[a]antraceno	33091,3	493,0	1,5
Criseno	26384,7	258,4	1,0
Benzo[b]fluoranteno	10636,9	203,8	1,9
Benzo[k]fluoranteno	8109,1	211,8	2,6
Benzo[a]pireno	4289,4	420,2	9,8
Dibenzo[a, h]antraceno	2935,1	544,3	18,5
Benzo[g,h,i]perileno	2844,9	878,8	30,9

Em geral, o *carry-over* é não significativo para a maioria dos compostos, sendo que as áreas dos picos do branco apresentam no máximo 2,6% em comparação com a amostra fortificada. Já para benzo[a]pireno (9,8%), dibenzo[a,h]antraceno (18,5%) e benzo[g,h,i]perileno (30,9%), não é possível afirmar tal colocação. No entanto, os picos observados no cromatograma do branco, que coincidem com os picos dos compostos, podem ser interferentes (provavelmente provindos de degradação da fase sortiva). Se o forem, seria normal que essas áreas se repetissem em outros experimentos. Para testar essa hipótese, mais duas extrações de branco de água destilada foram efetuadas para formar uma triplicata e observar o coeficiente de variação (CV). Os resultados podem ser visualizados na Tabela 2.6.

Para a maioria absoluta dos compostos, a repetibilidade acontece com valores aceitáveis (abaixo de 20%) e é cabível assumir que os resultados do branco podem ser associados a interferentes e não ao *carry-over* da barra como se queria provar. Cabe uma ressalva de que para dibenzo[a,h]antraceno e benzo[g,h,i]perileno, os CVs (1,2% e 8,1%, respectivamente) foram calculados para duplicatas porque na última análise um problema técnico ocorreu e os picos não foram detectados.

Tabela 2.6 Dados para a triplicata do branco

Composto	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Média	CV (%)
Benzeno	182,6	216,4	7,8	135,6	82,6
Tolueno	474,3	631,5	350,1	485,3	29,1
Etilbenzeno	1595,6	1510,9	1702,8	1603,1	6,0
(m+p)-Xileno	4917,8	5024,6	5114,8	5019,1	2,0
o-Xileno	2770,6	2590,0	2593,0	2651,2	3,9
Naftaleno	683,4	905,3	934,4	841,0	16,3
Acenaftileno	2564,6	3421,8	3393,4	3126,6	15,6
Acenafteno	1847,0	2579,8	2380,2	2269,0	16,7
Fluoreno	5514,1	5036,9	4116,1	4889,0	14,5
Octilfenol	413,8	475,3	357,1	415,4	14,2
Fenantreno	1372,3	1559,9	1365,3	1432,5	7,7
Nonilfenol	798,3	2242,9	2668,7	1903,3	51,5
Antraceno	1247,5	892,3	804,1	981,3	23,9
Fluoranteno	858,2	1005,6	972,5	945,4	8,2
Pireno	726,4	711,2	674,8	704,1	3,8
Benzo[a]antraceno	493,0	547,4	556,0	532,1	6,4
Criseno	258,4	331,5	290,5	293,5	12,5
Benzo[b]fluoranteno	203,8	189,8	268,3	220,6	19,0
Benzo[k]fluoranteno	211,8	149,2	188,4	183,1	17,3
Benzo[a]pireno	420,2	486,9	640,1	515,7	21,9
Dibenzo[a,h]antraceno	544,3	554,0	-	549,2	1,2
Benzo[g,h,i]perileno	878,8	783,3	-	831,1	8,1

Fixou-se uma concentração, chamada de “Ponto 1”, abaixo do limite para HPAs (definido como o limite para benzo[a]pireno da Portaria MS 2914/2011) sendo $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ e $20 \mu\text{g L}^{-1}$ para BTEX. A Tabela 2.7 mostra os resultados para a triplicata do ponto 1. Para a maioria dos compostos o CV é menor que 20%, que é um dos requisitos do guia de validação da USEPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2006) e encara-se esse fato de forma muito animadora, pois em um nível de concentração baixo, e levando-se em conta que há muito manuseio da barra (dessorção direta no injetor e no preparo de amostra), valores aceitáveis de

repetibilidade são alcançados para muitos compostos. No entanto, de uma forma geral, os compostos mais pesados possuem CV maior que 20% (com exceção do fenantreno, que não é dos mais pesados, mas apresenta 26,2% para o CV). A variação de temperatura de aquecimento durante a extração (que é de $\pm 5^{\circ}\text{C}$) pode ser a fonte desses valores para a repetibilidade.

Tabela 2.7 Dados para a triplicata do ponto 1 (0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para HPAs e alquilfenóis e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para BTEX)

Composto	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Média	CV (%)
Benzeno	170,4	155,3	195,1	173,6	11,6
Tolueno	421,8	495,7	607,7	508,4	18,4
Etilbenzeno	659,1	792,6	932,5	794,7	17,2
(M+p)-Xileno	2107,3	2575,9	2369,2	2350,8	10,0
o-Xileno	1088,3	1356,1	1521,7	1322,0	16,5
Naftaleno	964,9	660,7	949,2	858,3	20,0
Acenaftileno	3656,0	2983,9	3661,0	3433,6	11,3
Acenafteno	2734,9	2043,9	2616,2	2465,0	15,0
Fluoreno	5772,8	4914,8	4210,6	4966,1	15,8
Octilfenol	1278,5	1166,2	883,0	1109,2	18,4
Fenantreno	2307,7	1342,7	1883,5	1844,6	26,2
Nonilfenol	3746,8	3239,7	3600,8	3529,1	7,4
Antraceno	781,5	883,3	981,0	881,9	11,3
Fluoranteno	1673,6	1450,9	1227,7	1450,7	15,4
Pireno	1414,5	1339,1	1089,8	1281,1	13,3
Benzo[a]antraceno	574,7	815,3	414,3	601,4	33,6
Criseno	219,7	435,8	303,7	319,7	34,1
Benzo[b]fluoranteno	1597,3	1492,3	150,0	1079,9	74,7
Benzo[k]fluoranteno	283,5	178,7	256,5	239,6	22,7
Benzo[a]pireno	863,1	662,4	417,1	647,5	34,5
Dibenzo[a,h]antraceno	1329,4	829,1	657,8	938,8	37,2
Benzo[g,h,i]perileno	1923,1	877,8	870,7	1223,9	49,5

Utilizando-se dos resultados da triplicata do branco para verificar os limites de detecção, é possível observar que a triplicata do Ponto 1 não possui diferença estatística do branco (Figura 2.11). O guia EPA exige que o limite de detecção do método (LOD) seja considerado como 3 vezes o desvio padrão do branco ($3 \times s$) e o limite de quantificação do método (LOQ), como 10 vezes o desvio padrão do branco ($10 \times s$). Dentre todos os compostos, apenas octilfenol consegue satisfazer essa exigência para o LOD, mas não satisfaz a exigência para quantificação (Figura 2.12). Os demais não se distinguem estatisticamente, ou seja, se inserem no limite de confiança do resultado do branco.

Vale ressaltar que os limites de detecção estão sendo calculados em unidades de área e não concentração porque o que se está fazendo é tentar provar que a técnica consegue resultados aceitáveis para avaliar os compostos nos limites de potabilidade da Portaria MS 2914/2011. Posteriormente, com a curva de calibração, será possível determinar os limites de detecção em termos de concentração.

Figura 2.11 Intervalo de confiança (em unidades de área) para a triplicata do branco, considerado como LOD (média somada a 3 vezes o desvio padrão) e o resultado do ponto 1 para benzeno

Figura 2.12 Intervalo de confiança (em unidades de área) para a triplicata do branco, considerado como LOD (média somada a 3 vezes o desvio padrão) e o resultado do ponto 1 para octilfenol

Apesar da maioria dos compostos não conseguirem ser detectados nessa condição, e o mais indicado seria quantificá-los a uma concentração maior, a possibilidade de conseguir quantificar o octilfenol nessa concentração possibilitou a seguinte estratégia: aumentar as

replicatas do branco para ter-se uma estimativa de desvio padrão mais próxima da distribuição normal. Isso se consegue fazendo 6 replicatas ou mais. Assim, decidiu-se por fazer mais 4 replicatas e unir os dados às 3 replicatas já realizadas, utilizando-se de um teste F de Snedecor e um teste t de Student para observar se há diferença estatística entre as médias.

O teste F de Snedecor é utilizado para observar se há diferença estatística entre as variâncias de duas séries de resultados. A Equação 2.1 é utilizada para calcular o valor de F.

$$F = \frac{\frac{n_1}{n_1 - 1} \cdot SD_1^2}{\frac{n_2}{n_2 - 1} \cdot SD_2^2} \quad \text{Equação 2.1}$$

Sendo n_1 e n_2 , o número de replicatas de cada série de resultados; SD_1 e SD_2 , os desvios padrão de cada série de resultados. O valor de F deve ser sempre maior que 1, necessitando que o arranjo da expressão seja sempre que o numerador seja maior que o denominador. Por fim, compara-se o valor de F com o valor de F crítico (F_{crit}), obtido através do número de graus de liberdade para cada uma das séries de resultados e o nível de confiança exigido (geralmente 95% de confiança). Se $F > F_{crit}$, então existe sim, diferença estatística entre as variâncias das duas séries de resultados.

A aplicação do teste t de Student só é válida se o resultado do teste F confirmar que as variâncias não diferem estatisticamente. Para calcular o valor de t, utiliza-se a Equação 2.2:

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{(n_1 - 1) \cdot SD_1^2 + (n_2 - 1) \cdot SD_2^2}} \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2 \cdot (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}} \quad \text{Equação 2.2}$$

Sendo $\bar{x}_1$ e $\bar{x}_2$, a média de cada série de resultados. O valor de t é comparado com o valor de t crítico (t_{crit}), calculado pelo número de graus de liberdade ($g.l.$), e este sendo calculado pela Equação 2.3.

$$g.l. = n_1 + n_2 - 2 \quad \text{Equação 2.3}$$

Se $t > t_{crit}$, então há diferença estatística entre as médias e não podem ser combinadas para formar uma média única para os resultados.

Os testes estatísticos revelam que há sim diferença estatística entre as médias para a maioria dos compostos e elas não podem ser combinadas para formar uma só média dos valores do branco (Tabela 2.8). Assim, ou a triplicata inicial possui problemas ou a quadruplicata que foi feita depois. Então optou-se por substituir a triplicata inicial por uma nova triplicata, pois os resultados da quadruplicata seriam feitos com uma diferença de um dia dos novos resultados, enquanto a diferença entre a triplicata antiga e a quadruplicata foi de uma semana, sendo que as condições ambientais (temperatura, umidade etc) em uma semana podem variar muito, o que provavelmente gerou a diferença estatística. Os novos dados foram compilados na Tabela 2.9.

Tabela 2.8 Teste F e teste t para as 7 replicatas (triplicata antiga de 1 a 3 e quadruplicata nova de 4 a 7)

Compostos	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4	Rep. 5	Rep. 6	Rep. 7	Teste F	Teste t
Benzeno	182,60	216,40	7,80	11,70	13,60	17,40	4,10	22,52	2,29
Tolueno	474,30	631,50	350,10	83,30	97,60	60,60	108,60	7,66	5,75
Etilbenzeno	1595,60	1510,90	1702,80	130,70	125,00	95,00	164,30	3,81	29,84
(m+p)-Xileno	4917,80	5024,60	5114,80	405,80	374,40	214,90	280,00	1,27	66,82
o-Xileno	2770,60	2590,00	2593,00	159,80	203,60	117,70	112,10	2,73	44,74
Naftaleno	683,40	905,30	934,40	445,90	250,70	271,10	395,60	1,63	5,76
Acenaftileno	2564,60	3421,80	3393,40	1736,20	1251,00	1970,80	2378,30	1,16	3,55
Acenafteno	1847,00	2579,80	2380,20	950,80	730,10	1206,50	1517,00	1,26	4,30
Fluoreno	5514,10	5036,90	4116,10	8410,00	5202,20	6494,40	4780,30	2,04	1,30
Octilfenol	413,80	475,30	357,10	182,00	81,30	116,00	121,80	1,59	7,68
Fenantreno	1372,30	1559,90	1365,30	927,00	621,80	898,10	940,90	1,22	5,62
Nonilfenol	798,30	2242,90	2668,70	1945,20	1608,40	1286,50	1463,30	3,95	0,65
Antraceno	1247,50	892,30	804,10	434,40	365,10	121,80	195,70	1,82	4,94
Fluoranteno	858,20	1005,60	972,50	391,80	511,40	360,60	382,00	1,28	9,73
Pireno	726,40	711,20	674,80	164,80	31,80	118,00	38,90	2,15	15,36
Benzo[a]antraceno	493,00	547,40	556,00	368,10	327,60	148,60	415,30	3,03	3,06
Criseno	258,40	331,50	290,50	74,80	89,90	54,80	89,40	2,50	10,70
Benzo[b]fluoranteno	203,80	189,80	268,30	816,70	640,60	288,10	426,60	4,95	2,31
Benzo[k]fluoranteno	211,80	149,20	188,40	1278,20	1245,30	283,50	482,30	14,45	2,10
Benzo[a]pireno	420,20	486,90	640,10	696,20	1365,50	388,30	560,60	3,37	0,92
Dibenzo[a,h]antraceno	544,30	554,00		2760,90	2581,20	938,70	1315,70	117,61	2,51
Benzo[g,h,i]perileno	878,80	783,30		1904,20	1976,90	1292,70	1304,00	4,90	3,54

Pode-se observar que o Teste F não detecta diferenças na variância dos resultados e apenas naftaleno e nonilfenol apresentam diferença estatística nas médias ao nível de confiança de 95%. Dessa forma, excluindo os compostos supracitados, considerou-se esses dados válidos para estimar os limites de detecção. Para estimar o Limite de Detecção (LOD) e o Limite de Quantificação (LOQ), utilizou-se a Equação 2.4 e Equação 2.5.

$$LOD = \bar{x} + 3 \cdot s$$

Equação 2.4

$$LOQ = \bar{x} + 10 \cdot s$$

Equação 2.5

Tabela 2.9 Teste F e teste t para as 7 replicatas (quadruplicata de 4 a 7 e nova triplicata de 8 a 10)

Compostos	Rep. 4	Rep. 5	Rep. 6	Rep. 7	Rep. 8	Rep. 9	Rep. 10	Teste F	Teste t
Benzeno	11,70	13,60	17,40	4,10	11,20	20,60	5,50	1,53	0,15
Tolueno	83,30	97,60	60,60	108,60	111,00	119,50	63,70	1,63	0,55
Etilbenzeno	130,70	125,00	95,00	164,30	90,20	114,30	52,60	1,23	1,91
(m+p)-Xileno	405,80	374,40	214,90	280,00	503,90	233,00	146,90	2,40	0,23
o-Xileno	159,80	203,60	117,70	112,10	109,40	87,20	97,90	3,41	1,95
Naftaleno	445,90	250,70	271,10	395,60	174,40	207,10	181,40	4,90	2,70
Acenaftileno	1736,20	1251,00	1970,80	2378,30	1560,20	2152,90	1326,90	1,02	0,45
Acenafteno	950,80	730,10	1206,50	1517,00	829,40	1170,00	666,90	1,17	0,90
Fluoreno	8410,00	5202,20	6494,40	4780,30	6626,20	4595,30	5217,30	1,39	0,68
Octilfenol	182,00	81,30	116,00	121,80	67,50	92,60	70,50	2,71	1,89
Fenantreno	927,00	621,80	898,10	940,90	1051,90	1228,30	807,90	1,57	1,34
Nonilfenol	1945,20	1608,40	1286,50	1463,30	313,90	384,90	224,40	3,09	7,47
Antraceno	434,40	365,10	121,80	195,70	105,70	71,30	187,90	2,15	1,74
Fluoranteno	391,80	511,40	360,60	382,00	352,10	354,10	398,60	2,30	1,03
Pireno	164,80	31,80	118,00	38,90	95,50	129,00	125,80	3,09	0,73
Benzo[a]antraceno	368,10	327,60	148,60	415,30	242,60	368,40	387,70	1,31	0,23
Criseno	74,80	89,90	54,80	89,40	9,10	105,90	67,60	3,32	0,64
Benzo[b]fluoranteno	816,70	640,60	288,10	426,60	272,80	334,40	243,90	4,48	1,86
Benzo[k]fluoranteno	1278,20	1245,30	283,50	482,30	331,40	236,80	366,10	6,83	1,67
Benzo[a]pireno	696,20	1365,50	388,30	560,60	725,60	860,60	810,30	5,57	0,18
Dibenzo[a,h]antraceno	2760,90	2581,20	938,70	1315,70	800,80	656,30	1136,00	3,28	1,88
Benzo[g,h,i]perileno	1904,20	1976,90	1292,70	1304,00	1253,50	742,10	1643,00	1,37	1,31

Para os compostos: benzeno, etilbenzeno, o-xileno, m-xileno, p-xileno, octilfenol, fluoranteno e pireno, os resultados, considerando uma distribuição normal formada pela média dos resultados do Ponto 1, somada ao desvio padrão multiplicado por 1,96 (valor de t de Student para grau de liberdade infinito são maiores que o LOQ e é possível quantificá-los nessa concentração (0,5 µg L⁻¹ para HPAs e alquilfenóis e 20 µg L⁻¹ para BTEX). Vale lembrar que no ponto 1, a concentração do benzeno está fora do limite de potabilidade (que é de 5 µg L⁻¹). Se for diminuída para o limite de potabilidade, será possível apenas detectar o benzeno (apenas o LOD é satisfeito).

Tolueno e antraceno podem ser apenas detectados, já que as distribuições de seus resultados encontram-se entre o LOQ e o LOD. Já os compostos acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, benzo[a]antraceno, criseno benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno e benzo[g,h,i]perileno não conseguem ser detectados pelo método na concentração de 0,5 µg L⁻¹. A Tabela 2.10 traz um resumo dos resultados para os limites de detecção. Dessa forma é bem provável que após os devidos ajustes, a técnica possa atingir os limites da Portaria MS 2914/2011 para a maioria dos compostos.

Tabela 2.10 Resumo dos resultados para detecção dos compostos

Compostos	LOD	LOQ	Ponto 1*	S**	Detectabilidade
Benzeno	29,8	71,3	173,6	20,1	Quantificar
Tolueno	162,3	326,1	508,4	93,6	Detectar
Etilbenzeno	216,6	464,6	794,7	136,7	Quantificar
(m+p)-Xileno	682,7	1555,9	2350,8	234,8	Quantificar
o-Xileno	249,2	534,9	1322,0	218,7	Quantificar
Naftaleno	-	-	858,3	171,3	-
Acenaftileno	3033,6	5986,6	3433,6	389,5	ND [‡]
Acenafteno	1921,2	4047,2	2465,0	369,5	ND [‡]
Fluoreno	9982,2	19498,8	4966,1	782,4	ND [‡]
Octilfenol	224,8	505,4	1109,2	203,8	Quantificar
Fenantreno	1492,6	2816,9	1844,6	483,7	ND [‡]
Nonilfenol	-	-	3529,1	261,0	-
Antraceno	623,4	1583,9	881,9	99,8	Detectar
Fluoranteno	559,1	946,8	1450,7	223,0	Quantificar
Pireno	247,7	591,0	1281,1	169,9	Quantificar
Benzo[a]antraceno	606,4	1268,7	601,4	201,8	ND [‡]
Criseno	165,3	387,2	319,7	108,9	ND [‡]
Benzo[b]fluoranteno	1082,8	2601,7	1079,9	807,0	ND [‡]
Benzo[k]fluoranteno	1972,2	5166,1	239,6	54,4	ND [‡]
Benzo[a]pireno	1690,1	3831,2	647,5	223,4	ND [‡]
Dibenzo[a,h]antraceno	4032,7	10045,7	938,8	349,0	ND [‡]
Benzo[g,h,i]perileno	2733,7	5740,2	1223,9	605,6	ND [‡]

* Ponto 1(0,5 µg L⁻¹ para HPAs e alquilfenóis e 20 µg L⁻¹ para BTEX);** S: desvio padrão; ‡ND: não é possível detectar.

Após finalizar uma avaliação inicial do sistema e sua capacidade em atingir os LOQs necessários, também conseguiu-se um outro modo de vedar o *headspace*: soldar tubos com rosca e usinar uma nova peça de teflon com um degrau (*stopper*) para evitar que a peça seja lançada para fora por causa da pressão (Figura 2.13). Dessa forma, os problemas técnicos relacionados ao sistema foram sanados. O sistema completo pode ser observado na Figura 2.14.

Figura 2.13 Protótipo de extração. a) visão lateral da nova peça de teflon com *stopper* e *o-ring* e tubo de vidro com rosca; b) detalhe da tampa rosqueável

Figura 2.14 Protótipo de extração. a) unidade de extração no bloco de aquecimento e acoplada às mangueiras do banho criostático; b) sistema completo da *Refrigerated Sorptive Extraction*

2.4.3. Planejamento experimental

Foi utilizada a Matriz Doehlert para posterior regressão de Superfície de Resposta. O planejamento Doehlert foi utilizado por ser mais eficiente (menos experimentos para regressão do mesmo número de coeficientes no modelo). Martendal e Carasek (2011a,b) estudaram a recuperação de compostos voláteis e semivoláteis com SPME refrigerada (HPAs e ftalatos, sendo cada classe de compostos extraída em vials diferentes). O resultado para uma extração satisfatória para ambos foi começar a extração sem refrigerar a fase sortiva e depois de um tempo iniciar a refrigeração. Para isso fizeram um Planejamento Composto Central de dois fatores: o tempo total de extração e a porcentagem desse tempo em que a fase era refrigerada. A superfície de resposta mostrou que a uma temperatura de 160°C para aquecimento da matriz

(otimizada de forma univariada) e 5°C para refrigerar a fase sortiva (otimizada de forma multivariada, em um planejamento experimental prévio), os melhores resultados para HPAs foram com tempo total de extração 40 minutos e durante 50% desse tempo (ou seja, os 20 minutos finais) a fase deveria ser refrigerada.

Uma possível explicação encontrada pelos autores é a de que os compostos mais pesados (menos voláteis) teriam maior facilidade para difundir na fase com uma temperatura maior, por isso a absorção desses é facilitada no início da extração. Quando a refrigeração é iniciada, esses compostos ficam aprisionados na fase, porque sua capacidade de difundir no meio fica prejudicada e, é a vez dos mais voláteis serem absorvidos pela fase. O raciocínio é o inverso, pois os mais voláteis têm maior facilidade de difundir a temperaturas altas e “escapam” da fase, sendo pouco recuperados a altas temperaturas. Assim, quando a temperatura da fase é diminuída, a capacidade de extração desses compostos também aumenta. Dessa forma, foi possível extrair compostos voláteis e semivoláteis na mesma amostra com eficiência razoável.

Adotando o mesmo raciocínio desses autores, e aproveitando a informação pré-existente das temperaturas de aquecimento da matriz e de refrigeração da barra, o planejamento Doehlert foi feito com base nos mesmos fatores: tempo total de extração e fração do tempo em que a barra é refrigerada. A Tabela 2.11 mostra os fatores e os níveis escolhidos para os experimentos. Para a extração, 10 mL de água destilada foram fortificados na concentração de 5 µg L⁻¹ para HPAs e alquilfenóis e 170 µg L⁻¹ para os BTEX, com temperatura de aquecimento fixada em 160°C e temperatura de refrigeração da barra sortiva a 5°C.

Como o método é multirresíduos, precisa-se analisar conjuntamente a área de vários compostos. A variável dependente (resposta) não pode ser obviamente as áreas dos compostos separadamente, pois o esforço para avaliar caso a caso e observar as interações seria colossal. Como o ideal para o planejamento é maximizar os resultados de área dos picos de cada composto, pode-se usar a Função *Derringer* ou de Desejabilidade. Para cada composto, calcula-se a desejabilidade frente aos experimentos que foram realizados. A Desejabilidade nada mais é que atribuir valores de 0 a 1 para os valores de área, sendo “0” para a menor área e “1” para a maior área (pensando em maximizar a resposta), sendo os demais valores atribuídos calculados segundo a Equação 2.6. Dessa forma em relação a cada composto, sabe-se qual é o experimento que tem melhor desempenho.

$$d_i = \frac{(y - L)}{(T - L)} \quad \text{Equação 2.6}$$

Onde, d_i é a desejabilidade para cada composto, y é o valor de área do composto para cada experimento; L é o menor valor de área (*Lower*) e T , o maior valor de área (*Target*).

Tabela 2.11 Matriz Doehlert: fatores e seus respectivos níveis utilizados no Planejamento Doehlert de 2 fatores

<i>Tempo de extração</i>		<i>Fração do tempo total em que há refrigeração</i>	
<i>Codificado</i>	<i>Real (min)</i>	<i>Codificado</i>	<i>Real (%)</i>
0	35	0	0,5
0	35	0	0,5
0	35	0	0,5
1	60	0	0,5
0,5	47,5	0,866	0,933
-1	10	0	0,5
-0,5	22,5	-0,866	0,067
0,5	47,5	-0,866	0,067
-0,5	22,5	0,866	0,933

Para se ter uma resposta única, utiliza-se a Desejabilidade Global, que nada mais é que a média geométrica das desejabilidades de todos os compostos em relação a cada experimento (Equação 2.7). A Desejabilidade Global mostra qual dos experimentos apresenta os melhores resultados, em média, para todos os compostos. Com os resultados da Desejabilidade foi possível construir a Superfície de Resposta para o estudo (Figura 2.15).

$$D = \sqrt[m]{d_1 \cdot d_2 \cdots d_m} \quad \text{Equação 2.7}$$

Apesar de usar o mesmo raciocínio de Martendal e Carasek (2011b), os resultados foram completamente distintos. A superfície de resposta do planejamento Doehlert (Figura 2.15) mostra que a melhor situação se dá quando se utiliza o maior tempo extração (60 minutos) e refrigeração contínua (100% do tempo refrigerando) e o mais impressionante é que a curva desse experimento é côncava, enquanto que a de Martendal e Carasek (2011b) é convexa e o ponto ótimo se encontrava próximo do ponto central do experimento. A diferença entre os experimentos é a de que os outros autores extraíram HPAs separadamente dos ftalatos em seu experimento, enquanto neste experimento, BTEX e HPAs estão sendo extraídos

simultaneamente. Uma vez que os BTEX possuem $K_{o/w}$ bem menor que os HPAs, a quantidade que é extraída é menor. Por essa razão, a necessidade de refrigerar seja maior pois essa é a condição na qual os BTEX apresentam melhor recuperação.

Figura 2.15 Superfície de Resposta do Planejamento Doehlert executado. A desejabilidade é maximizada quando o tempo é maximizado, sendo a refrigeração contínua

Como o fator fração do tempo em que há refrigeração se encontra em 100%, não há como expandir o planejamento. O que se poderia fazer é uma otimização univariada, mantendo 100% de tempo refrigerando e aumentando o tempo total de extração. No entanto, por questões práticas, fixou-se o tempo de extração em 60 minutos para que não haja desperdício de tempo na análise (o tempo total para extrair e analisar em GC é de duas horas e dois minutos).

O próximo passo seria iniciar a validação. Porém, quando se avaliou a recuperação do método foi possível observar que a Recuperação para os BTEX e dos HPAs de maior massa (dibenzo[a,h]antraceno e benzo[g,h,i]perileno) estavam por volta de 1%, o que é muito baixo e decidiu-se reavaliar o modo como o planejamento de experimentos foi executado (Tabela 2.12).

Após levantar as possíveis causas da baixa Recuperação para os compostos, a inferência mais plausível era de que poderia haver vazamento não perceptíveis na junção entre barra

sortiva e teflon e dessa forma os BTEX vazavam por causa da alta pressão. Os HPAs mais pesados em contrapartida não estavam sendo recuperados porque não estavam sendo volatilizados eficientemente na temperatura de 160°C (pontos de ebulição da ordem de 500°C).

Para resolver o caso do vazamento, era possível diminuir a temperatura de aquecimento para que a pressão fosse menor (pois não há como vedar a junção por motivos técnicos). No entanto, para recuperar eficientemente os HPAs menos voláteis era necessário aumentar a temperatura. Para resolver esse conflito, pensou-se em modo de deixar que os HPAs estivessem contato com a barra sortiva, sem necessidade de aquecimento demasiado, o que automaticamente diminui a pressão no interior do *vial*. A solução foi alcançada utilizando o modo direto de extração e não mais o *headspace*. O modo direto é aquele no qual a barra sortiva é inserida diretamente na matriz (Figura 2.16).

Tabela 2.12 Resultados obtidos para o ensaio de Veracidade (utilizando como indicador da Recuperação do método)

VERACIDADE	RECUPERAÇÃO (%)	
	BAIXA*	ALTA**
Benzeno	0,5	0,1
Tolueno	0,6	0,3
Etilbenzeno	1,1	0,6
(m+p)-Xileno	1,1	0,6
o-Xileno	1,2	0,8
Naftaleno	8,9	14,2
Acenaftileno	91,6	49,9
Acenafteno	46,8	52,6
Fluoreno	61,7	71,1
Octilfenol	76,5	105,3
Fenantreno	65,1	74,7
Antraceno	56,7	118,3
Fluoranteno	51,8	57,3
Pireno	43,6	53,1
Benzo[a]antraceno	15,0	16,1
Criseno	14,3	15,7
Benzo[b]fluoranteno	15,3	4,2
Benzo[k]fluoranteno	1,3	9,3
Benzo[a]pireno	5,5	4,6
Dibenzo[a,h]antraceno	0,3	1,0
Benzo[g,h,i]perileno	0,4	1,1

*Nível baixo de concentração: 0,5 µg L⁻¹ (HPAs e alquilfenóis) e 17,5 µg L⁻¹ (BTEX); **Nível alto de concentração: 3,5 µg L⁻¹ (HPAs e alquilfenóis) e 122,5 µg L⁻¹ (BTEX)

Como o método foi modificado, foi necessário aplicar outro planejamento experimental. O planejamento Doehlert foi aplicado novamente, só que para três fatores: temperatura de Aquecimento; temperatura de Refrigeração e Tempo total de extração, para poder observar uma possível interação entre os fatores aquecimento e refrigeração (Tabela 2.13).

Figura 2.16 Modos de extração utilizando a técnica Refrigerated Sorptive Extraction: a) Modo Headspace; b) Modo direto

Tabela 2.13 Matriz Doehlert: fatores e seus respectivos níveis utilizados para o Planejamento de 3 fatores.

Ordem	Tempo (min)		Refrigeração (°C)		Aquecimento (°C)	
	Codificado	Real	Codificado	Real	Codificado	Real
7	0	35	0	15	0	56
13	0	35	0	15	0	56
5	0	35	0	15	0	56
15	1	60	0	15	0	56
11	0,5	47,5	0,866	36,65	0	56
12	0,5	47,5	0,289	22,225	0,817	69,072
6	-1	10	0	15	0	56
3	-0,5	22,5	-0,866	-6,65	0	56
10	-0,5	22,5	-0,289	7,775	-0,817	42,928
4	0,5	47,5	-0,866	-6,65	0	56
1	0,5	47,5	-0,289	7,775	-0,817	42,928
2	-0,5	22,5	0,866	36,65	0	56
9	0	35	0,577	29,425	-0,817	42,928
14	-0,5	22,5	0,289	22,225	0,817	69,072
8	0	35	-0,577	0,575	0,817	69,072

A resposta para o planejamento foi a Recuperação para detectar problemas antes de iniciar a Validação. O tempo em que a barra foi refrigerada era de 50 % do tempo total de extração, obedecendo a recomendação de Martendal e Carasek (2011a,b) de aquecer primeiro e refrigerar depois. A concentração de fortificação foi de 3,5 µg L⁻¹ para HPAs e alquilfenóis e 122,5 µg L⁻¹ para BTEX. As respostas foram corrigidas pela função Desejabilidade. As superfícies de resposta dos experimentos são mostradas na Figura 2.17.

É possível observar pelas superfícies de resposta que é necessário maximizar todas os fatores para alcançar o ponto ótimo. No entanto, como discutido anteriormente, não é desejável fazer isso pois aumentando o aquecimento, o vazamento dos BTEX aumenta. Aumentando o tempo, a análise fica muito demorada. É interessante o fato de a superfície de resposta mostrar que é necessário maximizar a temperatura de refrigeração por volta de 40°C ou mais (pode parecer estranho a frase “refrigeração a 40°C”, mas se o *headspace* estiver aquecido a 75°C e a barra a estiver a 40°C, a mesma está refrigerada em relação ao *headspace*). A interação entre aquecimento e refrigeração é que a diferença entre as temperaturas precisa ser minimizada, em modo direto. No entanto, o experimento maximizando as variáveis (para comprovar o ponto em que a Desejabilidade é maior) se mostrou ineficaz em aumentar, significativamente, a recuperação dos BTEX, dibenzo[a,h]antraceno e benzo[g,h,i]perileno (Tabela 2.14).

Figura 2.17 Superfícies de Resposta para o Planejamento Doehlert. a) Tempo versus Refrigeração; b) Tempo versus aquecimento; c) Refrigeração versus Aquecimento

Como o $K_{o/w}$ dos BTEX são da ordem de 10^2 , e a fibra de PDMS extraia com eficiência compostos com $K_{o/w}$ da ordem de 10^4 , é possível que a barra não esteja sendo eficiente na extração porque o equilíbrio fica deslocado para que esses compostos fiquem na água em modo direto de extração. Dessa forma, talvez em modo *headspace*, os BTEX sejam melhor extraídos, se não houvesse o problema do vazamento pelo infortúnio da necessidade de altas temperaturas para extrair os HPAs menos voláteis.

Tabela 2.14 Comparação da Exatidão (tomado como indicador a Recuperação) entre os modos de extração Direto e Headspace

EXATIDÃO	RECUPERAÇÃO (%)	
	HS-RSE*	DI-RSE*
Benzeno	0,1	0,1
Tolueno	0,1	0,3
Etilbenzeno	0,2	0,9
(m+p)-Xileno	0,2	1,0
o-Xileno	0,2	1,2
Naftaleno	10,0	14,5
Acenaftileno	69,0	39,4
Acenafteno	44,5	34,1
Fluoreno	74,7	36,5
Octilfenol	131,9	31,6
Fenantreno	78,5	34,5
Antraceno	71,0	47,4
Fluoranteno	78,5	36,2
Pireno	71,0	34,4
Benzo[a]antraceno	23,6	16,4
Criseno	21,5	16,3
Benzo[b]fluoranteno	21,5	6,0
Benzo[k]fluoranteno	9,7	8,2
Benzo[a]pireno	8,8	5,3
Dibenzo[a,h]antraceno	2,1	1,7
Benzo[g,h,i]perileno	2,3	2,1

*Nível alto de concentração: $3,5 \mu\text{g L}^{-1}$ (HPAs e alquilfenóis) e $122,5 \mu\text{g L}^{-1}$ (BTEX); HS: modo headspace; DI: modo direto.

Alguns desenvolvimentos para métodos multirresíduos em SBSE se utilizam de *multishot*, no qual várias barras, cada uma com uma fase diferente são colocadas na mesma amostra e depois dessorvidas simultaneamente no sistema de dessorção, sendo uma alternativa para compostos com diferenças no coeficiente de partição. O *multi-shot* também pode ser utilizado em condições diferentes de extração, com uma barra específica para cada condição,

sempre dessorvendo as mesmas simultaneamente. Em outros casos, também a SBSE sequencial pode ser empregada, nas quais as condições de extração são modificadas sequencialmente na mesma amostra, com uma barra ou mais de uma (PRIETO et al., 2010).

Considerando este desenvolvimento para SBSE, decidiu-se por tentar aplicar o mesmo para a RSE, da seguinte forma: combinar os modos direto e headspace, deixando a parte inferior da barra imersa na matriz e a parte superior ficando exposta ao headspace. Isso foi alcançado com a utilização de 17 mL de matriz (Figura 2.18). Também foi possível aumentar a temperatura de aquecimento por volta de 100°C pois havia (no modo direto, o septo já não conseguia vedar em temperaturas maiores que 90°C).

Figura 2.18 Ilustração dos modos de extração utilizando Refrigerated Sorptive Extraction: a) Modo Direto; b) modo Multishot (combinação do modo direto e headspace)

Como os planejamentos anteriores respondiam que o tempo precisava ser maximizado e a temperatura de aquecimento também (o que não era desejável, pois inviabiliza a utilização do protótipo por causa da possibilidade de vazamento), decidiu-se por fixar as condições experimentais como: 5°C de refrigeração (em concordância com (MARTENDAL e CARASEK, 2011a), 100°C de aquecimento, 60 minutos de extração, sendo os últimos 30 minutos, refrigerando a barra. Os resultados mostraram que foi possível aumentar significativamente a Recuperação dos BTEX, mas não as dos HPAs menos voláteis (Tabela 2.15).

Para resolver o caso dos HPAs menos voláteis uma alternativa seria utilizar temperaturas de refrigeração da barra maiores que 5°C. Todavia, aumentando a temperatura da barra, a extração dos compostos mais voláteis fica prejudicada. Isso pode ser percebido na Tabela 2.15. Os resultados de Recuperação para o modo direto (DI-RSE) são menores que o modo *multishot* (HS-DI-RSE) até o composto fenantreno. Após esse composto, os resultados do modo direto são maiores que os do modo *multishot*. Isso se deve particularmente à volatilidade dos compostos, pois a temperatura de refrigeração de 40°C (modo direto) facilita a difusão dos compostos menos voláteis e a refrigeração a 5°C (*multishot*) dificulta a difusão

dos mais voláteis, evitando que escapem da fase sortiva. Assim, como o modo *multishot* apresenta resultados razoáveis para a maioria dos compostos, quer voláteis ou semivoláteis, utilizou-se desse modo para a extração, nas condições acima descritas.

Tabela 2.15 Comparação da Exatidão (indicador de Recuperação) entre os três modos de extração utilizando a técnica Refrigerated Sorptive Extraction: Headspace (HS-RSE), Direto (DI-RSE) e Multishot (HS-DI-RSE)

EXATIDÃO	RECUPERAÇÃO (%)		
	HS-RSE	DI-RSE	HS-DI-RSE
Benzeno	0,1	0,1	1,0
Tolueno	0,1	0,3	1,8
Etilbenzeno	0,2	0,9	3,6
(M+p)-xileno	0,2	1,0	4,0
o-Xileno	0,2	1,2	4,0
Naftaleno	10,0	14,5	35,7
Acenaftileno	69,0	39,4	68,2
Acenafteno	44,5	34,1	67,6
Fluoreno	74,7	36,5	68,6
Octilfenol	131,9	31,6	38,3
Fenantreno	78,5	34,5	40,6
Antraceno	71,0	47,4	47,4
Fluoranteno	78,5	36,2	25,0
Pireno	71,0	34,4	22,2
Benzo[a]antraceno	23,6	16,4	7,1
Criseno	21,5	16,3	7,2
Benzo[b]fluoranteno	21,5	6,0	2,8
Benzo[k]fluoranteno	9,7	8,2	6,1
Benzo[a]pireno	8,8	5,3	3,3
Dibenzo [a, h]antraceno	2,1	1,7	1,1
Benzo[g,h,i]perileno	2,3	2,1	2,2

2.4.4. Validação do método

2.4.4.1. Seletividade

A Seletividade foi avaliada, primeiramente pela observação de se os analitos eram completamente separados. Apenas m-xileno e p-xileno apresentaram coeluição, por causa da similaridade. Assim, o método não é seletivo para esses dois compostos. Mas isso não impede sua detecção, até porque os xilenos são contados como uma soma de isômeros (BRASIL, 2011).

A seletividade também foi testada pela comparação entre um branco de matriz e um branco de matriz fortificado. Por razão da barra sortiva estar em contato com a matriz, mesmo

que por uma pequena porção, a quantidade de interferentes que são sorvidos é grande e não há uma dessorção líquida na qual se possa dessorver preferencialmente os analitos. No modo de dessorção térmica, todos os interferentes são dessorvidos conjuntamente com os analitos e há coeluição. Dessa forma, foi necessário aplicar o conceito exposto pela norma SANCO 12571/2013 (EUROPEAN COMMISSION HEALTH; CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL, 2014), de que é possível haver coeluição de interferentes até um limite de 30% do pico do analito no limite de quantificação (LOQ). Os dados são mostrados na Tabela 2.16.

Tabela 2.16 Resultado para Seletividade do método. Os compostos foram fortificados a 0,5 µg L⁻¹ para HPAs e 3 µg L⁻¹ para BTEX, com as seguintes exceções: benzeno (9 µg L⁻¹); fluoreno e octilfenol (1,5 µg L⁻¹); nonilfenol, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno e benzo[g,h,i]perileno (2,5 µg L⁻¹). Resultados são médias de triplicatas.

<i>Compostos</i>	<i>Matriz isenta</i>	<i>Matriz fortificada</i>	<i>Matriz isenta/fortificada (%)</i>
Benzeno	12,6	261,0	4,8
Tolueno	7,7	826,3	0,9
Etilbenzeno	11,9	1955,3	0,6
(m+p)-xileno	36,1	4394,4	0,8
o-xileno	18,2	2204,3	0,8
Naftaleno	24,9	603,9	4,1
Acenaftileno	32,2	2608,6	1,2
Acenafteno	18,1	3439,9	0,5
Fluoreno	773,2	9260,6	8,3
Octilfenol	237,3	3245,3	7,3
Fenantreno	127,9	3418,3	3,7
Nonilfenol	1084,7	7232,2	15,0
Fluoranteno	20,9	3940,6	0,5
Pireno	37,6	3357,1	1,1
Benzo[a]antraceno	31,1	1110,3	2,8
Criseno	102,8	1123,4	9,2
Benzo[b]fluoranteno	25,8	337,1	7,7
Benzo[k]fluoranteno	3445,3	7856,1	43,9
Benzo[a]pireno	370,3	1913,0	19,4
Dibenzo[a,h]antraceno	309,6	680,2	45,5
Benzo[g,h,i]perileno	153,9	1074,7	14,3

É possível observar que na faixa de trabalho escolhida, apenas dois compostos não satisfazem o critério de seletividade: benzo[k]fluoranteno e dibenzo[a,h]antraceno. Como o método apresenta seletividade para a maioria dos compostos na faixa de trabalho definida, não houve alteração na faixa, sendo os compostos supracitados excluídos do método.

2.4.4.2. Precisão

Para encontrar o número de replicatas, como é descrito por Bruns, Scarminio e Barros Neto (2003) e como no caso do método utilizado, que é um método multirresíduo, é recomendável utilizar o resultado para o composto com maior desvio-padrão (sendo a pior situação encontrada, ao satisfaze-la, os outros compostos estarão automaticamente cobertos por essa medida). Como no desenvolvimento do método, já havia alguns resultados preliminares utilizou-se o resultado para o composto criseno, que, dentre os compostos que foram detectáveis e/ou quantificáveis, obteve o pior resultado para o coeficiente de variação: 34,1%. Também se tem o valor para t , pois foram feitas 7 replicatas, portanto 6 graus de liberdade ($t_{(7-1)} = 2,4$). E a tolerância para a precisão será 20%. Utilizando-se da Equação 1.1 (Capítulo 1):

$$N \geq \frac{2,4 \cdot 34,1}{20} \geq 4,1$$

São necessárias mais de 4 replicatas para atender o limite de tolerância de 20%. Não é recomendável também atuar no mínimo e nem exagerar no uso das replicatas como alguns guias expõem (uma orientação da Coordenação Geral de Acreditação (2011) requisita 15 replicatas). Contudo pode-se chegar a um valor intermediário, que na maioria das vezes, é o mais razoável. Dessa forma, seis (6) replicatas atendem a essa recomendação de razoabilidade para este método.

Assim, seis replicatas foram realizadas em duas concentrações distintas (baixa e alta). As condições de cálculo foram de Repetibilidade e Precisão Intermediária (diferença de 1 semana entre as análises). A condição de Reprodutibilidade não pode ser satisfeita pois houve emprego de apenas um analista, não haviam outros equipamentos de fácil acesso e outros laboratórios com disponibilidade. Foi utilizado o Coeficiente de Variação (desvio-padrão relativo em termos de porcentagem) para estimar a precisão. Os dados estão na Tabela 2.17.

O limite estabelecido, máximo de 20% para o CV, indicação do Standard Methods (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION, 2012) e EPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2006), não pode ser atendido para vários compostos. Os BTEX não obtiveram resultados favoráveis nem em condição de

Repetibilidade quanto em Precisão Intermediária, assim como benzo[g,h,i]perileno. Por causa do critério de Precisão, esses compostos também não podem ser analisados pelo método.

Já os compostos acenafteno, fluoreno, octilfenol, fenantreno, nonilfenol, fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno e benzo[b]fluoranteno atenderam ao critério de 20% na condição de Repetibilidade. Naftaleno, acenaftileno e benzo[a]pireno excederam o critério, mas ficaram próximos ao limite (na condição de repetibilidade). Nenhum composto atendeu ao critério na condição de Precisão Intermediária, mas existe uma explicação para isso.

Tabela 2.17 Resultado para Precisão do método. Concentração de: BTEX (baixa: 15 µg L⁻¹; alta: 39 µg L⁻¹); fenantreno e criseno (baixa: 1,5 µg L⁻¹; alta: 5,5 µg L⁻¹); nonilfenol, pireno, benzo[b]fluoranteno, benzo[a]pireno e benzo[g,h,i]perileno (baixa: 2,5 µg L⁻¹; alta: 6,5 µg L⁻¹); demais (baixa: 0,5 µg L⁻¹; alta: 4,5 µg L⁻¹)

Compostos	Repetibilidade (%)		Precisão Intermediária (%)	
	Baixa	Alta	Baixa	Alta
Benzeno	53,2	55,7	80,7	76,6
Tolueno	54,9	50,8	94,7	64,9
Etilbenzeno	49,8	42,7	87,1	97,5
(m+p)-Xileno	50,8	41,8	65,8	78,2
o-Xileno	50,4	42,5	78,4	102,6
Naftaleno	21,7	20,2	43,9	60,5
Acenaftileno	15,3	22,7	41,8	42,0
Acenafteno	15,2	8,8	37,3	35,8
Fluoreno	16,9	11,0	36,9	31,7
Octilfenol	15,9	3,1	53,7	40,1
Fenantreno	10,7	6,3	25,4	29,7
Nonilfenol	15,3	13,5	50,2	37,9
Fluoranteno	19,2	4,4	38,0	21,9
Pireno	9,9	8,1	37,9	20,8
Benzo[a]antraceno	17,1	14,3	39,0	21,5
Criseno	17,1	9,2	51,3	24,7
Benzo[b]fluoranteno	7,2	18,0	42,7	30,9
Benzo[a]pireno	22,5	21,5	52,0	36,5
Benzo[g,h,i]perileno	30,5	26,0	67,0	56,7

Existem métodos que devido às suas condições de uso respondem bem nas condições intra-dias mas não inter-dias e para esses é necessário que a curva de calibração seja feita a cada batelada de ensaios ou a cada dia de uso. Por causa da grande variabilidade existente no método RSE, que apresenta muito manuseio da amostra, além do que, todo o sistema foi confeccionado no laboratório e ferramentaria, desde a barra sortiva até o protótipo de extração e também o próprio PDMS é fabricado no laboratório, que é uma das grandes fontes de variabilidade, pois

podem haver diferenças de extração entre as barras, se encaixa nesses métodos ótimos para condições intra-dias e não inter-dias.

Dentre algumas das possibilidades de tomada de decisão podem-se destacar: i) utilizar-se de uma faixa de trabalho em que a concentração seja maior, diminuindo assim a variância (equação de Horwitz) (THOMPSON, 2004); ii) fazer novos experimentos para o cálculo da precisão aumentando o número de replicatas, diminuindo assim o desvio padrão dos resultados (BRUNS; SCARMINIO; BARROS NETO, 2003); iii) caso a faixa de trabalho não possa ser alterada devido à necessidade de atender a necessidade de um cliente, ou norma específica, também pode-se avaliar a substituição do método por outro mais preciso, que atenda as exigências; iv) refazer a curva de calibração a cada dia de ensaio.

A primeira possibilidade seria a mais adequada, se a variância do método fosse unicamente função da concentração. Como já comentado a maior fonte de variabilidade são manuseio da amostra e o fato de praticamente tudo no método ser *lab-made*.

Na segunda possibilidade levantada, é possível diminuir o desvio padrão aumentando as replicatas, mas não o tanto que seja necessário na condição de Precisão Intermediária. E na terceira, como o projeto não atende a nenhuma demanda específica de clientes ou normas, o método não precisa ser substituído. A quarta possibilidade seria a mais adequada, se não demorassem dois dias para fazer a curva de calibração! Essa característica também pode ser uma fonte de variabilidade, pois de um dia para outro, as condições ambientais se alteram.

Destaca-se que o resultado acima do critério não está errado, apenas não atende ao critério adotado. O desvio padrão é uma propriedade da distribuição normal que estima a dispersão dos valores em torno da média (BRUNS; SCARMINIO; BARROS NETO, 2003). Um maior ou menor desvio padrão significa que os valores se dispersam mais ou menos. Também deve se considerar que essa dispersão é contabilizada numa propriedade do resultado analítico, que é a Incerteza. Dessa forma, o resultado menos preciso pode ser utilizado, já que essa maior variância será embutida na incerteza do resultado e não será mascarada. Dessa forma, os compostos que se enquadraram no critério de Repetibilidade ou que o excederam, mas ficaram próximos ao limite (até 25%) foram considerados aptos para serem analisados.

2.4.4.3. Recuperação

A utilização do Material de Referência Certificado é a melhor opção do ponto de vista metrológico (rastreadabilidade e confiabilidade) para avaliação da Veracidade/Exatidão e recomenda-se sempre que possível, utilizar esses materiais. No entanto, é inviável a utilização

desse tipo de material nesse trabalho (um MRC de BTEX em água se encontra disponível apenas no Japão ou na Suécia, demora mais de seis meses para estar disponível para uso por questões alfandegárias e sai pelo custo de aproximadamente R\$ 3.000,00 para um frasco com 1 mL). Utilizar métodos oficiais seria a segunda opção do ponto de vista de confiabilidade do resultado, mas como é necessário realizar o mesmo procedimento para o método em validação, resultando em maior dispêndio de tempo. Assim, utilizar a matriz fortificada foi a melhor opção para esse trabalho, levando em conta os argumentos anteriores.

Uma ideia útil aplicada foi a minimização de análises na validação. Como vimos anteriormente, o mínimo necessário eram 4 replicatas para estimar a *Precisão* e decidiu-se utilizar 6 replicatas em duas concentrações diferentes (alta e baixa). O que se propõe é aproveitar esses dados para calcular a Veracidade. Assim, se fizeram necessárias 6 replicatas para o branco da matriz e 6 replicatas para o valor de referência (100% de Recuperação) para cada concentração.

Essa condição é razoável pois é o meio termo entre o mínimo (4 replicatas calculadas) e as 10 replicatas relatadas por Konieczka & Namiesnik (2009). Os mesmos autores também trazem outro método: utilizar 3 pontos da curva em triplicata (9 determinações), enquanto propõe-se, nesse trabalho, duas concentrações (alta e baixa), aumentando as replicatas em cada ponto. O critério de razoabilidade continua sendo seguido assim como feito no cálculo da *Precisão*.

O cálculo da Veracidade foi feito em condições intra-dias, em dois níveis de concentração (alta e baixa). A referência de 100% de extração foi conseguida através da injeção de concentração equivalente de solução padrão diretamente no cromatógrafo. Foi utilizada a Equação 1.5 (Capítulo 1) para o cálculo e os limites aceitáveis estarão entre 80 e 120%, como descrito no Standard Methods (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION, 2012) e EPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2006).

$$Recuperação = \frac{(C_1 - C_2)}{C_3} \times 100 \quad \text{Equação 2.8}$$

Sendo, C_1 a média das replicatas para a concentração da matriz fortificada, C_2 é a média das replicatas do branco da amostra e C_3 , a concentração de fortificação. Pode-se observar pela

Tabela 2.18 que nenhum dos compostos atendem ao critério estabelecido. Isso ocorre porque os planejamentos experimentais executados buscaram a melhor condição de recuperação para todos os compostos em conjunto. Com isso, se houvesse uma condição em que um dos compostos fosse extraído a 90% e outro a 2% e uma outra condição em que os dois compostos fossem extraídos ambos a 50%, a segunda condição seria otimizada pela função desejabilidade pois é uma condição em que os dois compostos podem ser extraídos sem prejuízo de um ou outro. Além disso, a técnica de extração utilizada é uma técnica de equilíbrio e não exaustiva, ou seja, já é de se esperar que não haja extração de 100% dos compostos pela barra sortiva.

Tabela 2.18 Resultado para Veracidade Exatidão do método. Concentração de fenantreno e criseno (baixa: 1,5 µg L⁻¹; alta: 5,5 µg L⁻¹); nonilfenol, pireno, benzo[b]fluoranteno, benzo[a]pireno e benzo[g,h,i]perileno (baixa: 2,5 µg L⁻¹; alta: 6,5 µg L⁻¹); demais (baixa: 0,5 µg L⁻¹; alta: 4,5 µg L⁻¹)

COMPOSTOS	VERACIDADE (%)		EXATIDÃO (%)	
	BAIXA	ALTA	BAIXA	ALTA
Naftaleno	9,4	10,8	19,2	24,2
Acenaftileno	15,9	16,1	32,9	28,5
Acenafteno	32,0	20,2	43,9	31,6
Fluoreno	21,2	12,2	31,6	12,2
Octilfenol	33,7	6,5	39,6	7,4
Fenantreno	13,8	28,3	21,0	36,3
Nonilfenol	14,0	49,4	44,6	52,4
Fluoranteno	17,2	18,5	19,2	20,1
Pireno	13,2	15,9	16,2	16,0
Benzo[a]antraceno	5,7	5,3	5,3	3,1
Criseno	4,3	5,0	4,6	2,4
Benzo[b]fluoranteno	2,3	2,2	2,5	0,8
Benzo[a]pireno	16,3	2,7	14,0	2,1

A norma SANCO 12571/2013 (EUROPEAN COMMISSION HEALTH; CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL, 2014) traz uma opção para o caso de os resultados de recuperação não forem aceitos pelo critério adotado: se houver repetibilidade dos dados, abaixo de 20% que foi adotado como critério, os resultados de recuperação podem ser aceitos. Sendo assim, todos os resultados podem ser aceitos, pois há repetibilidade em torno de 20% para todos os dados.

Além disso, um importante detalhe da metodologia pode isentar o uso da Recuperação no estudo da validação: a Recuperação não é utilizada no cálculo da concentração do analito na amostra. Na próxima seção, da curva de calibração, será pautado que não foi possível proceder com a fortificação do extrato e por isso, é utilizado a metodologia do branco fortificado. Quando

se utiliza essa metodologia, o resultado de área do cromatógrafo é diretamente proporcional à concentração de fortificação do branco, já com a Recuperação embutida no cálculo. A Figura 2.19 ilustra as metodologias de extrato e branco fortificado.

Figura 2.19 Diagramas representando a dependência do sinal analítico com o extrato fortificado (passível de correção pela Recuperação) e com o branco fortificado (sem necessidade de correção pela Recuperação, pois já está implícita na curva de calibração)

Metodologia de fortificação do extrato

Metodologia de fortificação do branco

2.4.4.4. Curva de calibração e Linearidade

Decidiu-se por analisar 7 pontos feitos em triplicata, mas para construção da curva foram utilizados 5 pontos consecutivos (e nunca aleatórios, pois isso seria uma manipulação de dados). Fazer pontos adicionais é uma estratégia para não precisar fazer outra curva, caso algum dos compostos não apresente linearidade na faixa escolhida. Assim, se os compostos não

apresentarem linearidade adequada entre os pontos 1 e 5, pode-se utilizar dos pontos 2 ao 6 ou dos pontos 3 ao 7. A faixa de calibração cobriu apenas uma ordem de grandeza, diminuindo assim a chance de haver heterocedasticidade.

No caso dessa metodologia, na qual a barra sortiva é dessorvida termicamente, não foi possível fazer a fortificação do extrato. Por essa razão foi utilizado o método de fortificação do branco e aplicação de toda a metodologia, assumindo o ônus da baixa precisão na regressão, mas com a melhor estimativa da linearidade do método. A avaliação foi feita utilizando a ferramenta Curva de Calibração do software Action® (adicionado como suplemento do Microsoft Excel), que em seu diagnóstico de erros de regressão cobre todos os testes mais importantes: *outliers*, homocedasticidade, e avaliação do ajuste da curva aos dados experimentais (análise de resíduos e ANOVA). O software também permitiu a utilização de testes de maior robustez estatística como o teste de Bonferroni para *outliers*. A tomada de decisão em caso de homocedasticidade, foi optar pela regressão linear simples. Quando não, o método de regressão ponderado foi aplicado (MILLER; MILLER, 2005).

Tomou-se como exemplo o composto benzo[a]pireno para mostrar como foi feito o estudo da linearidade. A faixa de trabalho desse composto foi definida entre 2,5 e 6,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (esse composto só apresentou seletividade a partir dessa concentração inicial, não sendo possível avaliar esse composto no limite definido pela portaria MS 2914, Tabela 2.2, p. 88). Seguindo o fluxograma de avaliação da curva de calibração, o primeiro passo foi detectar *outliers*. Os testes que o software Action® utiliza são: teste de Grubbs (avalia *outlier* entre as replicatas de cada ponto experimental da curva separadamente), teste de Bonferroni (avalia *outliers* em relação a todas as replicatas de todos os pontos experimentais da curva) e métodos gráficos DFFITS e DFBETAS, que detectam pontos influentes. O primeiro método gráfico, DFFITS avalia se a uma das replicatas de um ponto experimental influi significativamente no ponto ajustado pela curva, e o segundo, DFBETAS, avalia se a algum dos pontos experimentais influi significativamente no ajuste do coeficiente angular da curva.

Na Tabela 2.19 é possível observar que o teste de Grubbs não detecta nenhum *outlier*. Já o teste de Bonferroni mostra que a entrada 2 (2ª replicata do 1º ponto da curva) é um *outlier*, sendo confirmado pelos métodos gráficos (Figura 2.20 e Figura 2.21). Os métodos gráficos também detectam a entrada 15 (3ª replicata do 5º ponto da curva) como influente, mas apenas um ponto por vez foi excluído. O procedimento segundo o fluxograma de avaliação da curva (Figura 1.1, Capítulo 1) é excluir o ponto e refazer os testes para *outliers*.

Tabela 2.19 Testes de Grubbs e Bonferroni para *outliers*. P-valor > 0,05 indica que a observação é um *outlier*.

Outliers (pontos atípicos)			
Observação	t-Valor	p-valor	p-valor_Bonferroni
2	2,972298578	0,011651313	0,174769691

Figura 2.20 Resultado do teste DFFITS para detecção de ponto influente no valor ajustado

Figura 2.21 Resultado do teste DFBETAS para detecção de ponto influente no ajuste do coeficiente angular

Os novos testes realizados mostram que a entrada 10 (2ª replicata do ponto 4) é um *outlier* (teste de Bonferroni, Tabela 2.20). Já os métodos gráficos mostram que a entrada 14 (3ª replicata do ponto 5) é um ponto influente. DFFITS mostra que a entrada 10 é também um ponto influente, mas em menor grau que a entrada 14 (Figura 2.22 e

Figura 2.23). Apesar de ainda haver *outliers* e pontos influentes, não será realizada a exclusão de nenhum ponto sem uma análise crítica da qualidade do ajuste da curva.

Figura 2.22 Resultado do teste DFFITS para detecção de ponto influente no valor ajustado

Figura 2.23 Resultado do teste DFBETAS para detecção de ponto influente no ajuste do coeficiente angular

Tabela 2.20 Testes de Grubbs e Bonferroni para *outliers*. P-valor > 0,05 indica que a observação é um *outlier*.

Outliers (pontos atípicos)			
Observação	t-Valor	p-valor	p-valor_Bonferroni
10	2,633704754	0,023252989	0,325541852

Segundo o fluxograma (Figura 1.1, Capítulo 1), o próximo passo é avaliar a homocedasticidade dos dados. O software Action® apresenta 4 testes: Cochran, Breusch Pagan, Goldfeld Quandt e Brown-Forsythe. Para obter um veredicto, o resultado da maioria dos testes foi utilizado. Em caso de empate, o teste de Brown-Forsythe foi desconsiderado porque é muito robusto, necessitando de várias replicatas para gerar um resultado confiável. Para os dados da curva do benzo[a]pireno, os testes apontaram para a homocedasticidade dos dados (Tabela 2.21).

Tabela 2.21 Testes de Breusch-Pagan, Goldfeld-Quandt, Brown-Forsythe e Cochran, para observação de homocedasticidade dos dados. P-valor > 0,05 indica que os dados apresentam homocedasticidade

Teste de Homocedasticidade - Breusch Pagan				
	Estatística	GL	p-valor	
	2,045206608	1	0,152686254	
Teste de Homocedasticidade - Goldfeld Quandt				
Variável	Estatística	GL1	GL2	p-valor
Concentração	3,090050357	4	3	0,19050034
Teste de Homocedasticidade - Brown Forsythe				
Variável	Estatística	GL 1	GL 2	p-valor
Concentração	0,277943588	4	9	0,884997379
Teste de Homocedasticidade - Cochran				
	Estatística	GL	p-valor	
	0,353321247	2,8	0,911048299	

Caso os dados fossem heterocedásticos seria possível utilizar a função de adicionar pesos, inversamente proporcionais à variância dos pontos para gerar uma regressão linear ponderada, função essa disponível no Action®. Toda a análise teria que recomeçar partindo da observação de *outliers* para essa nova curva.

Como os dados são homocedásticos, a regressão linear simples pode ser utilizada e resta saber a qualidade do ajuste da curva. O teste de falta de ajuste, que é realizado através de uma tabela ANOVA, mostra que não há falta de ajuste, ou seja, o modelo linear explica bem os dados experimentais (Tabela 2.22). E a análise de significância dos preditores, mostra que o coeficiente linear calculado pela curva não é significativo e pode ser excluído (Tabela 2.23). A equação da curva para o benzo[a]pireno é mostrada na Equação 2.9.

$$y = 561,64 \cdot x$$

Equação 2.9

Tabela 2.22 Tabela ANOVA e teste de Falta de Ajuste. Comparação entre concentração e resíduos: p-valor > 0,05 indica que os dados não são proporcionais à concentração. Comparação entre Falta de Ajuste e Erro Puro: p-valor > 0,05 indica que não há falta de ajuste

Teste de Falta de Ajuste					
	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Concentração	1	8111220,927	8111220,927	25,81066344	0,000662458
Resíduos	12	3473965,033	289497,0861		
Falta de Ajuste	3	645638,3413	215212,7804	0,684827191	0,58346835
Erro Puro	9	2828326,692	314258,5213		

Tabela 2.23 Estimativa do modelo para coeficiente linear (intercepto) e coeficiente angular (Concentração). p-valor > 0,05 indica não significância estatística para utilizar o preditor.

Preditor	Coefficientes			
	Estimativa	Desvio Padrão	Estat.t	P-valor
Intercepto	302,0986111	513,1880089	0,58867044	0,566998154
Concentração	561,6372222	106,1047596	5,293233067	0,000190435

O cálculo de incerteza foi realizado para o ponto central da curva, onde a variabilidade intrínseca do método é tida com menor intensidade. Os resultados da incerteza expandida para k=2 podem ser vistos na Tabela 2.24. Os compostos apresentaram valores de incerteza na faixa de 14 a 52%. Mesmo com a estratégia de utilizar o ponto central da curva, a variabilidade do método é evidente na incerteza da curva. Como nenhum critério foi estabelecido, os resultados foram considerados aptos para análise.

Tabela 2.24 Resultado de incerteza expandida (k=2) da curva analítica para o ponto central da mesma

Composto	Faixa de Trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação	Incerteza (%)
Naftaleno	1,5 – 5,5	$Y = 1681,8 \cdot x$	26,7
Acenaftileno	2,5 – 6,5	$y = 6189,88 \cdot x$	30,2
Acenafteno	1,5 – 5,5	$y = 7113,22 \cdot x$	22,8
Fluoreno	1,5 – 5,5	$y = 7565,55 \cdot x$	28,1
Octilfenol	0,5 – 4,5	$y = 3299,11 \cdot x$	14,0
Fenantreno	1,5 – 5,5	$y = 6068,64 \cdot x$	24,8
Nonilfenol	2,5 – 6,5	$y = 3493,93 \cdot x$	39,9
Fluoranteno	0,5 – 4,5	$y = 4650,25 \cdot x$	18,4
Pireno	2,5 – 6,5	$y = 4589,20 \cdot x$	31,4
Benzo[a]antraceno	1,5 – 5,5	$y = 1528,61 \cdot x$	24,0
Criseno	0,5 – 4,5	$y = 1838,35 \cdot x$	47,0
Benzo[b]fluoranteno	2,5 – 6,5	$y = 575,84 \cdot x$	34,0
Benzo[a]pireno	2,5 – 6,5	$y = 561,64 \cdot x$	51,7

2.4.4.5. Limites de Detecção

Considerando o exposto no Capítulo 1, o método de replicatas do branco para estimar o limite de detecção do método (MDL) é amplamente aplicado. Porém, encontrou-se uma dificuldade para esse método: para análises cromatográficas, a medida de concentração é indireta pois é correlacionada com a área dos picos cromatográficos correspondentes. Assim, tanto a média como o desvio-padrão estavam em unidades de área e foi necessário utilizar algum método para estimar a concentração.

O método da curva de calibração (Equação 1.9, Capítulo 1) não é o ideal, mas foi o único que conseguiu transformar as unidades de área em unidades de concentração. A questão mais importante foi como estimar o desvio-padrão (SD) da equação. Como comentado na seção anterior, a curva de calibração foi executada no modo em que a variabilidade é dominante (fortificação do branco e análise pela metodologia). Se utilizar o desvio-padrão dos resíduos da curva ou o desvio padrão do intercepto da curva, poderia superestimar o MDL. Dessa forma, o MDL foi estimado pela Equação 1.9, utilizando-se do desvio padrão das replicatas do branco.

No entanto só a confirmação experimental, com precisão abaixo de 20%, pode ratificar os MDL calculados. Apenas benzo[a]pireno e octilfenol tiveram os MDL calculados confirmados. Para os outros compostos, concentrações mais altas foram injetadas até encontrar uma em que a precisão fosse aceitável, então essa concentração foi considerada com o MDL. Os resultados podem ser vistos na Tabela 2.25. Para efeito desse trabalho, o LOQ foi considerado como o primeiro ponto da curva de calibração, pois nesse ponto, a precisão e a incerteza estavam em níveis aceitáveis.

2.4.4.6. Robustez

A Robustez foi avaliada com 5 fatores com variação simétrica entorno do valor nominal, explícitos na Tabela 2.26. Foi utilizado o planejamento Plackett-Burman de 7 fatores, sendo dois deles considerados nulos. A resposta dos experimentos foi calculada como sendo a média geométrica das áreas dos picos de cada composto (Tabela 2.27).

O valor para o $E_{critico}$ foi calculado através da média geométrica dos desvios padrão da Precisão Intermediária de cada composto. Como pode ser observado na Tabela 2.28, nenhum dos efeitos é significativo pois nenhum excede o valor crítico. A faixa de variação não significativa pode ser vista também na Tabela 2.28. Isso significa que pode-se variar o volume

entre 13,4 e 20,6 mL que não haverá uma variação maior que a predita pela Precisão Intermediária. O mesmo raciocínio foi utilizado para os outros fatores.

Tabela 2.25 Resultados para Limites de Detecção e Quantificação. O MDL confirmado foi feito através da injeção de concentração até se obter repetibilidade abaixo de 20%.

Composto	Faixa de Trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$)	MDL Calculado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	MDL confirmado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Naftaleno	1,5 – 5,5	0,05	0,50	1,50
Acenaftileno	2,5 – 6,5	0,18	0,24	2,50
Acenafteno	1,5 – 5,5	0,02	0,22	1,50
Fluoreno	1,5 – 5,5	0,13	0,47	1,50
Octilfenol	0,5 – 4,5	0,12	0,17	0,50
Fenantreno	1,5 – 5,5	0,03	0,26	1,50
Nonilfenol	2,5 – 6,5	0,28	0,50	2,50
Fluoranteno	0,5 – 4,5	0,08	0,34	0,50
Pireno	2,5 – 6,5	0,08	0,26	2,50
Benzo[a]antraceno	1,5 – 5,5	0,06	0,24	1,50
Criseno	2,5 – 6,5	0,10	0,18	2,50
Benzo[b]fluoranteno	2,5 – 6,5	0,08	0,55	2,50
Benzo[a]pireno	2,5 – 6,5	0,99	1,02	2,50

Tabela 2.26 Parâmetros escolhidos para avaliação da Robustez do método

Parâmetros	Níveis		
	-1	0	1
Volume da matriz (mL)	16	17	18
Aquecimento ($^{\circ}\text{C}$)	95	100	105
Refrigeração ($^{\circ}\text{C}$)	0	5	10
Agitação	0	1	2
Tempo (min.)	55	60	65

A Precisão Intermediária no entanto é muito alta, como comentada anteriormente por causa da grande variabilidade e poderia estar mascarando os efeitos. Decidiu-se utilizar a Repetibilidade para estimar o E_{critico} , mas mesmo assim, o valor desse parâmetro ficou acima dos valores de efeito dos fatores (661,1), mostrando que nenhuma das variações embutidas altera o método significativamente. Dessa forma é razoável afirmar que o método é robusto considerando os fatores e os níveis abordados.

Destaca-se que na etapa de planejamento experimental, no qual o volume da matriz era significativo na recuperação dos compostos neste planejamento não foi. No planejamento anterior o objetivo era maximizar a resposta, que era a média geométrica da Recuperação,

depois transformada em Desejabilidade e naquele planejamento, se assistia a sinergia entre os fatores. No planejamento da Robustez, seja o de Youden ou Plackett-Burman, não se leva em conta a interação entre fatores, apenas o efeito primário. Por essa razão a mudança de volume não é percebida como significativa.

Tabela 2.27 Matriz do planejamento Plackett-Burman de Robustez

<i>Experimento</i>	<i>Volume</i>	<i>Aquecimento</i>	<i>Refrigeração</i>	<i>Agitação</i>	<i>Tempo</i>	<i>Nulo</i>	<i>Nulo</i>	<i>Resposta</i>
1	1	1	1	-1	1	-1	-1	962,4
5	-1	1	1	1	-1	1	-1	835,8
4	-1	-1	1	1	1	-1	1	1106,8
8	1	-1	-1	1	1	1	-1	1464,6
3	-1	1	-1	-1	1	1	1	662,0
7	1	-1	1	-1	-1	1	1	317,9
6	1	1	-1	1	-1	-1	1	1543,2
2	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	788,5

Tabela 2.28 Avaliação da significância dos efeitos em comparação com $E_{crítico}$. O planejamento permite a observação do intervalo de variação não significativa

<i>Fatores</i>	<i>Efeitos</i>	$E_{crítico}$	<i>Variação não-significativa</i>
Volume	223,7	799,1	13,4 a 20,6 mL
Aquecimento	81,4		50,9 a 149,1°C
Refrigeração	-308,9		17,9°C a -7,9°C
Agitação	554,9		0 a 2,4
Tempo	177,6		42,1 a 82,5 min
Nulo	-280,1		-
Nulo	-105,4		-

2.4.4.7. Finalização da etapa de Validação

Conforme avançou o estudo da validação, alguns parâmetros precisaram ser revisados, como por exemplo a Precisão sendo que, após a avaliação deste parâmetro, houve alterações na faixa de trabalho durante a avaliação da linearidade da curva de calibração, fazendo-se necessário a avaliação da Precisão nessa nova faixa de concentração. A Recuperação foi excluída da avaliação, pelos motivos descritos anteriormente. Assim sendo, todos os dados revisados foram sumarizados na Tabela 2.29.

Tabela 2.29 Resultados finais da etapa de Validação do Método

<i>Composto</i>	<i>Faixa de Trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$)</i>	<i>Equação da reta</i>	<i>Incerteza expandida, k=2 (%)</i>	<i>MDL ($\mu\text{g L}^{-1}$)</i>	<i>LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)</i>	<i>Repetibilidade (%)</i>		<i>Seletivo?</i>	<i>Robusto?</i>
						<i>Baixa</i>	<i>Alta</i>		
Naftaleno	1,5 – 5,5	$y = 1681,8 \cdot x$	26,7	0,50	1,50	9,9	29,7		
Acenaftileno	2,5 – 6,5	$y = 6189,88 \cdot x$	30,2	0,24	2,50	6,9	10,5		
Acenafteno	1,5 – 5,5	$y = 7113,22 \cdot x$	22,8	0,22	1,50	8,8	15,1		
Fluoreno	1,5 – 5,5	$y = 7565,55 \cdot x$	28,1	0,47	1,50	4,8	12,3		
Octilfenol	0,5 – 4,5	$y = 3299,11 \cdot x$	14,0	0,17	0,50	15,9	3,1		
Fenantreno	1,5 – 5,5	$y = 6068,64 \cdot x$	24,8	0,26	1,50	10,7	6,3		
Nonilfenol	2,5 – 6,5	$y = 3493,93 \cdot x$	39,9	0,50	2,50	15,3	13,5	Sim	Sim
Fluoranteno	0,5 – 4,5	$y = 4650,25 \cdot x$	18,4	0,34	0,50	19,2	4,4		
Pireno	2,5 – 6,5	$y = 4589,20 \cdot x$	31,4	0,26	2,50	9,9	8,1		
Benzo[a]antraceno	1,5 – 5,5	$y = 1528,61 \cdot x$	24,0	0,24	1,50	20,0	8,6		
Criseno	2,5 – 6,5	$y = 1838,35 \cdot x$	47,0	0,18	2,50	9,4	13,9		
Benzo[b]fluoranteno	2,5 – 6,5	$y = 575,84 \cdot x$	34,0	0,55	2,50	7,2	18,0		
Benzo[a]pireno	2,5 – 6,5	$y = 561,64 \cdot x$	51,7	1,02	2,50	22,5	21,5		

2.4.5. Amostragem

Visando a testar o método com amostras reais, duas campanhas de amostragem foram realizadas, a primeira no final de Fevereiro e começo de Março de 2015 e a segunda em Agosto de 2015. O planejamento das campanhas se deu durante o segundo semestre do ano de 2013, em conjunto com a doutoranda Vivian Cristina dos Santos Hackbart, sua orientadora, Profa. Dra. Rosely Ferreira dos Santos, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (Campus de São Paulo) e o Dr. Guilherme Theodoro Nascimento Pereira de Lima. O objetivo do plano de amostragem foi identificar a correlação do uso da paisagem com a qualidade dos recursos hídricos. Para tanto, o laboratório do Instituto de Biociências ficou responsável pelas análises de compostos inorgânicos e o laboratório de São Carlos, pelos compostos orgânicos. As informações preliminares acerca da área de estudo (trabalhos já existentes, croqui com possíveis pontos amostrais e posterior visita e georreferenciamento dos pontos de amostragem) também ficou a encargo da equipe de São Paulo pela proximidade e também pelo conhecimento mais amplo a respeito do objetivo do plano de amostragem (Figura 2.24).

Figura 2.24 Croqui com localização dos pontos de amostragem

O material de apoio operacional (veículo, equipamentos) foi adquirido pelo projeto de fomento do Instituto de Biociências, pois havia verba destinada exclusivamente para a

amostragem. O projeto de desenvolvimento da técnica de extração RSE não contemplava verba para amostragem e se encerrou em 2013. Uma pousada de apoio em São Luiz do Paraitinga também foi necessária. As amostras foram coletadas e transportadas com veículo alugado até o laboratório do Instituto de Biociências. O transporte das amostras de contaminante orgânicos para o laboratório de São Carlos foi firmado no início de 2014, em parceria com o Setor de Transportes do Instituto de Química de São Carlos, aproveitando-se das viagens institucionais semanais (sem encargo financeiro).

A capacidade analítica do laboratório *Research in Quality Assurance for Laboratories* (RQA Labs) não pode ser definida antes do planejamento da amostragem, devido aos vários problemas de vazamento que ocorreram, impossibilitando o avanço do projeto (vide seção 2.4.2. *Montagem do protótipo para extração por RSE*). Com base nas informações da literatura e experiência técnica foi estabelecido que a capacidade analítica ficaria em torno de 10 amostras por dia, sendo que em 2 semanas (prazo de validade das amostras) era possível analisar 140 amostras e que no máximo 100 análises por coleta seriam requeridas. A concentração alvo foi estimada em função de literaturas sobre outras áreas pois não havia estudos sobre os compostos de interesse na região. As amostras coletadas foram de água bruta, superficial, alterando apenas se são doces ou salgadas (Tabela 2.30).

Como o método utilizado é multirresíduo, as amostras de alquilfenóis e HPAs foram coletadas no mesmo frasco, já que a exigência de frasco de borossilicato e de cor âmbar com septo de PTFE na tampa ou utilização de papel alumínio, para evitar o contato entre tampa de plástico e amostra, é a mesma para ambas as classes de compostos. Foi aplicada a lavagem nos frascos, segundo “Ensaio de Compostos Orgânicos Semivoláteis” (AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS; COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2011, p.60).

Os frascos de vidro foram transportados em caixas de papelão no assoalho do veículo, sem empilhamento, evitando assim quebra de frascos com quedas. O gelo para preservação era adquirido em postos de combustíveis em São Luiz do Paraitinga todos os dias, pela manhã, antes da coleta. A temperatura de preservação foi de $4\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Os equipamentos necessários para a amostragem foram: balde de inox, sondas paramétricas, caixa de isopor (menor) com gelo, 3 frascos de coleta (frasco adicional para o caso de quebra) e pisseta com água destilada.

No ponto de amostragem (Figura 2.25), o primeiro procedimento foi conferir as coordenadas anteriormente georreferenciadas. O balde de inox foi imerso na água e retirado e nessa água as sondas foram enxaguadas (10 segundos de imersão). Nenhuma medição foi feita. A água foi então descartada.

Tabela 2.30 Estudos trazendo análises dos compostos de interesse em outras regiões do país

<i>Localização (ano)</i>	<i>Analito</i>	<i>Metodologia</i>	<i>LOD/LOQ (µg/Kg)</i>	<i>Resultados (µg/Kg)</i>	<i>Referências</i>
São Sebastião, SP (1999)	HPAs	ELL/ Fluorescência	-	0,35 - 2,5	(ZANARDI et al, 1999)
Baia de Guanabara, RJ (2007)	HPAs	SPE/GC/MS	0,01-0,09	ND-1.592	(SILVA; AZEVEDO; AQUINO NETO, 2007)
Arroio Saldanha, PR (2009)	HPAs	GC/MS	-	17,05-49,56	(SILVA et al, 2009)
Caucaia do Alto, SP (2007)	OP, NP	ASE/GC/MS	0,1/0,17	0,9-10,4	(FIEDLER et al, 2007)
Zona Metropolitana Belo Horizonte, MG (2009)	NP	SPE/LC/ESI-IT-TOF-MS	0,0065	0,04-1,2	(MOREIRA et al, 2009)
Rio das Velhas, MG (2011)	NP	SPE/LC/ESI-IT-TOF-MS	0,0012/ 0,0039	0,0259- 1,4353	(MOREIRA et al, 2011)
Bacia do Rio Atibaia, SP (2012)	OP, NP	SPE/LC/MS/MS	0,00004/ 0,0001	0,0032	(JARDIM et al, 2012)

OP: octilfenol; NP: nonilfenol; ELL: extração líquido-líquido; SPE: solid phase extraction; GC: Cromatografia Gasosa; LC: cromatografia líquida; MS: espectrometria de massas; ESI: ionização por eletro spray; TOF: detecção por tempo de voo.

O balde foi lançado no mesmo ponto e água foi coletada novamente. As sondas foram mergulhadas no balde obteve-se uma medida de cada parâmetro. Após a medida, a água foi descartada. Nova coleta foi feita com o balde no mesmo ponto e um dos frascos de coleta foi preenchido e então fechado e o restante de água do balde, descartado. O frasco de coleta preenchido foi colocado imediatamente no frasco de isopor com gelo.

O mesmo procedimento foi repetido para replicar a amostra (coleta e medição com sonda; coleta e preenchimento do frasco). Em cada ponto amostral, os mesmos procedimentos foram realizados. Os frascos foram identificados com prefixos “B” e número da bacia hidrográfica definido no planejamento e “OR” para identificar as análises de orgânicos com números “1” ou “2” para mostrar qual é a replicata do ponto de amostragem. As amostras foram acondicionadas em geladeira a 4±2°C durante os três dias de coleta na pousada em São Luiz do Paraitinga e depois foram para o laboratório do Instituto de Biociências.

Devido a problemas no transporte das amostras do laboratório do Instituto de Biociências para o Instituto de Química de São Carlos, não foi possível executar as análises

dentro do prazo de validade estabelecida pelo Guia Nacional de Coleta, sendo todos os resultados encontrados abaixo do limite de detecção do método ($< \text{MDL}$) (AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS; COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2011). No entanto, todas as amostras foram avaliadas, sendo tomados todos os cuidados na execução dos ensaios, inclusive com utilização de amostras fortificadas avaliadas por carta de controle, evidenciando que o método estava respondendo dentro da faixa de trabalho estudada.

Figura 2.25 Fotos de alguns pontos de amostragem e procedimento de amostragem

2.4.6. Cálculo de Incerteza

2.4.6.1. Incerteza Analítica

Para o cálculo da incerteza analítica, tomou-se como exemplo o composto pireno para demonstração dos cálculos. Para a etapa de especificação do mensurando, foi construída a frase: “Medição da concentração, em µg/L de pireno em água superficial pelo método de preparo de amostras Refrigerated Sorptive Extraction e análise com cromatografia gasosa com detector de ionização em chama”.

Para identificar as fontes de incerteza, foi construído o fluxograma do método (Figura 2.26). Pode-se identificar uma medição de volume da amostra através de proveta que muito provavelmente, contribuirá com a incerteza final.

Figura 2.26 Fluxograma para o método RSE/GC/FID

Como já comentado anteriormente, a curva de calibração foi construída relacionando sinal analítico diretamente à concentração do branco fortificado. Dessa forma, nenhum fator de correção é necessário na equação da curva de calibração (Equação 2.10)

$$y = 4589,20 \cdot x \quad \text{Equação 2.10}$$

Da etapa de validação, tem-se como fonte de incerteza a Curva de Calibração, já que a Recuperação não se insere no cálculo do mensurando e a Precisão já está incluída na Curva, pois foi feita pelo método do branco fortificado. Se for inserida a Precisão como fonte de incerteza, haverá uma dupla contagem dessa contribuição, superestimando a incerteza. Dessa fonte, existe um componente, o Branco fortificado, que pode ser separado em uma fonte de incerteza (Figura 2.27 e Figura 2.28).

Figura 2.27 Diagrama de Ishikawa para as principais fontes de incerteza encontradas

Figura 2.28 Diagrama de Ishikawa, mostrando a reorganização do Branco fortificado

O Branco fortificado foi preparado medindo-se o volume do branco com proveta graduada. O volume de fortificação foi medido com auxílio de uma micropipeta de uma solução padrão. Portanto, existem quatro componentes de incerteza: volume do branco, volume de fortificação, incerteza da concentração da solução e incerteza do padrão utilizado (Figura 2.29).

Figura 2.29 Diagrama de Ishikawa, mostrando as subcomponentes da fonte de incerteza Branco fortificado

Porém, a solução padrão utilizada é a 2ª diluição de uma solução inicial preparada aferindo a massa de padrão e dissolvendo a mesma em solvente num balão volumétrico (essas diluições são necessárias pois se fosse utilizada apenas uma solução, a massa aferida seria muito pequena, não sendo possível a medição em balança analítica). Dessa forma, a incerteza da concentração da solução padrão 2 é uma combinação de incerteza advinda da solução anterior.

Na Figura 2.30, é possível observar que no cálculo da concentração da solução padrão 2, três grandezas são utilizadas: volume da micropipeta, o volume do balão e a concentração da solução padrão 1. Por essa razão, quando no diagrama de Ishikawa, é necessário contabilizar a incerteza da concentração da solução padrão anterior. O mesmo ocorre analogamente para o Branco fortificado. O diagrama de Ishikawa final para o cálculo da incerteza analítica para a concentração de pireno pode ser observado na Figura 2.31.

Tanto na Figura 2.30 como na Figura 2.31, é possível observar que existe a subcomponente de incerteza denominada “Verificação” destacada em cor azul. Essa subcomponente se aplica à balança analítica e micropipetas. Como foi comentado no Capítulo 1, existe a necessidade de se utilizar de equipamentos calibrados e padrões com incerteza declarada para a aplicação do *Analytical Quality Assurance Cycle*, garantindo a rastreabilidade metrológica do resultado. No entanto, não foi possível implantar um programa de calibração de equipamentos por razões orçamentárias. Contudo, foi proposto uma alternativa para garantia da qualidade dos resultados científicos.

Figura 2.30 Ilustração das diluições da solução padrão de pireno, bem como a propagação da incerteza no branco fortificado

O documento orientativo da CGCRE/INMETRO traz a forma de fazer a verificação intermediária em balanças (COORDENAÇÃO GERAL DE ACREDITAÇÃO, 2012). A verificação é realizada utilizando-se de pesos-padrão calibrados por laboratórios de calibração pertencentes a Rede Brasileira de Calibração (RBC), que são laboratórios que operam em conformidade com a norma NBR ISO/IEC 17025 sendo auditados pela CGCRE/INMETRO. Esses laboratórios são os mesmos que podem fazer calibrações de equipamentos mantendo a rastreabilidade metrológica.

Figura 2.31 Diagrama de Ishikawa completo das fontes de incerteza da etapa analítica

Se o peso padrão é calibrado por um laboratório RBC, existe dentro do laboratório o instrumento que irá fazer a ligação entre as cadeias ininterruptas de calibrações, sendo possível, através de um único instrumento, garantir a rastreabilidade ao sistema SI. No entanto, duas ressalvas devem ser feitas: a primeira, a de que a verificação intermediária de balança, segundo o documento da CGCRE, é simples demais para ser utilizado como um substituto da calibração da balança, como se pretendeu. Por isso, a verificação da balança analítica seguiu os três testes principais do guia EURAMET para calibração de instrumentos de pesagem não automáticos: teste de repetibilidade, teste de erro de indicação e teste de excentricidade (EUROPEAN ASSOCIATION OF NATIONAL METROLOGY INSTITUTES, 2009). A segunda ressalva, é de que a verificação intermediária pode subestimar várias fontes de incerteza que são contabilizadas na calibração. Por isso, apesar de haver rastreabilidade, a métrica de comparação, que é a incerteza, pode ser irreal e se em algum momento esses resultados forem comparados, é necessário ter em conta essa possibilidade.

As micropipetas foram verificadas conforme predito pela norma ISO 8655-6 que utiliza método gravimétrico para determinar erro de medição em micropipetas (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2002). A segunda ressalva para a verificação intermediária de balanças também é válida para as micropipetas. Os resultados de incerteza para a verificação intermediária são vistos na Tabela 2.31. O certificado de calibração do peso padrão utilizado pode ser consultado no Apêndice 1.

Tabela 2.31 Resultados do cálculo de incerteza para balança analítica e micropipetas

<i>Equipamento</i>	<i>Incerteza padrão combinada</i>	<i>Incerteza Expandida (k=2)</i>	<i>Incerteza percentual</i>
Balança analítica	0,0002 g	0,0003 g	0,03
Micropipeta 100 µL	0,002 mL	0,004 mL	4
Micropipeta 10 µL	0,0002 mL	0,0004 mL	4

Com todas as fontes de incerteza já desvendadas, passa-se ao cálculo de cada uma dessas fontes, iniciando-se pelo Branco fortificado. A solução padrão 1, combina duas subcomponentes: massa e volume do balão. A incerteza da massa basta utilizar-se da soma quadrática da incerteza padrão combinada da verificação da balança analítica (Equação 2.11).

$$u_{c(massa)} = \sqrt{(0,0002 \text{ g})^2 + (0,0002 \text{ g})^2} = 0,0003 \text{ g} \quad \text{Equação 2.11}$$

Já a subcomponente do Volume do balão, é calculado utilizando-se a Equação 2.12, combinando as subcomponentes de Temperatura e a de Calibração. A temperatura do laboratório foi de $22 \pm 0,5^\circ\text{C}$, diferindo da temperatura de calibração do balão em 2°C ($20 \pm 0,5^\circ\text{C}$), portanto a expansão térmica deve ser calculada. O coeficiente de expansão térmica da acetona, solvente utilizado é de $14,3 \cdot 10^{-4}/^\circ\text{C}$. A tolerância para o balão volumétrico de 100 mL classe A é de $\pm 0,1 \text{ mL}$ e utiliza-se a distribuição triangular para a tolerância do balão volumétrico. Obteve-se uma incerteza de $\pm 0,17 \text{ mL}$ para o volume do balão.

$$u_{c(vol.bal\tilde{a}o)} = \sqrt{\left(\frac{\Delta T \cdot C_{exp} \cdot V}{\sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{a}{\sqrt{6}}\right)^2} \quad \text{Equação 2.12}$$

$$u_{c(vol.bal\tilde{a}o)} = \sqrt{\left(\frac{2^\circ\text{C} \cdot 14,3 \cdot 10^{-4}/^\circ\text{C} \cdot 100 \text{ mL}}{\sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{0,1}{\sqrt{6}}\right)^2} = 0,17 \text{ mL}$$

A incerteza do padrão de pireno não pode ser contabilizada por não haver incerteza declarada no certificado do mesmo. Para encontrar a componente de incerteza da solução padrão 1 ($u_{c(C_1)}$), utilizou-se da Equação 2.13. A massa aferida do padrão de pireno foi 0,0108 g, com pureza de 0,914 e o volume do balão é de 100 mL. Obteve-se o valor de $\pm 2160 \mu\text{g L}^{-1}$.

A Regra 2 de combinação de incertezas também é válida para quando se combina incertezas com unidades diferentes, como massa em gramas e volume em mL.

$$u_{c(C_1)} = C_1 \cdot \sqrt{\left(\frac{u_{c(massa)}}{m}\right)^2 + \left(\frac{u_{c(vol.bal\tilde{a}o)}}{V}\right)^2} \quad \text{Equação 2.13}$$

$$u_{c(C_1)} = (9,9 \cdot 10^4 \mu g \cdot L^{-1}) \cdot \sqrt{\left(\frac{0,000235 g}{0,0108 g}\right)^2 + \left(\frac{0,17 mL}{100 mL}\right)^2} = 2160 \mu g \cdot L^{-1}$$

A solução padrão 2 possui os volumes da micropipeta de 100 μ L e do balão como subcomponentes além da incerteza da solução anterior (solução padrão 1). Foi utilizado um balão de 10 mL cuja tolerância é de $\pm 0,025$ mL. O cálculo da incerteza padrão combinada do balão volumétrico é encontrada na Equação 2.14, cujo cálculo resultou no valor $\pm 0,019$ mL.

$$u_{c(vol.bal\tilde{a}o)} = \sqrt{\left(\frac{\Delta T \cdot C_{exp} \cdot V}{\sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{a}{\sqrt{6}}\right)^2} \quad \text{Equação 2.14}$$

$$u_{c(vol.bal\tilde{a}o)} = \sqrt{\left(\frac{2^\circ C \cdot 14,3 \cdot 10^{-4} / ^\circ C \cdot 10 mL}{\sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{0,025}{\sqrt{6}}\right)^2} = 0,019 mL$$

Para a incerteza combinada do volume da micropipeta de 100 μ L, o cálculo é análogo ao anterior, apenas substituindo o termo da tolerância pela incerteza padrão combinada da verificação (Equação 2.15). O valor foi de $\pm 0,018$ mL.

$$u_{c(vol.microp)} = \sqrt{\left(\frac{\Delta T \cdot C_{exp} \cdot V}{\sqrt{3}}\right)^2 + (u_{ver})^2} \quad \text{Equação 2.15}$$

$$u_{c(vol.microp)} = \sqrt{\left(\frac{2^\circ C \cdot 14,3 \cdot 10^{-4} / ^\circ C \cdot 0,5 mL}{\sqrt{3}}\right)^2 + (0,0179 mL)^2} = 0,018 mL$$

Para encontrar a incerteza combinada da solução padrão 2 ($u_{c(C_2)}$) utilizou-se da Equação 2.16. A incerteza resultou em $\pm 207,74 \mu\text{g L}^{-1}$.

$$u_{c(C_2)} = C_2 \cdot \sqrt{\left(\frac{u_{c(C_1)}}{C_1}\right)^2 + \left(\frac{u_{c(vol.microp.)}}{V_{microp.}}\right)^2 + \left(\frac{u_{c(vol.bal\tilde{a}o)}}{V_{bal\tilde{a}o}}\right)^2} \quad \text{Equação 2.16}$$

$$u_{c(C_2)} = (4,95 \cdot 10^3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}) \cdot \sqrt{\left(\frac{2160 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}}{9,9 \cdot 10^4 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}}\right)^2 + \left(\frac{0,0179 \text{ mL}}{0,5 \text{ mL}}\right)^2 + \left(\frac{0,019 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right)^2} = 207,74 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$$

Na fortificação do branco, utilizou-se a micropipeta de 10 μL para o volume de fortificação e a proveta de 25 mL para medição do volume do branco. A incerteza padrão combinada do volume da micropipeta foi calculado pela Equação 2.17 e o do volume da proveta, pela Equação 2.18. A distribuição da tolerância da proveta foi considerada como retangular, pois não é uma vidraria de precisão, como o balão volumétrico. Por essa razão, a tolerância é dividida por $\sqrt{3}$. E nessa medição, o líquido foi água, cujo coeficiente de expansão térmica é de $1,3 \cdot 10^{-4}/^\circ\text{C}$.

$$u_{c(vol.microp)} = \sqrt{\left(\frac{\Delta T \cdot C_{exp} \cdot V}{\sqrt{3}}\right)^2 + (u_{ver})^2} \quad \text{Equação 2.17}$$

$$u_{c(vol.microp)} = \sqrt{\left(\frac{2^\circ\text{C} \cdot 1,3 \cdot 10^{-4}/^\circ\text{C} \cdot 0,0085 \text{ mL}}{\sqrt{3}}\right)^2 + (0,00018 \text{ mL})^2} = 0,0002 \text{ mL}$$

$$u_{c(vol.proveta)} = \sqrt{\left(\frac{\Delta T \cdot C_{exp} \cdot V}{\sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{a}{\sqrt{3}}\right)^2} \quad \text{Equação 2.18}$$

$$u_{c(vol.proveta)} = \sqrt{\left(\frac{2^\circ\text{C} \cdot 1,3 \cdot 10^{-4}/^\circ\text{C} \cdot 17 \text{ mL}}{\sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{0,04}{\sqrt{3}}\right)^2} = 0,02 \text{ mL}$$

E por fim, o cálculo da incerteza padrão da concentração do branco fortificado foi efetuada através da Equação 2.19. O resultado foi de $\pm 0,12 \mu\text{g L}^{-1}$.

$$u_{c(C_3)} = C_3 \cdot \sqrt{\left(\frac{u_{c(C_2)}}{C_2}\right)^2 + \left(\frac{u_{c(vol.microp.)}}{V_{microp.}}\right)^2 + \left(\frac{u_{c(vol.proveta)}}{V_{proveta}}\right)^2} \quad \text{Equação 2.19}$$

$$u_{c(C_2)} = (2,48 \mu g \cdot L^{-1}) \cdot \sqrt{\left(\frac{207,74 \mu g \cdot L^{-1}}{4,95 \cdot 10^3 \mu g \cdot L^{-1}}\right)^2 + \left(\frac{0,00018 mL}{8,5 \cdot 10^{-3} mL}\right)^2 + \left(\frac{0,023}{17 mL}\right)^2} = 0,12 \mu g \cdot L^{-1}$$

Partiu-se para o cálculo da componente Volume de amostra, sendo análogo ao volume do balão, só que utilizando a distribuição retangular para a proveta, pois não é uma vidraria de precisão (Equação 2.20).

$$u_{c(vol.proveta)} = \sqrt{\left(\frac{\Delta T \cdot C_{exp} \cdot V}{\sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{a}{\sqrt{3}}\right)^2} \quad \text{Equação 2.20}$$

$$u_{c(vol.proveta)} = \sqrt{\left(\frac{2^\circ C \cdot 1,3 \cdot 10^{-4} / ^\circ C \cdot 17 mL}{\sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{0,04}{\sqrt{3}}\right)^2} = 0,02 mL$$

A Curva de Calibração contribui com sua incerteza, já sendo ela calculada na etapa de validação. Para o pireno, a curva de calibração possui uma incerteza de $\pm 1,33 \mu g L^{-1}$. Esse valor também é um desvio padrão e consequentemente, uma incerteza padrão combinada.

A incerteza analítica combinada é calculada pela Equação 2.21. C_{curva} é $4,5 \mu g L^{-1}$ pois a incerteza é calculada para o ponto central da curva, como vista na seção 2.4.4.4. A incerteza expandida é calculada com $k=2$ (Equação 2.22).

$$u_{c(analitica)} = C_0 \cdot \sqrt{\left(\frac{u_{c(C_3)}}{C_3}\right)^2 + \left(\frac{u_{c(curva)}}{C_{curva}}\right)^2 + \left(\frac{u_{c(vol.proveta)}}{V_{proveta}}\right)^2} \quad \text{Equação 2.21}$$

$$u_{c(analitica)} = (2,48 \mu g \cdot L^{-1}) \cdot \sqrt{\left(\frac{0,12 \mu g \cdot L^{-1}}{2,48 \mu g \cdot L^{-1}}\right)^2 + \left(\frac{1,33 \mu g \cdot L^{-1}}{4,5 \mu g \cdot L^{-1}}\right)^2 + \left(\frac{0,023 mL}{17 mL}\right)^2} = 0,73 \mu g \cdot L^{-1}$$

$$U_{(analitica)} = u_{c(analitica)} \cdot k = 0,73 \cdot 2 = 1,45 \mu g \cdot L^{-1} \quad \text{Equação 2.22}$$

O resultado da medição, acompanhado de sua incerteza foi $2,5 \pm 1,4 \mu\text{g L}^{-1}$, respeitando os algarismos significativos e, em porcentagem, a incerteza analítica alcança 56%. Estudando agora separadamente cada fonte de incerteza, detecta-se que a curva de calibração é a fonte dominante, enquanto branco fortificado e volume da amostra tem contribuições menores e praticamente nula, respectivamente (Figura 2.32). Os resultados para os demais compostos podem ser vistos na Tabela 2.32.

Figura 2.32 Gráfico de barras para as contribuições das fontes de incerteza frente à incerteza global

Tabela 2.32 Resultados do cálculo de incerteza para os analitos

<i>Composto</i>	<i>Concentração ($\mu\text{g/L}$)</i>	<i>Incerteza ($\mu\text{g/L}$) (%)</i>	
Naftaleno	1,5	0,8	54,8
Acenaftileno	2,5	1,5	61,0
Acenafteno	1,5	0,7	46,2
Fluoreno	1,5	1,1	71,8
Octilfenol	0,5	0,2	36,2
Fenantreno	1,5	0,8	51,3
Nonilfenol	2,5	1,6	63,7
Fluoranteno	0,5	0,2	47,0
Pireno	2,5	1,5	59,0
Benzo[a]antraceno	1,5	0,7	46,9
Criseno	2,5	1,9	77,2
Benzo[b]fluoranteno	2,5	1,7	68,4
Benzo[a]pireno	2,5	2,8	112,7

O fato de a incerteza analítica ser alta, não invalida o resultado pois não há critério estabelecido por cliente ou norma utilizada. Ou seja, a incerteza apenas reflete uma dificuldade do método em sua Precisão. O que se deve destacar é que apesar da alta incerteza, esse resultado é comparável com qualquer outro resultado que for reproduzido em laboratório diferente utilizando-se dessa metodologia, pois possui rastreabilidade ao sistema SI conseguida através da verificação dos equipamentos com peso padrão calibrados.

2.4.6.2. Incerteza da Amostragem

A incerteza da amostragem não pode ser calculada, pois os resultados não refletem a variabilidade espaço-temporal do corpo d'água pois, como nenhum composto foi detectado, a variabilidade encontrada nos resultados é igual ao branco de amostra. Os resultados de concentração das amostras analisadas bem como a incerteza de medição podem ser encontrados no Apêndice 2. Valores negativos de concentração indicam que os resultados estão abaixo do limite de detecção, isto acontece uma vez que o equipamento extrapola a equação da reta que correlaciona a área do cromatograma com a concentração.

Como já comentado na seção 2.4.5 *Amostragem*, todos os resultados apresentados no Apêndice 2 estão abaixo do limite de detecção do método. No entanto, reportar esses resultados apenas como < MDL oculta muita informação útil para outros projetos de pesquisa. Através dos resultados sem edição, é possível observar que para analisar amostras dessa região será preciso uma capacidade analítica maior em termos de sensibilidade do equipamento, ou seja, conseguir detectar menores concentrações que este projeto visou para que se possa detectar e quantificar esses e outros compostos (THOMPSON, 2001), acessando dados sobre o padrão de qualidade do corpo hídrico e os limites de contaminantes permitidos por esse padrão de qualidade. Dessa forma evita-se o esforço analítico porque sabe-se que a metodologia alcança ou não as concentrações requeridas.

2.4.7. Controle de Qualidade Intralaboratorial

Para efetuar o controle de qualidade durante as análises das amostras, utilizou-se de duas cartas controle: Shewhart de média e a carta por diferença. A carta de Shewhart foi aplicada para o monitoramento da solução padrão de trabalho, utilizada para fortificação de amostras. Essa amostra controle poderia mostrar degradação da solução e também problemas técnicos no cromatógrafo. A carta por diferença foi aplicada em amostras brancas fortificadas para

monitorar mudanças na precisão do método e também erros sistemáticos na batelada. A periodicidade de análise da amostra da carta de Shewhart foi diária, enquanto que a da carta por diferença foi semanal. Para ambas as cartas, foram elencados quatro compostos para serem verificados nas cartas controle.

Os limites de atenção e ação da carta de Shewhart foram calculados como exposto no Capítulo 1. Já para a carta por diferença foram utilizados como limites o índice de repetibilidade, não necessitando de análise prévia, já que os limites são calculados levando-se em conta os resultados de repetibilidade do método. Os limites de atenção e ação para a carta de diferença foram calculados através da Equação 2.23, modificando o nível de confiança do *t* de Student ($t_{(n-1,1-\alpha)}$) para 95% e 99%, respectivamente.

$$r = t_{(n-1,1-\alpha)} \cdot \sqrt{2} \cdot s_{rep} \quad \text{Equação 2.23}$$

Para ambas as cartas controle, os compostos naftaleno, octilfenol, nonilfenol e benzo[a]pireno foram escolhidos. As Figura 2.33, Figura 2.34,

A entrada 17 apresentou situação fora de controle para naftaleno e tendência ascendente para os demais compostos (Figura 2.33). A análise crítica elencou a troca da coluna e utilização do GC por outro usuário. A medida corretiva foi a injeção de solvente para eliminar interferentes. No entanto, a entrada 18 continuou como fora de controle para naftaleno e agora, também para benzo[a]pireno. Como medida corretiva procede-se a limpeza do injetor, detector e condicionamento da coluna. Assim, na entrada 19 foi possível observar o sucesso da medida em solucionar o problema.

Figura 2.35 e Figura 2.36 mostram cada uma dessas cartas. À primeira vista, naftaleno e benzo[a]pireno apresentam muitas situações fora de controle. Porém, essas situações são tratadas assim quando foram ocorrendo. A 6ª entrada da carta contou com uma situação fora de controle para benzo[a]pireno (ponto saiu do limite de ação). Apesar de outros compostos não apresentarem uma situação fora de controle, apresentaram a tendência crescente, superando o limite de atenção. A situação fora de controle exigiu uma medida corretiva imediata. Após uma rápida análise de causa e efeito, a possível causa elencada foi a evaporação da solução padrão, o que poderia estar concentrando o composto benzo[a]pireno (menos volátil que o solvente, no caso a acetona). Como medida corretiva foi descartada a solução antiga e substituída por nova

solução (acondicionada em freezer à -10°C). Procedeu-se nova análise, e na entrada 7 é possível observar que o problema foi corrigido (Figura 2.36).

Na entrada 11, houve outra situação fora de controle, dessa vez para o naftaleno (Figura 2.33). Apenas benzo[a]pireno apresenta uma ascendente parecida. A análise crítica observou a presença de um pequeno pico de interferente junto do pico do naftaleno, o que causou esse aumento de área. Após uma injeção de solvente e não verificando nenhum interferente, procedeu-se nova análise do controle e a entrada 12 ratifica a volta à normalidade.

Os pontos 13 e 14 estão consecutivamente acima do limite de atenção para naftaleno e benzo[a]pireno (Figura 2.33 e Figura 2.36). A análise crítica elencou a baixa pressão do gás ar sintético, utilizado na chama do detector devido ao término do cilindro. Após a troca do cilindro, a entrada 15 evidencia que o problema foi corrigido.

Figura 2.33 Cartas controle de Shewhart para Naftaleno

Figura 2.34 Cartas controle de Shewhart para Octilfenol

A entrada 17 apresentou situação fora de controle para naftaleno e tendência ascendente para os demais compostos (Figura 2.33). A análise crítica elencou a troca da coluna e utilização do GC por outro usuário. A medida corretiva foi a injeção de solvente para eliminar interferentes. No entanto, a entrada 18 continuou como fora de controle para naftaleno e agora, também para benzo[a]pireno. Como medida corretiva procede-se a limpeza do injetor, detector e condicionamento da coluna. Assim, na entrada 19 foi possível observar o sucesso da medida em solucionar o problema.

Figura 2.35 Cartas controle de Shewhart para Nonilfenol

Figura 2.36 Cartas controle de Shewhart para Benzo[a]pireno

A entrada 24 apresentou situação fora de controle para benzo[a]pireno (Figura 2.36). Antes dessa análise, foram confeccionadas algumas barras sortivas e procedeu-se o condicionamento dessas barras, ficando 30 minutos no injetor. A análise crítica elencou a

presença de interferentes pelo condicionamento da barra sortiva. Medida corretiva foi o condicionamento coluna. Entrada 25 normal.

A entrada 27 foi outra situação fora de controle para o benzo[a]pireno e naftaleno (Figura 2.33 e Figura 2.36). A análise crítica direcionou para concentração da solução padrão. Foi efetuada a troca, mas a entrada 28 continua como situação fora de controle para naftaleno. A análise crítica direcionou para uma possível fonte de interferência da dessorção da barra sortiva. Um condicionamento foi efetuado e a partir da entrada 29, um condicionamento foi realizado todos os dias ao final das análises. É possível observar que as amplitudes dos resultados diminuíram em relação aos resultados anteriores. Nenhum dos compostos apresentou um valor excedendo os limites de atenção após a imposição do condicionamento diário. O que significa dizer que a dessorção da barra é uma fonte de interferência significativa no método.

Figura 2.37 Cartas controle de Diferença para Naftaleno

Figura 2.38 Cartas controle de Diferença para Octilfenol

Figura 2.39 Cartas controle de Diferença para Nonilfenol

Figura 2.40 Cartas controle de Diferença para Benzo[a]pireno

Naftaleno e nonilfenol apresentaram tendência acima e abaixo da média respectivamente, sendo necessário uma avaliação. Apesar de valores tendenciosamente acima e abaixo da média, estes ficaram em sua maioria próximo a média e dentro da faixa, sendo que quando se encontravam acima ou abaixo da faixa de controle, foram tomadas ações adequadas para correção do problema.

Para a carta controle por diferença, é possível observar que o primeiro ponto apresenta situação fora de controle para naftaleno, octilfenol e nonilfenol (Figura 2.37, Figura 2.38 e Figura 2.39). O que ocorreu foi que em uma das amostras aconteceu um vazamento e por isso a diferença entre a duplicata foi tão grande, repetindo o experimento obteve-se o retorno à

normalidade (entrada 2). Nas demais semanas, não houveram situações fora de controle detectadas na carta de controle. No entanto, apesar da carta de controle não ter detectado, na entrada 8, houve um vazamento nas duas replicata da amostra controle. Ocorreu um erro grosseiro mas a carta não detectou. É preciso de outro mecanismo que possa ser utilizado em casos como esse.

2.4.8. *Analytical Quality Assurance Cycle*

O *Analytical Quality Assurance Cycle* foi aplicado ao projeto, com algumas modificações, sendo elas a inserção de um programa de verificação dos equipamentos, ao invés da calibração propriamente dita. Desta maneira, foi demonstrado que é possível com essas ferramentas e pouco investimento, garantir a qualidade dos resultados gerados bem como sua rastreabilidade. No entanto, somente a aplicação dessas ferramentas não sanaram todas as dificuldades encontradas no dia a dia de análise, a exemplo do ocorrido no controle de qualidade, quando uma das cartas de controle não conseguiu detectar um erro grosseiro. Certamente, o analista observou o vazamento e sabia do ocorrido. E se faz necessário algum mecanismo ou sistema que atuando em conjunto com essas ferramentas possam respaldar situações em que o ciclo é ineficaz em sua atuação. Sobre esse mecanismo, trata-se o próximo Capítulo.

2.5. Conclusão

Para o desenvolvimento do método multirresíduo, que contemplou diferentes metas, destaca-se que no aperfeiçoamento da técnica muitos avanços foram alcançados, como a melhora do processo de refrigeração e, conseqüentemente, da vedação do sistema para suportar a pressão exercida pelo banho criostático e também pelo aquecimento da amostra, minimizando assim os vazamentos. O Planejamento Experimental pela matriz Doehlert foi primordial para a otimização da extração, levando ao ponto em que não se podia mais explorar novos níveis de temperatura e refrigeração por limitações instrumentais do protótipo. Na Validação do Método, muitas ferramentas estatísticas foram aplicadas, excluindo alguns compostos que não alcançaram os critérios específicos para se obter resultados confiáveis e readequando outros em faixas de concentração diferentes para um melhor desempenho. A amostragem e análise das amostras reais foi realizada, no entanto não foram obtidos resultados acima dos limites de quantificação, porém durante as análises, outras amostras para controle de qualidade foram

analisadas demonstrando que o método estava respondendo adequadamente, o que traz a necessidade de aumentar a capacidade analítica para amostras da região estudada (São Luiz do Paraitinga e Cunha).

A aplicação do *Analytical Quality Assurance Cycle* ao projeto de pesquisa foi executada com êxito, mostrando a interdependência entre as três ferramentas de qualidade: Validação, Cálculo de Incerteza e Controle de Qualidade Intralaboratorial. A união dessas ferramentas promoveu uma forma de garantir a qualidade e a rastreabilidade metrológica dos dados. É certo que algumas adaptações foram requeridas, como a verificação intermediária dos equipamentos de maior influência na análise, sendo elas, a balança analítica e micropipetas ao invés da calibração propriamente dita e algumas exigências não puderam ser cumpridas, como a utilização de materiais de referência certificados e padrões analíticos com incerteza declarada. Contudo, foi demonstrado que é possível aplicar conceitos da qualidade à pesquisa científica, tornando os dados confiáveis e em condições de serem comparados de forma interlaboratorial. No entanto, o ciclo da qualidade não conseguiu prover todos os meios para garantir a qualidade dos resultados e novas adaptações são necessárias.

2.6. Referências Bibliográficas

ADAMS, C.; CAMMANN, K.; DECKERS, H. A.; DOBKOWSKI, Z.; HOLCOMBE, D.; LAFLEUR, P. D.; RADVILA, P.; ROHRER, P.; STECK, W.; VERMAERCKE, P. **Eurachem/Citac guide: quality assurance for research and development and non-routine analysis**. Teddington: LGC, 1998. Disponível em: <www.eurachem.org>. Acesso em: 01 jul. 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (ANA); COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). **Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos**. Brasília: ANA, 2011. 327 p.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA); AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION(AWWA); WATER ENVIRONMENT FEDERATION (WEF). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22nd ed. Washington: APHA, 2012. 1469 p.

ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. Green analytical chemistry. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 6, p. 497–511, 2008.

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 2145–48, 1990.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR ISO/IEC 17025: requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração**. Rio de Janeiro, 2005. 37 p.

CONSELHO DE AVALIAÇÃO ECOSSISTÊMICA DO MILÊNIO. **Ecosistemas e o bem-estar humano** – estrutura para uma avaliação. Relatório do Grupo de Trabalho da Estrutura Conceitual da Avaliação Ecosistêmica do Milênio. São Paulo: Editora SENAC, 2005. 379 p.

BALTUSSEN, E.; SANDRA, P.; DAVID, F.; CRAMERS, C. Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 11, n. 10, p. 737–747, 1999.

BALTUSSEN, E.; CRAMERS, C. A.; SANDRA, P. J. F. Sorptive sample preparation: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 373, n. 1-2, p. 3–22, 2002.

BOFFETTA, P.; JOURENKOVA, N.; GUSTAVSSON, P. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Cancer causes & control: CCC**, v. 8, n. 3, p. 444–472, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria MS nº 2914 de 12 de Dezembro de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 de Dezembro 2011. nº 239 Seção 1, p. 39.

CARMI, J. D.; OLIVARES, I. R. B.; GROSSI, P.; LANCAS, F. M. Refrigerated sorptive extraction: determination of BTEX in water samples. **Journal of Chromatographic Science**, v. 47, n. 9, p. 812–6, 2009.

COORDENAÇÃO GERAL DE ACREDITAÇÃO. **DOQ-CGCRE-036**: Orientações sobre verificação intermediária das balanças. 2012. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?tOrganismo=C_alibEnsaio> Acesso em: 15 mar. 2013.

COORDENAÇÃO GERAL DE ACREDITAÇÃO (CGCRE). **DOQ-CGCRE-008**: Orientação sobre validação de métodos analíticos. 2011. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?tOrganismo=C_alibEnsaio> Acesso em: 10 out. 2012.

COSTA, Sérgio Pereira da. **Aplicação de ferramentas da qualidade no desenvolvimento de métodos multiresíduos**. 2012. 137 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

ELLISON, S. R. L.; RAMSEY, M. H. (Ed.). **Eurachem/EUROLAB/CITAC/Nordtest/AMC guide**: measurement uncertainty arising from sampling: a guide to methods and approaches. 2007. Disponível em: <www.eurachem.org>. Acesso em: 10 ago. 2013.

ESTADO DE SÃO PAULO. Secretaria de Meio Ambiente (SMA). Portaria SMA 100 de 17 de Outubro de 2013. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, São Paulo, 22 de Outubro de 2013. Seção 1 p. 41.

EUROPEAN ASSOCIATION OF NATIONAL METROLOGY INSTITUTES. **Guidelines on the calibration of non-automatic weighing instruments**. 2009. Disponível em: <www.euramet.org>. Acesso em: 13 jun. 2015.

EUROPEAN COMMISSION HEALTH; CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL. **SANCO/12571/2013**: guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. 2014. Disponível em: <http://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/allcrl/AqcGuidance_Sanco_2013_12571.pdf> Acesso em: 30 maio 2014.

FARRÉ, M.; PEREZ, S.; GONCALVES, C.; ALPENDURADA, M. F. F.; BARCELO, D.; PEREZ, S.; GONÇALVES, C. Green analytical chemistry in the determination of organic pollutants in the aquatic environment. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 11, p. 1347–62, 2010.

FIEDLER, S.; FOERSTER, M.; GLASER, B.; ZECH, W. Alkylphenols in sediments of the Atlantic Rainforest south-west of São Paulo, Brazil.. **Chemosphere**, v. 66, p. 212–218, 2007.

GILART, N. MARCÉ, R. M.; BORRULL, F.; FONTANALS, N. New coatings for stir-bar sorptive extraction of polar emerging organic contaminants. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 54, p. 11–23, 2014.

GORDON, B.; CALLAN, P.; VICKERS, C. **WHO guidelines for drinking-water quality**. Geneva: WHO, 2008.

GRØN, C.; HANSEN, J. B.; MAGNUSSON, B.; NORDBOTTEN, A.; KRYSELL, M.; ANDERSEN, K. J.; LUND, U. **NT Technical Report 604**: uncertainty from sampling - a nordtest handbook for sampling planners on sampling quality assurance and uncertainty estimation. 2007. Disponível em: <www.nordicinnovation.net>. Acesso em: 02 abr. 2012.

GROSSI, Paula. **Desenvolvimento e aplicação de técnicas miniaturizadas de preparo de amostras para análises ambientais via GC-MS**. 2009. 148 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

HE, M.; CHEN, B.; HU, B. Recent developments in stir bar sorptive extraction. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 8, p. 2001–26, 2014.

HERING, J. G.; WAITE, T. D.; LUTHY, R. G.; DREWES, J. E.; SEDLAK, D. L. A. Changing framework for urban water systems. **Environmental science & technology**, v. 47, n. 19, p. 10721–6, 2013.

INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH IN CANCER (IARC). **Xylenes**. 1989. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol71/mono71-58.pdf>>. Acesso em: 22 jan. 2012.

INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH IN CANCER (IARC). **Toluene**. 1992. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol71/mono71-36.pdf>>. Acesso em: 22 jan. 2012.

INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH IN CANCER (IARC). **Ethylbenzene**. 1996. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol77/mono77-10.pdf>>. Acesso em: 22 jan. 2012.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 8655-6**: piston-operated volumetric apparatus — Part 6: gravimetric methods for the determination of measurement error. Geneva: ISO copyright office, 2002. 22 p.

JARDIM, W. F.; MONTAGNER, C. C.; PESCARA, I. C.; UMBUZEIRO, G. A.; DI DEA BERGAMASCO, A. M.; ELDRIDGE, M. L.; SODRÉ, F. F. An integrated approach to evaluate emerging contaminants in drinking water. **Separation and Purification Technology**, v. 84, p. 3–8, 2012.

KONIECZKA, P.; NAMIESNIK, J. **Quality Assurance and Quality Control in the Analytical Chemical Laboratory**. New York: CRC, 2009. 239 p.

LAAKS, J.; JOCHMANN, M. A.; SCHMIDT, T. C. Solvent-free microextraction techniques in gas chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 2, p. 565–571, 2012.

LEITE, F. **Amostragem**: Fora e Dentro do Laboratório. Campinas: Editora Átomo, 2005. 100 p.

LIMA, Guilherme Theodoro Nascimento Pereira de. **Metodologia para avaliação de forças motoras e vetores de mudança na determinação de serviços ecossistêmicos . Estudo de caso: Ilha de São Sebastião – SP / Brasil**. 2011. 176 f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

LOBEL, F. **Alckmin prepara pacote de oito obras para enfrentar o deserto de 2015**. Folha de São Paulo, 4 de Fevereiro de 2015. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/cotidiano/2015/02/1584869-alckmin-prepara-pacote-de-oito-obras-para-enfrentar-deserto-de-2015.shtml>>. Acesso em: 5 fev. 2015.

MARTENDAL, E.; CARASEK, E. A new optimization strategy for gaseous phase sampling by an internally cooled solid-phase microextraction technique. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 3, p. 367–72, 2011a.

MARTENDAL, E.; CARASEK, E. A new approach based on a combination of direct and headspace cold-fiber solid-phase microextraction modes in the same procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and phthalate esters in soil samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 13, p. 1707–14, 2011b.

MENEZES, H. C.; DE LOURDES CARDEAL, Z. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons from ambient air particulate matter using a cold fiber solid phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry method. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 21, p. 3300–3305, 2011.

MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. 5th ed. Harlow: Pearson Education Limited, 2005. 285 p.

MOREIRA, D. S.; AQUINO, S. F.; AFONSO, R. J. C. F.; SANTOS, E. P. P. C.; PÁDUA, V. L. Occurrence of endocrine disrupting compounds in water sources of Belo Horizonte Metropolitan Area, Brazil. **Environmental Technology**, v. 30, p. 1041–1049, 2009.

MOREIRA, M.; AQUINO, S.; COUTRIM, M.; SILVA, J.; AFONSO, R. Determination of endocrine-disrupting compounds in waters from Rio das Velhas, Brazil, by liquid chromatography/high resolution mass spectrometry (ESI-LC-IT-TOF/MS). **Environmental Technology**, v. 32, p. 1409-1417, 2011.

OLIVARES, I. R. B.; LOPES, F. A. Essential steps to providing reliable results using the analytical quality assurance cycle. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 35, p. 109–21, 2012.

PRIETO, A. BASAURI, O.; RODIL, R.; USOBIAGA, A.; FERNANDEZ, L. A.; ETXEBARRIA, N.; ZULOAGA, O. Stir-bar sorptive extraction: a view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions. **Journal of chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2642–66, 2010.

RAMOS, L. Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1221, p. 84–98, 2012.

RODRIGUES, R. V. et al. Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 9, p. 2054–2059, 2010.

SEETHAPATHY, S.; GÓRECKI, T. Applications of polydimethylsiloxane in analytical chemistry: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 750, p. 48–62, 2012.

SILVA, C.A.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; KATSUMITI, A.; ARAÚJO, M.L.P.; ZANDONÁ, E.M.; COSTA SILVA, G.P.; MASCHIO, J.; ROCHE, H.; SILVA DE ASSIS, H.C. Evaluation of waterborne 20/22 exposure to oil spill 5 years after an accident in Southern Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 400–409, 2009.

SILVA, T. F.; AZEVEDO, D. A.; AQUINO NETO, F. R. distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments and waters from Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 18, p. 628-637, 2007.

SOARES, A. GUIEYSSE, B.; JEFFERSON, B.; CARTMELL, E.; LESTER, J. N. Nonylphenol in the environment: a critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. **Environment International**, v. 34, n. 7, p. 1033–1049, 2008.

THOMPSON, M (Ed.). What should be done with results below the detection limit? mentioning the unmentionable. **AMC Technical Brief**, n. 5, 2001. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:amc+technical+briefs#0>> Acesso em: 30 out. 2015.

THOMPSON, M (Ed.). The amazing Horwitz function. **AMC Technical Brief**, n. 17, 2004. Disponível em: <[amc\amctb\statsc\horwitzb_v2.doc](#)> Acesso em: 01 maio 2014.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. (USEPA). **Guidance for methods development and methods validation for the RCRA program**. 2006. Disponível em: <<http://www.epa.gov/wastes/hazard/testmethods/pdfs/methdev.pdf>> Acesso em: 05 set. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Exposure to benzene:** a major public health concern. 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/ipcs/features/benzene.pdf>>. Acesso em: 30 nov. 2011.

ZANARDI, E.; BÍCEGO, M. C.; MIRANDA, L. B.; WEBER, R. R. distribution and origin of hydrocarbons in water and sediment in São Sebastião, SP, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 38, p. 261-267, 1999.

Capítulo 3 Sistemas de Gestão da Qualidade e Rastreabilidade Documental

3.1. Considerações iniciais

No capítulo anterior, pode-se observar a ineficácia da ferramenta de controle de qualidade, a carta-controle de diferença, em detectar um erro grosseiro no experimento. Como se sabe, erros grosseiros não podem ser compensados. A única alternativa foi descartar o resultado. Porém essa decisão não foi tomada tendo em vista o controle de qualidade ou qualquer uma das outras ferramentas da qualidade. Foi feita por um fato observado pelo analista, que anotou em caderno próprio, caderno de experimentos, e depois sabendo da informação, descartou o resultado. Esse fato é importante para iniciar uma discussão sobre Registros e o funcionamento de um Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ).

Nos capítulos anteriores também foi discutida a questão da rastreabilidade metrológica, que se baseia na cadeia ininterrupta de calibrações, levando o resultado gerado no laboratório a ser rastreável ao padrão de referência internacional do BIPM. Agora, será introduzido um novo conceito, a Rastreabilidade da Informação ou Documental, sem referência externa, ou seja, a rastreabilidade é horizontal, interna ao Sistema de Gestão da Qualidade.

3.2. Sistemas de Gestão de Qualidade para Laboratórios

A questão do vazamento das duplicatas do Capítulo 2 conduz a uma pergunta importante: quais são os processos que podem interferir na qualidade do resultado? Logo de início, pode-se citar a execução da etapa de extração pela metodologia, pois foi nessa etapa que ocorreu o vazamento. Da mesma forma, a determinação por GC/FID também pode afetar o resultado, pois se os parâmetros como temperatura da coluna, ou temperatura do injetor forem modificados, o resultado será diferente. Assim, a amostragem, a capacidade analítica do laboratório, transporte, acondicionamento das amostras, validação da metodologia, cálculo da incerteza, controle de qualidade, interpretação dos dados e redação do relatório podem, se feitas de forma ineficaz, afetar o resultado final.

A Figura 3.1 ilustra os processos que influem na qualidade do resultado final. Por essa razão, é necessário controlar esses processos de uma forma que em todos os momentos em que estiverem sendo executados, haja a garantia de que a qualidade do resultado seja mantida dentro

de padrões adequados. Para essa função existem os Sistemas de Gestão da Qualidade (SGQ). Qualidade é a “capacidade de atender as expectativas e necessidades do cliente” (OLIVARES, 2009). Mas quem seria o cliente no caso de um laboratório de P&D universitário?

Figura 3.1 Fluxograma das etapas que influem na qualidade do resultado final da análise

Há quem diga que são as agências de fomento, que financiam a pesquisa e cobram os resultados contudo, representam uma parcela pequena dos clientes do laboratório. Um laboratório universitário existe para formação de pessoal qualificado. Esse pessoal é um cliente, o qual executa atividades de desenvolvimento e de pesquisa que, como comentado no início do Capítulo 1, é utilizado como base para novos desenvolvimentos. Dessa forma, a Ciência é outra cliente do laboratório. E por fim, o mais importante dos clientes: a sociedade civil, pois é em prol dela que todo o desenvolvimento é feito, para melhorar a qualidade de vida, resolver problemas que não podiam ser solucionados, entre outros atributos. Com uma lista tão grande de clientes, não se pode ser negligente com a qualidade do resultado.

Existem dois principais sistemas de gestão da qualidade para laboratórios utilizados no Brasil, ditados pelas seguintes normas: a NBR ISO/IEC 17025:2005 e as Boas Práticas de Laboratório (BPL). A principal diferença entre as duas normas é que a NBR ISO/IEC 17025

tem seu foco no laboratório como um todo e a BPL foca no estudo (experimento) que é feito dentro do laboratório. Por essa razão, a BPL é mais específica, sendo sua aplicação mais restrita, necessitando de menos requisitos para ser aplicada, enquanto a NBR ISO/IEC 17025 é o contrário: mais geral e aplicada à uma vastidão de laboratórios, porém, com mais requisitos a serem cumpridos (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2005; OLIVARES, 2009; DIVISÃO DE ACREDITAÇÃO DE LABORATÓRIOS, 2011).

Para um projeto de pesquisa, o que mais se enquadra, é a BPL, pois foi originalmente desenvolvida para controlar a qualidade em estudos não-clínicos de saúde e segurança ao meio ambiente (por exemplo, registro de agrotóxicos) (DIVISÃO DE ACREDITAÇÃO DE LABORATÓRIOS, 2011). A NBR ISO/IEC 17025 trata melhor de análises de rotina. No entanto, a BPL não contempla a exigência do cálculo de incerteza, ferramenta utilizada neste trabalho e de vital importância na rastreabilidade metrológica para prover uma métrica de comparação.

A melhor maneira encontrada de implantar um SGQ para laboratórios de pesquisa universitários não foi se basear em uma ou outra norma e sim considerar os requisitos de cada uma que podiam contribuir para a garantia da qualidade. Por isso foi implantado um sistema de gestão de qualidade mesclado dessas duas normas no *Research and Quality Assurance for Laboratories* (RQA Lab). Foram utilizados nesse processo, como base para os documentos do sistema, aqueles gerados pelos alunos da disciplina de graduação “Sistema ISO/IEC 17025” ministrada pelo Prof. Dr. Igor Renato Bertoni Olivares, que contou com um projeto de monitoria feito pelo autor deste trabalho no primeiro semestre de 2014.

3.2.1. *Manual da Qualidade*

O Manual de Qualidade é um documento vital no sistema de qualidade regido pela NBR ISO/IEC 17025. É esse documento que traz toda a estrutura de funcionamento do laboratório, todos os procedimentos operacionais e suas inter-relações (OLIVARES, 2009). O Manual da Qualidade precisa conter as informações sobre as atividades do laboratório (o que se faz no laboratório); o comprometimento em atender as exigências do sistema de gestão; definição de responsabilidades (de atuação dentro do SGQ) para as funções do laboratório; organograma da estrutura da organização do laboratório (como cada área se inter-relaciona com a outra); descrição dos procedimentos e fluxograma de funcionamento levando em conta os procedimentos operacionais padrão (POPs).

3.2.2. Procedimentos Operacionais Padrão

Os procedimentos operacionais padrão são uma forma de controlar os processos que afetam a qualidade do resultado. Os POPs descrevem detalhadamente como cada ação é executada, independente de qual funcionário irá executar a tarefa, determinando um padrão de operação. Por isso, para cada processo, existe um procedimento específico. E na maioria das vezes em que um procedimento é executado, isso demanda um registro.

3.2.3. Registros

Registro é uma atividade rotineira e de suma importância pois sem ele, não se pode provar que o procedimento foi executado. Quando qualquer pessoa viaja a passeio ou mesmo a trabalho, fotografa paisagens ou lugares que acha interessante. A pessoa quer registrar esse momento da viagem. O registro no SGQ, nada mais é do que uma foto de um momento importante para a manutenção da qualidade do produto ou serviço desenvolvido.

Toma-se como exemplo uma denúncia de contaminação de lençol freático por um posto de combustível. Após acolhimento da denúncia, é necessárias provas e uma delas é a análise do corpo d'água. Suponha-se que os resultados de contaminação fossem alarmantes e esse relatório fosse anexado aos autos do processo como prova. A defesa tentaria de todas as formas desqualificar esse relatório e as seguintes questões seriam feitas: os equipamentos utilizados eram calibrados? As amostras colhidas não poderiam ter sofrido contaminação durante a amostragem e transporte para o laboratório? Quando da chegada da amostra no laboratório a mesma foi armazenada corretamente? A contaminação poderia ter ocorrido dentro do laboratório? O analista era competente para realizar a análise?

Então os responsáveis pelo relatório apresentam seus registros de calibração dos equipamentos utilizados, apresentam os registros de análise de brancos de viagem e de campo, bem como de contaminação cruzada, mostram também o registro de chegada da amostra e acondicionamento em refrigerador a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$. Mostram o registro da análise da amostra branca, que prova que nenhuma contaminação poderia ter ocorrido no laboratório. Por fim, não foi registrado o treinamento do analista no equipamento utilizado, pois o certificado de treinamento se perdeu em meio à documentação do laboratório. Como não se prova que o analista era competente para realizar a análise, a defesa convence o juiz que a análise pode ter sido mal processada e o processo é ganho pelo posto de combustível e isso porque houve uma falha na rastreabilidade documental do laboratório.

3.3. Rastreabilidade Documental

A rastreabilidade documental aplicada ao resultado, gera um conjunto de documentos (POPs e registros) que dão embasamento para sua confiabilidade metrológica. Por essa razão, o simples fato de não poder provar que o analista era competente para operar o equipamento é suficiente para refutar a validade do resultado apesar de todas as ferramentas de garantia da qualidade aplicadas. Da mesma forma, se não houvesse um registro do vazamento durante a execução da etapa de extração, o resultado seria relatado normalmente e um falso resultado embasaria uma conclusão científica.

3.3.1. *Caderno de Laboratório*

No final de 2014, a Comissão de Pós-graduação do Instituto de Química de São Carlos resolveu padronizar os cadernos de laboratórios dos alunos da pós-graduação, com o intuito de resolver possíveis litígios em relação aos autores de patentes. Contudo essa padronização pode ajudar no futuro, num possível esforço para garantia da qualidade dos resultados de pesquisa do instituto, já que cumpre um dos requisitos da BPL, de haver um caderno onde todas as informações e observações sobre o experimento são registradas (DIVISÃO DE ACREDITAÇÃO DE LABORATÓRIOS, 2011).

3.4. Considerações finais

Tudo que foi construído neste trabalho teve como objetivo romper com uma fronteira: de ligar a pesquisa e desenvolvimento em universidades brasileiras à metrologia. O sistema de gestão de qualidade implantado no RQA Lab foi suficiente para suprir as necessidades do projeto em questão, mas adaptações são necessárias para cada intuito. É desejo do autor desse trabalho que essas informações sejam divulgadas amplamente, pois essa também é uma porta para aproximar empresas e universidades. Desta maneira, os resultados desta etapa final do trabalho (que consistiu em elaborar procedimentos para estruturar um Sistema de Gestão de Qualidade em um laboratório de pesquisa), se encontram na seção Apêndices, podendo servir como referência para outros laboratórios de pesquisa. Além disso, o Apêndice 14 traz uma publicação sobre a implementação do Sistema de Gestão de Qualidade no laboratório de pesquisa.

3.5. Referências Bibliográficas

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR ISO/IEC 17025:** requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2005. 37 p.

DIVISÃO DE ACREDITAÇÃO DE LABORATÓRIOS (DICLA). **NIT-DICLA 035:** princípios das boas práticas de laboratório - BPL, 2011. Disponível em:
<http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?tOrganismo=CalibEnsaio> Acesso em: 18 mar. 2013.

OLIVARES, I. R. B. **Gestão de qualidade em laboratórios.** 2ª Ed. Campinas: Editora Átomo, 2009. 146 p.

Apêndices

Apêndice 1 - Certificado de Calibração do Peso padrão de 1 g.

PADRÃO
BALANÇAS

CERTIFICADO DE CALIBRAÇÃO Nº MA 278_02_14

Solicitante:
USP São Carlos - IQSC - Instituto de Química de São Carlos
Rua Trabalhador Sancarlene, 400 - Prédio 01- São Carlos / SP

Contratante:
☐ Mesmo
☐ Mesmo

Objeto Calibrado: Peso Padrão 3 Peças

Descrição dos Objetos Calibrados	1 g, 100 g e 200 g	Identificação do Conjunto	Não Consta
Nome do Fabricante	Quanto Brasil	Número de Série	Não Consta
Classe Declarada	E2	Número do Processo	16801-02/2014
Data do Recebimento	31/01/2014	Data da Emissão	12/03/2014
Gerente Técnico Erick A. de Souza	Data da Calibração	07/03/2014
		Técnico Executante	Bruno Soares

A calibração foi realizada conforme procedimento interno, por comparação direta com pesos de referência utilizando-se o método de dupla substituição "ABBA", com pesos de referência de classe superior ao objeto medido, segundo a classificação da OIML, conforme Instrução Técnica 022 do Manual de Qualidade da Padrão Balanças.

Nome do Fabricante	Quanto Brasil	Número de Série	Não Consta
Classe Declarada	E2	Número do Processo	16801-02/2014
Data do Recebimento	31/01/2014	Data da Emissão	12/03/2014
Gerente Técnico Erick A. de Souza	Data da Calibração	07/03/2014
		Técnico Executante	Bruno Soares

A calibração foi realizada conforme procedimento interno, por comparação direta com pesos de referência utilizando-se o método de dupla substituição "ABBA", com pesos de referência de classe superior ao objeto medido, segundo a classificação da OIML, conforme Instrução Técnica 022 do Manual de Qualidade da Padrão Balanças.

Rastreabilidade

 pesos Padrões Utilizados	Balanças Utilizadas
Conjunto de Pesos Padrão classe E1, Caixa 50, certificado nº DIMCI 2212/2011, emitido por INMETRO, válido até 28/09/2015	Balança: BAL 008, calibrado em 23/01/2014, certificado nº BA 052_01_14, válido até 23/07/2014 Balança: BAL 001, calibrado em 23/01/2014, certificado nº BA 053_01_14, válido até 23/07/2014

Condições Ambientais

Condições Ambientais Durante a Calibração:	Instrumentos Utilizados
Temperatura: 20,2 °C ± 0,7 °C	Termômetro: TAG nº PA-TM 003, Certificado de Calibração nº LV 53237-12 Emitido por Viacom, válido até 20/12/2014
Umidade Relativa do Ar: 52 % ± 10 %	Barômetro: TAG nº PA-BAR 003, Certificado de Calibração nº PS12049/13 Emitido por Setting, válido até 18/12/2015
Pressão Atmosférica: 922 hPa ± 10 hPa	

FOR 001 REV. 08 Página: 1/2

Rua Rafael Fico, 826 - Vila Brasilina - São Paulo / SP - CEP: 04163-050
Fone/Fax: (11) 5047-3360 - E-mail: padrao@quadrabolancas.com.br

Apêndice 2 – Resultados de Análise de Amostras de Água superficial

Tabela B.1: Resultados das análises das amostras coletadas em Fevereiro e Março de 2015. Valores acompanhados de sua respectiva incerteza expandida (k=2), em unidades de ng/g.

<i>Bacia</i>	<i>Naftaleno</i>	<i>Acenaftleno</i>	<i>Acenafteno</i>	<i>Fluoreno</i>	<i>Octilfenol</i>	<i>Fenantreno</i>	<i>Nonilfenol</i>
1	0,23 ± 0,02	-0,79 ± 0,06	0,00 ± 0,01	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,01 ± 0,05	0,1 ± 0,4
2	0,23 ± 0,02	-0,8 ± 0,2	0,002 ± 0,004	0,1 ± 0,2	0,01 ± 0,01	0,003 ± 0,003	0,2 ± 0,6
3	0,24 ± 0,03	-0,78 ± 0,03	0,01 ± 0,01	0,1 ± 0,2	0,03 ± 0,08	0,01 ± 0,02	0,1 ± 0,4
4	0,23 ± 0,02	-0,80 ± 0,07	0,00 ± 0,01	0,1 ± 0,1	0,01 ± 0,04	0,01 ± 0,01	0,1 ± 0,2
5	0,22 ± 0,01	-0,77 ± 0,08	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,04	0,003 ± 0,003	0,01 ± 0,01	0,010 ± 0,004
6	0,3 ± 0,1	-0,8 ± 0,2	0,01 ± 0,01	0,1 ± 0,2	0,03 ± 0,04	0,02 ± 0,04	0,04 ± 0,08
7	0,23 ± 0,03	-0,8 ± 0,1	0,002 ± 0,001	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01
8	0,23 ± 0,01	-0,80 ± 0,01	0,001 ± 0,002	0,02 ± 0,03	0,01 ± 0,03	0,003 ± 0,003	0,003 ± 0,001
10	0,23 ± 0,02	-0,8 ± 0,2	0,001 ± 0,002	0,0 ± 0,02	0,007 ± 0,001	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01
11	0,23 ± 0,02	-0,8 ± 0,2	0,00 ± 0,01	0,1 ± 0,2	0,01 ± 0,04	0,02 ± 0,05	0,2 ± 0,8
12	0,23 ± 0,03	-0,7 ± 0,4	0,01 ± 0,01	0,1 ± 0,1	0,01 ± 0,02	0,02 ± 0,05	0,02 ± 0,06
13	0,23 ± 0,01	-0,79 ± 0,04	0,004 ± 0,003	0,07 ± 0,09	0,05 ± 0,06	0,02 ± 0,04	0,2 ± 0,2
14	0,24 ± 0,05	-0,79 ± 0,06	0,004 ± 0,001	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,05	0,01 ± 0,01	0,1 ± 0,2
15	0,23 ± 0,03	-0,81 ± 0,02	0,001 ± 0,002	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,003 ± 0,005	0,01 ± 0,01
16	0,23 ± 0,01	-0,8 ± 0,1	0,00 ± 0,01	0,02 ± 0,05	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,02	0,1 ± 0,2
18	0,22 ± 0,01	-0,80 ± 0,01	0,003 ± 0,000	0,05 ± 0,05	0,04 ± 0,05	0,01 ± 0,01	0,1 ± 0,2
19	0,23 ± 0,01	-0,8 ± 0,1	0,001 ± 0,003	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,002 ± 0,003	0,01 ± 0,02
20	0,23 ± 0,03	-0,79 ± 0,02	0,004 ± 0,003	0,08 ± 0,08	0,07 ± 0,09	0,03 ± 0,03	0,4 ± 0,6
22	0,23 ± 0,02	-0,80 ± 0,04	0,002 ± 0,003	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,06	0,01 ± 0,02	0,1 ± 0,3
23	0,23 ± 0,01	-0,819 ± 0,001	0,001 ± 0,001	0,003 ± 0,003	0,01 ± 0,01	0,004 ± 0,002	0,01 ± 0,01
24	0,22 ± 0,02	-0,80 ± 0,02	0,00 ± 0,01	0,04 ± 0,04	0,02 ± 0,03	0,02 ± 0,04	0,1 ± 0,2
26	0,224 ± 0,004	-0,8 ± 0,2	0,00 ± 0,01	0,05 ± 0,09	0,02 ± 0,04	0,00 ± 0,01	0,1 ± 0,1
27	0,23 ± 0,01	-0,80 ± 0,04	0,00 ± 0,01	0,1 ± 0,2	0,01 ± 0,03	0,01 ± 0,03	0,1 ± 0,2
28	0,23 ± 0,01	-0,79 ± 0,06	0,01 ± 0,01	0,1 ± 0,2	0,01 ± 0,03	0,02 ± 0,01	0,08 ± 0,04
29	0,229 ± 0,002	-0,8 ± 0,1	0,004 ± 0,003	0,08 ± 0,05	0,03 ± 0,08	0,01 ± 0,01	0,2 ± 0,1
30	0,23 ± 0,02	-0,795 ± 0,004	0,002 ± 0,001	0,07 ± 0,09	0,05 ± 0,08	0,00 ± 0,01	0,03 ± 0,04
31	0,23 ± 0,01	-0,80 ± 0,03	0,00 ± 0,01	0,05 ± 0,05	0,0 ± 0,1	0,01 ± 0,02	0,2 ± 0,3

Os compostos acenaftileno, benzo[a]antraceno e criseno apresentam resultados negativos para a concentração. Isso ocorre do fato de estarem abaixo do limite de detecção do método (MDL) e por serem calculados por uma extrapolação da curva de calibração, pois a mesma se inicia no limite de quantificação (LOQ). Não existe concentração negativa. Para vários resultados, a incerteza é maior que o resultado. Isso também ocorre porque não há detecção e o resultado não apresenta diferença estatística significativa do branco da análise, o que faz o resultado flutuar próximo ao "zero" da curva de calibração, podendo assumir valores negativos, quando se observa a dispersão do resultado pela incerteza.

Tabela B.1 (Continuação): Resultados das análises das amostras coletadas em Fevereiro e Março de 2015. Valores acompanhados de sua respectiva incerteza expandida (k=2), em unidades de ng/g.

<i>Bacia</i>	<i>Fluoranteno</i>	<i>Pireno</i>	<i>Benzo[a]antraceno</i>	<i>Criseno</i>	<i>Benzo[b]fluoranteno</i>	<i>Benzo[a]pireno</i>
1	0,02 ± 0,03	0,06 ± 0,09	-0,3 ± 0,2	-0,2 ± 0,2	0,13 ± 0,09	0,0 ± 0,1
2	0,02 ± 0,04	0,03 ± 0,07	-0,3 ± 0,2	-0,23 ± 0,02	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,2
3	0,01 ± 0,02	0,04 ± 0,03	-0,3 ± 0,3	-0,22 ± 0,09	0,07 ± 0,03	0,2 ± 0,5
4	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,05	-0,3 ± 0,4	-0,23 ± 0,04	0,0 ± 0,1	0,1 ± 0,2
5	0,00 ± 0,01	0,008 ± 0,003	-0,34 ± 0,01	-0,24 ± 0,01	0,06 ± 0,07	0,2 ± 0,3
6	0,02 ± 0,04	0,03 ± 0,04	-0,32 ± 0,05	-0,24 ± 0,02	0,12 ± 0,08	0,1 ± 0,2
7	0,004 ± 0,002	0,01 ± 0,01	-0,34 ± 0,02	-0,239 ± 0,003	0,09 ± 0,07	0,15 ± 0,08
8	0,006 ± 0,004	0,008 ± 0,003	-0,34 ± 0,01	-0,240 ± 0,001	0,05 ± 0,01	0,2 ± 0,1
10	0,005 ± 0,004	0,01 ± 0,01	-0,34 ± 0,02	-0,24 ± 0,01	0,07 ± 0,06	0,12 ± 0,05
11	0,02 ± 0,05	0,04 ± 0,12	-0,3 ± 0,3	-0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,3
12	0,03 ± 0,07	0,04 ± 0,12	-0,31 ± 0,05	-0,2 ± 0,3	0,08 ± 0,09	0,12 ± 0,07
13	0,02 ± 0,02	0,05 ± 0,07	-0,3 ± 0,1	-0,2 ± 0,1	0,08 ± 0,03	0,03 ± 0,02
14	0,011 ± 0,002	0,03 ± 0,02	-0,31 ± 0,04	-0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,4	0,10 ± 0,07
15	0,003 ± 0,002	0,01 ± 0,01	-0,35 ± 0,05	-0,24 ± 0,01	0,04 ± 0,04	0,2 ± 0,3
16	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,02	-0,3 ± 0,1	-0,22 ± 0,05	0,05 ± 0,04	0,1 ± 0,2
18	0,02 ± 0,04	0,03 ± 0,03	-0,3 ± 0,1	-0,23 ± 0,06	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
19	0,003 ± 0,003	0,01 ± 0,01	-0,33 ± 0,02	-0,238 ± 0,003	0,1 ± 0,2	0,09 ± 0,09
20	0,02 ± 0,01	0,04 ± 0,03	-0,28 ± 0,02	-0,21 ± 0,02	0,1 ± 0,2	0,05 ± 0,04
22	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,04	-0,3 ± 0,1	-0,22 ± 0,07	0,12 ± 0,23	0,2 ± 0,3
23	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	-0,33 ± 0,06	-0,23 ± 0,01	0,08 ± 0,09	0,2 ± 0,4
24	0,01 ± 0,02	0,03 ± 0,02	-0,3 ± 0,2	-0,2 ± 0,1	0,07 ± 0,08	0,1 ± 0,2
26	0,01 ± 0,02	0,02 ± 0,03	-0,3 ± 0,2	-0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,3
27	0,01 ± 0,03	0,04 ± 0,08	-0,3 ± 0,1	-0,2 ± 0,2	0,10 ± 0,09	0,2 ± 0,5
28	0,02 ± 0,04	0,06 ± 0,07	-0,3 ± 0,1	-0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
29	0,01 ± 0,01	0,04 ± 0,03	-0,3 ± 0,2	-0,22 ± 0,08	0,2 ± 0,3	0,1 ± 0,2
30	0,01 ± 0,02	0,03 ± 0,01	-0,32 ± 0,04	-0,23 ± 0,03	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,2
31	0,01 ± 0,02	0,03 ± 0,02	-0,3 ± 0,2	-0,22 ± 0,07	0,07 ± 0,09	0,2 ± 0,3

Os compostos acenaftileno, benzo[a]antraceno e criseno apresentam resultados negativos para a concentração. Isso ocorre do fato de estarem abaixo do limite de detecção do método (MDL) e por serem calculados por uma extrapolação da curva de calibração, pois a mesma se inicia no limite de quantificação (LOQ). Não existe concentração negativa. Para vários resultados, a incerteza é maior que o resultado. Isso também ocorre porque não há detecção e o resultado não apresenta diferença estatística significativa do branco da análise, o que faz o resultado flutuar próximo ao "zero" da curva de calibração, podendo assumir valores negativos, quando se observa a dispersão do resultado pela incerteza.

Tabela B.2: Resultados das análises das amostras coletadas em Agosto de 2015. Valores acompanhados de sua respectiva incerteza expandida (k=2), em unidades de ng/g.

<i>Bacia</i>	<i>Naftaleno</i>	<i>Acenaftleno</i>	<i>Acenafteno</i>	<i>Fluoreno</i>	<i>Octilfenol</i>	<i>Fenantreno</i>	<i>Nonilfenol</i>
1	0,24 ± 0,05	-0,79 ± 0,01	0,00 ± 0,01	0,06 ± 0,03	0,03 ± 0,09	0,006 ± 0,003	0,015 ± 0,004
2	0,241 ± 0,003	-0,79 ± 0,03	0,003 ± 0,002	0,2 ± 0,4	0,03 ± 0,03	0,009 ± 0,001	0,07 ± 0,13
3	0,23 ± 0,02	-0,80 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,1 ± 0,4	0,1 ± 0,1	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,04
4	0,24 ± 0,03	-0,80 ± 0,01	0,0007 ± 0,0001	0,1 ± 0,4	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,05	0,017 ± 0,004
5	0,23 ± 0,02	-0,80 ± 0,02	0,002 ± 0,001	0,09 ± 0,01	0,015 ± 0,003	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,04
6	0,23 ± 0,01	-0,80 ± 0,02	0,001 ± 0,002	0,06 ± 0,06	0,02 ± 0,04	0,00 ± 0,01	0,01 ± 0,01
7	0,25 ± 0,03	-0,77 ± 0,01	0,001 ± 0,002	0,18 ± 0,06	0,03 ± 0,04	0,00 ± 0,01	0,01 ± 0,01
8	0,23 ± 0,02	-0,8 ± 0,1	0,001 ± 0,001	0,1 ± 0,3	0,04 ± 0,04	0,003 ± 0,003	0,02 ± 0,04
10	0,255 ± 0,005	-0,8 ± 0,1	0,003 ± 0,004	0,2 ± 0,1	0,04 ± 0,05	0,02 ± 0,05	0,07 ± 0,08
11	0,23 ± 0,02	-0,80 ± 0,02	0,002 ± 0,001	0,04 ± 0,08	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,03
12	0,24 ± 0,07	-0,80 ± 0,03	0,002 ± 0,005	0,09 ± 0,04	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,02	0,02 ± 0,03
13	0,231 ± 0,003	-0,80 ± 0,03	0,002 ± 0,001	0,10 ± 0,09	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,02	0,03 ± 0,07
14	0,228 ± 0,004	-0,80 ± 0,02	0,00 ± 0,01	0,10 ± 0,04	0,02 ± 0,05	0,006 ± 0,002	0,02 ± 0,03
15	0,232 ± 0,005	-0,8 ± 0,1	0,001 ± 0,002	0,1 ± 0,2	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,02
16	0,235 ± 0,005	-0,76 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,13 ± 0,05	0,03 ± 0,01	0,00 ± 0,01	0,03 ± 0,02
18	0,23 ± 0,01	-0,81 ± 0,01	0,002 ± 0,001	0,0 ± 0,1	0,02 ± 0,02	0,02 ± 0,06	0,05 ± 0,06
19	0,23 ± 0,05	-0,79 ± 0,09	0,001 ± 0,001	0,06 ± 0,08	0,1 ± 0,1	0,03 ± 0,06	0,0 ± 0,1
20	0,23 ± 0,01	-0,81 ± 0,01	0,004 ± 0,004	0,04 ± 0,09	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,04	0,1 ± 0,1
22	0,23 ± 0,01	-0,81 ± 0,01	0,00 ± 0,01	0,09 ± 0,09	0,010 ± 0,003	0,0116 ± 0,0002	0,007 ± 0,002
23	0,224 ± 0,004	-0,80 ± 0,01	0,0016 ± 0,0003	0,1 ± 0,2	0,02 ± 0,06	0,02 ± 0,05	0,02 ± 0,04
24	0,22 ± 0,01	-0,79 ± 0,05	0,0010 ± 0,0002	0,1 ± 0,2	0,03 ± 0,03	0,01 ± 0,02	0,04 ± 0,08
26	0,24 ± 0,07	-0,80 ± 0,05	0,003 ± 0,001	0,1 ± 0,3	0,06 ± 0,09	0,02 ± 0,01	0,0 ± 0,1
27	0,24 ± 0,02	-0,80 ± 0,02	0,003 ± 0,004	0,1 ± 0,1	0,04 ± 0,05	0,02 ± 0,02	0,08 ± 0,03
28	0,233 ± 0,001	-0,80 ± 0,04	0,002 ± 0,003	0,1 ± 0,3	0,04 ± 0,05	0,03 ± 0,06	0,1 ± 0,1
29	0,3 ± 0,1	-0,79 ± 0,06	0,002 ± 0,001	0,1 ± 0,1	0,02 ± 0,03	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,02
30	0,24 ± 0,03	-0,79 ± 0,04	0,0016 ± 0,0001	0,11 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,00362 ± 0,00003	0,01 ± 0,01
31	0,2338 ± 0,0003	-0,8 ± 0,1	0,01 ± 0,01	0,120 ± 0,272	0,02 ± 0,05	0,007 ± 0,001	0,01 ± 0,02

Os compostos acenaftileno, benzo[a]antraceno e criseno apresentam resultados negativos para a concentração. Isso ocorre do fato de estarem abaixo do limite de detecção do método (MDL) e por serem calculados por uma extrapolação da curva de calibração, pois a mesma se inicia no limite de quantificação (LOQ). Não existe concentração negativa. Para vários resultados, a incerteza é maior que o resultado. Isso também ocorre porque não há detecção e o resultado não apresenta diferença estatística significativa do branco da análise, o que faz o resultado flutuar próximo ao "zero" da curva de calibração, podendo assumir valores negativos, quando se observa a dispersão do resultado pela incerteza.

Tabela B.2 (Continuação): Resultados das análises das amostras coletadas em Agosto de 2015. Valores acompanhados de sua respectiva incerteza expandida (k=2), em unidades de ng/g.

<i>Bacia</i>	<i>Fluoranteno</i>	<i>Pireno</i>	<i>Benzo[a]antraceno</i>	<i>Criseno</i>	<i>Benzo[b]fluoranteno</i>	<i>Benzo[a]pireno</i>
1	0,0069 ± 0,0005	0,004 ± 0,003	-0,34 ± 0,01	-0,20 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,03 ± 0,05
2	0,01 ± 0,02	0,009 ± 0,004	-0,34 ± 0,03	-0,19 ± 0,04	0,13 ± 0,08	0,05 ± 0,03
3	0,01 ± 0,03	0,00 ± 0,01	-0,2 ± 0,7	-0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,5
4	0,003 ± 0,001	0,00 ± 0,01	-0,35 ± 0,04	-0,22 ± 0,06	0,12 ± 0,09	0,03 ± 0,02
5	0,01 ± 0,01	0,007 ± 0,005	-0,36 ± 0,02	-0,2 ± 0,1	0,10 ± 0,04	0,04 ± 0,05
6	0,008 ± 0,003	0,01 ± 0,01	-0,36 ± 0,01	-0,17 ± 0,07	0,1 ± 0,1	0,04 ± 0,07
7	0,008 ± 0,003	0,01 ± 0,01	-0,36 ± 0,01	-0,17 ± 0,07	0,1 ± 0,1	0,04 ± 0,07
8	0,02 ± 0,04	0,01 ± 0,01	-0,36 ± 0,04	-0,19 ± 0,03	0,2 ± 0,3	0,03 ± 0,03
10	0,005 ± 0,008	0,005 ± 0,006	-0,33 ± 0,02	-0,11 ± 0,02	0,03 ± 0,05	0,04 ± 0,05
11	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	-0,2 ± 0,3	-0,22 ± 0,02	0,1 ± 0,2	0,030 ± 0,001
12	0,01 ± 0,02	0,003 ± 0,004	-0,35 ± 0,04	-0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,2	0,06 ± 0,01
13	0,01 ± 0,02	0,00 ± 0,01	-0,36 ± 0,01	-0,19 ± 0,01	0,038 ± 0,008	0,01 ± 0,02
14	0,01 ± 0,01	0,006 ± 0,005	-0,353 ± 0,002	-0,1 ± 0,2	0,10 ± 0,08	0,04 ± 0,01
15	0,006 ± 0,007	0,004 ± 0,004	-0,36 ± 0,01	-0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,03 ± 0,02
16	0,01 ± 0,02	0,00 ± 0,01	-0,34 ± 0,06	-0,13 ± 0,08	0,19 ± 0,03	0,06 ± 0,09
18	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	-0,36 ± 0,01	-0,19 ± 0,02	0,2 ± 0,2	0,09 ± 0,01
19	0,004 ± 0,003	0,01 ± 0,01	-0,365 ± 0,003	-0,21 ± 0,02	0,04 ± 0,08	0,04 ± 0,02
20	0,011 ± 0,004	0,01 ± 0,02	-0,357 ± 0,001	-0,20 ± 0,03	0,107 ± 0,004	0,06 ± 0,01
22	0,021 ± 0,003	0,01 ± 0,01	-0,36 ± 0,02	-0,16 ± 0,05	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,2
23	0,02 ± 0,04	0,02 ± 0,04	-0,36 ± 0,04	-0,2 ± 0,2	0,10 ± 0,08	0,07 ± 0,05
24	0,0050 ± 0,0004	0,004 ± 0,001	-0,36 ± 0,03	-0,21 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,03 ± 0,03
26	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,06	-0,37 ± 0,01	-0,21 ± 0,03	0,2 ± 0,4	0,1 ± 0,2
27	0,01 ± 0,01	0,004 ± 0,002	-0,361 ± 0,003	-0,19 ± 0,01	0,04 ± 0,08	0,04 ± 0,01
28	0,01 ± 0,01	0,002 ± 0,002	-0,35 ± 0,03	-0,21 ± 0,07	0,1 ± 0,2	0,031 ± 0,007
29	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	-0,3 ± 0,2	-0,19 ± 0,08	0,2 ± 0,1	0,04 ± 0,01
30	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,02	-0,359 ± 0,002	-0,1 ± 0,2	0,2 ± 0,4	0,0434 ± 0,0003
31	0,01 ± 0,02	0,00 ± 0,01	-0,3 ± 0,2	-0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,3	0,05 ± 0,07

Os compostos acenaftileno, benzo[a]antraceno e criseno apresentam resultados negativos para a concentração. Isso ocorre do fato de estarem abaixo do limite de detecção do método (MDL) e por serem calculados por uma extrapolação da curva de calibração, pois a mesma se inicia no limite de quantificação (LOQ). Não existe concentração negativa. Para vários resultados, a incerteza é maior que o resultado. Isso também ocorre porque não há detecção e o resultado não apresenta diferença estatística significativa do branco da análise, o que faz o resultado flutuar próximo ao "zero" da curva de calibração, podendo assumir valores negativos, quando se observa a dispersão do resultado pela incerteza.

Apêndice 3 - Manual da Qualidade

Research in Quality Assurance for Laboratories

Instituto de Química de São Carlos (IQSC)

Universidade de São Paulo (USP)

POP-RQA-001

Procedimento Operacional Padrão

Manual da Qualidade

Data Efetiva

06/01/2015

1. Propósito

- 1.1. O Manual da Qualidade descreve a política, responsabilidades e meios adotados pelo RQA Lab para garantir a Qualidade nos experimentos realizados. Esse documento traz o suporte documental dos procedimentos do Sistema de Gestão do laboratório.

2. Escopo

- 2.1. Aplica-se a todos alunos de graduação e pós graduação, técnicos e professores que se utilizam das instalações do RQA lab.

3. Responsabilidades

- 3.1. Para cada projeto de pesquisa ou desenvolvimento iniciado no RQA Lab:

3.1.1. O orientador ficará responsável pela supervisão da garantia da qualidade, ou seja, garantir que todos os procedimentos operacionais padrão (POPS) são seguidos;

3.1.2. O aluno que executa o projeto ficará responsável pela garantia da qualidade de seu projeto, seguindo os POPs do laboratório;

3.1.2.1. Alunos de iniciação científica (graduação) podem ter sua garantia da qualidade embutida em projeto de mestrado ou doutorado;

3.1.3. Técnicos de laboratório são responsáveis pela garantia da qualidade em suas atividades de suporte aos projetos e também assumem a função de supervisão de garantia da qualidade nos projetos.

4. Política da Qualidade

4.1. O RQA Lab tem como política da qualidade, prover rastreabilidade metrológica e da informação sobre seus resultados científicos;

4.2. O RQA Lab também mantém um comprometimento com a melhoria contínua, sempre aperfeiçoando o sistema de gestão da qualidade do laboratório.

5. Lista Mestra dos documentos do Sistema de Gestão da Qualidade

Código	Revisão	Nome
POP-RQA-001	01	Manual da Qualidade
POP-RQA-002	01	Controle de Documentos e Registros
POP-RQA-003	01	Cafeteira Dolce Gusto
POP-RQA-004	01	Verificação de Equipamentos
POP-RQA-005	01	Validação do Método
POP-RQA-006	01	Cálculo de Incerteza
POP-RQA-007	01	Controle de Qualidade Intralaboratorial
POP-RQA-008	01	Confecção de Barra Sortiva
POP-RQA-009	01	Extração RSE
POP-RQA-010	01	Solução Padrão
POP-RQA-011	01	Amostragem

6. Responsáveis

Ricardo dos Santos Camargo
Elaborador e Revisor

Igor Renato Bertoni Olivares
Aprovação

Revisão
001

Página 1 de 1

Apêndice 4 Procedimento de Controle de Documentos e Registros

Research in Quality Assurance for Laboratories Instituto de Química de São Carlos (IQSC) Universidade de São Paulo (USP)
POP-RQA-002	Procedimento Operacional Padrão Controle de Documentos e Registros	Data Efetiva 06/01/2015

1. Propósito

- 1.1. Este documento cumpre padronizar a codificação e a formatação de todos os documentos e registros, além da distribuição e do armazenamento dos mesmos

2. Escopo

- 2.1. Aplica-se a todos alunos de graduação e pós graduação, técnicos e professores que se utilizam das instalações do RQA lab.

3. Responsabilidades

- 3.1. A elaboração de um Procedimento Operacional Padrão (POP) é responsabilidade de qualquer indivíduo que se utilize do RQA Lab (alunos de graduação, pós-graduação, técnicos e professores).
 - 3.1.1. O elaborador deve ser identificado no POP.
- 3.2. A análise crítica do POP fica a cargo de um aluno de pós-graduação designado para tal tarefa, denominado Revisor;
 - 3.2.1. O revisor deve ser identificado no POP;
- 3.3. A aprovação do texto final do POP fica a cargo de um professor designado para tal fim.
 - 3.3.1. O responsável pela aprovação deve ser identificado no POP.

4. Formatação

- 4.1. A formatação dos procedimentos operacionais padrão e registros deverá seguir a formatação deste documento.

5. Codificação

- 5.1. O código do POP se iniciará com a sigla “POP” seguida de um traço “-”, seguida da sigla “RQA”, traço “-” e o número com três dígitos correspondentes, seguido de ponto.
 - 5.1.1. A numeração do POP seguirá a ordem de criação do mesmo.
 - 5.1.2. O arquivo digital do POP deverá ser nomeado da mesma forma como no item 5.1, acrescido do número da revisão, com dois dígitos, seguido de underline “_” e o nome do procedimento. Exemplo: “POP-RQA-002.01_Controle de Documentos e Registros”.

6. Revisão

- 6.1. O POP deve ser revisado sempre quando se observar que as informações que nele contenham precisam ser alteradas para o bom funcionamento do laboratório.
 - 6.1.1. As alterações precisam ser encaminhadas ao elaborador do POP, que enviará ao revisor e depois ao responsável pela aprovação.
 - 6.1.2. Estes documentos terão sua edição bloqueada, sendo esta função acessível apenas ao(s) responsável(eis) designado(s) para a revisão e edição dos mesmos.
 - 6.1.3. O número da revisão deve figurar no rodapé do documento.
- 6.2. Após a revisão, é necessário treinar o pessoal envolvido.
- 6.3. Após a revisão é necessário tirar de circulação todos os documentos impressos da revisão anterior.

7. Armazenamento

Revisão 001	Página 1 de 2
-----------------------	----------------------

- 7.1. Os POPs aprovados e de última revisão devem ser armazenados em mídia digital, em uma pasta chamada “RQA Lab” e subpastas “POPs”, “Em Uso” do Explorer do Windows (RQA Lab\POPs\Em Uso).
- 7.2. Os POPs aprovados e que já sofreram alterações por revisão, devem ser movidos da subpasta “Em Uso” para a subpasta “Antigos” (RQA Lab\POPs\Antigos).
 - 7.2.1. Cópias impressas de POPs que já foram revisados serão descartados.

8. Armazenamento

- 8.1. Os POPs aprovados e de última revisão devem ser armazenados em mídia digital, em uma pasta chamada “RQA Lab” e subpastas “POPs”, “Em Uso” do Explorer do Windows (RQA Lab\POPs\Em Uso).
- 8.2. Os POPs aprovados e que já sofreram alterações por revisão, devem ser movidos da subpasta “Em Uso” para a subpasta “Antigos” (RQA Lab\POPs\Antigos).
 - 8.2.1. Cópias impressas de POPs que já foram revisados serão descartados.

9. Distribuição

- 9.1. Os POPs em uso devem ser impressos e distribuído no laboratório próximos do locais e equipamentos onde forem necessários.

10. Alterações manuscritas

- 10.1. É permitida a alteração manuscrita de POP que necessita de revisão para atender o bom funcionamento do laboratório.
 - 10.1.1. É de responsabilidade de quem fez a alteração, rubricar a alteração manuscrita e encaminhar o POP para revisão, cumprindo o item 6.1.1.

11. Todos os registros de observações em experimentos e análises devem ser feitos no Caderno de Laboratório fornecido pela Seção de Pós-graduação.

- 11.1. Alunos de graduação devem ter um caderno de laboratório.

12. Responsáveis

Ricardo dos Santos Camargo
Elaborador e Revisor

Igor Renato Bertoni Olivares
Aprovação

Apêndice 5 Cafeteira Dolce Gusto

Research in Quality Assurance for Laboratories Instituto de Química de São Carlos (IQSC) Universidade de São Paulo (USP)
POP-RQA-003	Procedimento Operacional Padrão Cafeteira Dolce Gusto	Data Efetiva 06/01/2015

1. Propósito

Definir a sistemática de uso deste importante equipamento que influencia diretamente os resultados das pesquisas no laboratório, evitando stress e gastos desnecessários por parte de DESTRUIDORES.

2. Escopo

Aplica-se a todos que por ventura se aventurarem no processo de absorção de cafeína.

3. Procedimento

3.1. Antes de qualquer procedimento, VERIFIQUE SE HÁ ÁGUA SUFICIENTE NO RESERVATÓRIO (no mínimo o dobro da quantidade necessária para produzir a bebida). A cafeteira JAMAIS deve operar sem água.

3.1.1. A resistência que aquece a água irá queimar e VOCÊ IRÁ COMPRAR OUTRA CAFETEIRA (DÊ SEUS PULOS!), além de tomar um belíssimo de um “aluguel” do VIGOR (entidade que congrega os professores VI-tor e I-GOR) e do Christiano (não queira conhecer esse sujeito em uma situação como essa!).

3.2. DEPOIS DE VERIFICADA A EXISTÊNCIA DE QUANTIDADE SUFICIENTE DE ÁGUA NO RESERVATÓRIO, ligue a cafeteira pressionando o botão liga/desliga, localizado à esquerda, no corpo da cafeteira.

3.3. Aguarde a luz passar de vermelha para verde.

3.4. Retire o suporte da capsula de café, inserindo o dedo indicador no orifício que fica na haste cromada e puxando o mesmo para trás. Nota: antes de retirar o suporte da capsula, A ALAVANCA CROMADA, que fica na porção superior da cafeteira, DEVE ESTAR LEVANTADA.

3.5. Inserir a capsula de café no suporte. Tome o cuidado de posicionar a capsula de forma correta, encaixando-a completamente.

3.6. Recolocar o suporte, já com a capsula, na cafeteira. ABAIXAR A ALAVANCA CROMADA.

3.6.1. Quando a alavanca é baixada, uma agulha fura a parte superior da capsula, fazendo um barulho característico. É através desse orifício que a água quente é injetada no conteúdo da capsula.

3.7. Inserir uma CANECA na porção abaixo do suporte da capsula.

3.8. Dependendo de qual for o tipo de bebida, água fria ou quente pode ser empregada. Atrás da alavanca cromada, existe uma chave (também cromada) que está posicionada ao centro. Do lado esquerdo existe uma marcação com coloração azul (simbolizando água fria) e do lado direito, uma marcação vermelha (simbolizando água quente). Mover a chave para um dos lados, escolhendo água fria ou quente. A bebida começará verter. Pare o fluxo de acordo com a quantidade determinada na caixa da bebida escolhida. Para parar o fluxo de água, movimentar a chave novamente para o centro.

3.9. Aguardar 5 segundos e LEVANTAR A ALAVANCA CROMADA.

3.9.1. A agulha que fura a capsula fica inserida na mesma durante o tempo de preparo da bebida. Se o suporte for retirado sem que a alavanca seja levantada, a agulha será danificada e a manutenção corretiva fica a cargo do DESTRUIDOR. O “aluguel” é item obrigatório nesse caso.

3.10. Retire o suporte da seguinte maneira: com a mão direita, retire o suporte e com a mão esquerda, retire a caneca, acompanhando o movimento do suporte até o descarte de capsulas, que fica do lado esquerdo da cafeteira. Descarte a capsula e recolque o suporte de capsulas em seu devido lugar.

3.10.1. A capsula continua pingando após 5 segundos e por isso acompanhar o movimento do suporte com a caneca é necessário para evitar sujar a mesa. Se você for canhoto, inverta as mãos no procedimento (“Não seja burro Kiko!!!!”)

4. Responsáveis

Ricardo dos Santos Camargo
Elaborador e Revisor

Vitor Hugo Polisel Paces
Aprovação

Apêndice 6 Procedimento de Verificação de Equipamentos

Research in Quality Assurance for Laboratories Instituto de Química de São Carlos (IQSC) Universidade de São Paulo (USP)
POP-RQA-004	Procedimento Operacional Padrão Verificação de Equipamentos	Data Efetiva 06/01/2015	

1. Propósito

Definir a sistemática para verificar os equipamentos de medição de massa e volume para conhecer e controlar a deriva dos mesmos.

2. Escopo

Aplica-se aos equipamentos: balança analítica e micropipetas. O analista deve realizar a verificação com uma periodicidade definida para cada equipamento, ou quando, ocorrerem quedas ou choque de materiais pesados contra o equipamento, pois isso pode, na maioria das vezes, resultar em desvios.

3. Procedimento

3.1. Balança analítica

3.1.1. Equipamentos:

3.1.1.1. Peso padrão de 1 g;

3.1.1.2. Pinça;

3.1.1.3. Luvas;

3.1.2. Ajustar a temperatura do ambiente para 20°C;

3.1.3. Antes do procedimento, deixar a balança com as portinholas abertas por no mínimo 1 hora;

3.1.4. O valor de massa do peso (M) deve ser o do certificado de calibração do peso-padrão e não o valor nominal;

3.1.5. O peso-padrão será o de 1 g (valor nominal), definido pela disponibilidade;

3.1.6. Usar luvas e pinça para manusear o peso padrão;

3.1.7. Existem três procedimentos para balanças: “teste de repetibilidade” e “teste de erro de indicação” e “teste de excentricidade”.

3.1.8. Teste de Repetibilidade

3.1.9. Tarar a balança e registrar a leitura no ponto zero (z1);

3.1.10. Posicionar o peso (M) na balança e registrar a leitura da indicação da balança (m1);

3.1.11. Retirar o peso da balança e registrar a leitura da indicação da balança (z2).

3.1.12. Sem tarar a balança, posicionar o mesmo peso na balança e registrar a leitura da indicação (m2);

3.1.13. Retirar o peso da balança e registrar a leitura (z3).

3.1.14. Repetir os passos 3.1.10 e 3.1.11 até que sejam obtidas 10 leituras.

3.1.15. Calcular a diferença (r_i) entre cada leitura de pesagem e a leitura do zero correspondente (Equação 01).

3.1.16. Calcular a média das diferenças (R);

3.1.17. Calcular o desvio padrão ($s_{usuário}$) das diferenças $r_1, r_2, \dots, r_n$, utilizando a Equação 02.

$$r_i = m_i - z_i \quad \text{Equação 01}$$

$$s_{usuário} = \sqrt{\frac{\sum (r_i - R)^2}{n - 1}} \quad \text{Equação 02}$$

3.1.18. Teste de erro de indicação

3.1.19. Todos os dados gerados no teste de repetibilidade podem ser reutilizados nesse teste;

3.1.20. Calcular a média das diferenças (R);

3.1.21. Calcular o erro de indicação pela equação 03;

$$E = (R - M)$$

Equação 03

3.1.22. Teste de excentricidade

Figura 01: posições do peso padrão para o teste de excentricidade.

3.1.23. Tarar a balança;

3.1.24. Segundo a Figura 01, colocar o peso (M) na posição 1 e anotar a indicação (m1);

3.1.25. Retirar o peso e anotar a indicação sem o peso (z1);

3.1.26. Mudar o peso (M) para as outras posições aleatoriamente e anotar cada indicação (mi);

3.1.27. Após retirar o peso para mudar de posição, anotar a indicação sem o peso (zi);

3.1.28. Voltar para a posição 1 e anotar novamente a indicação (m1');

3.1.29. Retirar o peso e anotar z1';

3.1.30. O erro do teste de excentricidade é calculado para cada posição pela equação 04;

$$E_{exc(i)} = (m_i - z_i) - M$$

Equação 04

3.1.31. Estimativa da incerteza da verificação

3.1.32. Utilizar a equação 05 para calcular a incerteza padrão combinada da verificação.

$$u_{ver}^2 = \frac{d^2}{6} + s_{usuário}^2 + \left(\frac{E_{exc(max)}}{2M\sqrt{3}} \right)^2 \times m_{i(max)}^2 + u_M^2$$

Equação 05

3.1.33. Sendo d, a resolução da balança; $E_{exc(max)}$, o maior erro para o teste de excentricidade; $m_{i(max)}$, a indicação da balança que proveu o maior erro no teste de excentricidade e u_M , a incerteza do peso padrão (incerteza expandida do certificado dividida por k).

3.1.34. A incerteza expandida da verificação é calculada pela equação 06, com $k=2$.

$$U_{ver} = u_{ver} \times k$$

Equação 06

1.1. Micropipetas

1.1.1. Equipamentos

- 1.1.1.1. Balança analítica;
- 1.1.1.2. Vial com tampa;
- 1.1.1.3. Béquer com água destilada;
- 1.1.1.4. Termômetro;
- 1.1.1.5. Erlenmeyer com água;
- 1.1.1.6. Luvas;

1.1.2. Se as micropipetas são desmontadas periodicamente para limpeza, desmontar e montar previamente ao teste;

1.1.3. A sala de teste não deve ter corrente de ar e a temperatura deve ser de 20°C com variação de 0,5°C, aferida com termômetro no erlenmeyer com água;

1.1.4. Micropipeta e água destilada, que será utilizada, devem ficar na sala 2 horas antes do início da verificação para alcançar temperatura ambiente;

1.1.5. Antes do procedimento, deixar a balança com as portinholas abertas por no mínimo 1 hora;

1.1.6. Serão testados apenas os valores nominais de cada micropipeta (para a micropipeta de 10 µL, serão necessárias 10 pipetadas para acumular um volume próximo de 100 µL para ser aferido na balança analítica, dispensando assim a necessidade de balanças microanalíticas);

1.1.7. Procedimento

1.1.8. Colocar água destilada no vial de pesagem a uma profundidade de no mínimo 3mm;

1.1.9. Colocar a tampa no vial;

1.1.10. Registrar a temperatura da água de teste, pressão atmosférica e umidade relativa da sala;

1.1.11. Selecionar o volume nominal da pipeta;

1.1.12. Colocar uma ponteira e lavar a mesma por 5 vezes na água de teste, dispensando cada pipetada num resíduo;

1.1.13. Descartar a ponteira e colocar outra;

1.1.14. Colocar o vial de pesagem na balança e tarar;

1.1.15. Inserir a ponteira no líquido de teste a uma profundidade de 2 a 3 mm da superfície, aspirar o líquido vagarosamente, com a pipeta na vertical. Tocar a ponta da ponteira na parede do frasco, para retirar qualquer gota;

1.1.16. Descartar o líquido (pré-lavagem da ponteira);

1.1.17. Usando luvas, retirar o vial da balança;

1.1.18. Retirar a tampa do vial;

1.1.19. Repetir o item 3.2.15;

1.1.20. Transferir líquido, colocando a ponteira a 45° e tocando a parede do vial com a ponteira;

1.1.21. Após transferir, passar a ponta da ponteira na parede interna do vial de pesagem para retirar qualquer gota remanescente;

1.1.22. Anotar a medida m_1 ;

- 1.1.23. Trocar a ponteira;
- 1.1.24. Repetir os itens de 3.2.15 a 3.2.24 até que 10 medidas tenham sido realizadas;
- 1.1.25. Após o término das 10 medidas, anotar a temperatura da água de teste remanescente;
- 1.1.26. Cálculos
- 1.1.27. Para converter a massa aferida para volume utiliza-se a equação 07. Fator de conversão Z é encontrado na ISO 8655-6;

$$V_i = m_i \times Z \quad \text{Equação 07}$$

- 1.1.28. Calcular o volume médio (para a micropipeta de 10 µL, fazer a média e depois dividir por 10);
- 1.1.29. O erro sistemático pode ser obtido pela equação 08, sendo $\bar{V}$, o volume médio e V_s , o volume selecionado;

$$e_s = \bar{V} - V_s \quad \text{Equação 08}$$

- 1.1.30. O erro aleatório é conhecido pelo desvio padrão dos resultados (Equação 09). Para a micropipeta de 10 µL, dividir o desvio padrão por 10;

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum (V_i - \bar{V})^2}{n - 1}} \quad \text{Equação 09}$$

- 1.1.31. Pode-se calcular o coeficiente de variação pela Equação 10;

$$CV = 100 \times \frac{s_r}{\bar{V}} \quad \text{Equação 10}$$

- 1.1.32. Incerteza da verificação pode ser calculada pela Equação 11;

$$u_{ver} = |e_s| + 2s_r \quad \text{Equação 11}$$

- 1.1.33. A incerteza expandida da verificação é calculada pela Equação 12, com $k=2$.

$$U_{ver} = u_{ver} \times k \quad \text{Equação 12}$$

2. Responsáveis

Ricardo dos Santos Camargo
Elaborador e Revisor

Igor Renato Bertoni Olivares
Aprovação

Apêndice 7 Procedimento de Validação do Método

Research in Quality Assurance for Laboratories Instituto de Química de São Carlos (IQSC) Universidade de São Paulo (USP)
POP-RQA-005	Procedimento Operacional Padrão		Data Efetiva	
	Validação de Método		06/01/2015	

1. Propósito

Definir a sistemática para validação dos dados gerados por análise de matrizes aquosas, com a técnica de RSE/GC em laboratórios de pesquisa avaliando quantitativamente a Precisão intra-dias (Repetibilidade), Precisão Intermediária, Veracidade e Exatidão dos dados analíticos obtidos, estabelecendo para o método, Limites de Detecção e de Quantificação e avaliação da Linearidade da Curva de Calibração.

2. Escopo

Aplica-se aos analistas que se utilizem da técnica de RSE/GC para análise quantitativa de hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs), BTEX e alquilfenóis em matrizes aquosas (água bruta superficial), com o uso de dessorção térmica e detector de ionização em chama.

3. Procedimento

3.1. Seletividade

3.1.1. Construir o método cromatográfico objetivando a completa separação dos compostos;

3.1.2. Realizar análises em triplicata de branco de matriz e de branco de matriz fortificado. Se os tempos de retenção para os compostos apresentarem coeluição, considerar um limite de 30% da área do pico.

3.2. Robustez

3.2.1. Utiliza-se um planejamento Plackett-Burman para 7 fatores conforme descrito na Tabela 1;

Tabela 1: Planejamento Plackett-Burman para 7 fatores

Experimento	Fatores							Resposta
	1	2	3	4	5	6	7	
1	1	1	1	-1	1	-1	-1	S
2	-1	1	1	1	-1	1	-1	T
3	-1	-1	1	1	1	-1	1	U
4	1	-1	-1	1	1	1	-1	V
5	-1	1	-1	-1	1	1	1	W
6	1	-1	1	-1	-1	1	1	X
7	1	1	-1	1	-1	-1	1	Y
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	Z

3.2.2. Os níveis escolhidos serão variações simétricas em torno do valor nominal, positiva e negativa. O valor nominal é o “0”, ou ponto central e a variação negativa é denotada por “-1” e a positiva “1”.

3.2.3. Calcula-se os efeitos de cada fator;

3.2.4. O valor do efeito crítico, E_{critico} , é calculado tomando o desvio padrão da precisão intermediária e multiplicando pelo valor do t de student para n-1 graus de liberdade utilizados no cálculo do desvio padrão da precisão intermediária.

3.2.5. Para estimar então um intervalo em que a variação não seja significativa, utiliza-se a Equação 1.

$$\left[X_{(0)} - \frac{|X_{(1)} - X_{(-1)}| E_{\text{critico}}}{2E_x}, X_{(0)} + \frac{|X_{(1)} - X_{(-1)}| E_{\text{critico}}}{2E_x} \right] \quad \text{Equação 0}$$

3.2.6. $X_{(0)}$: valor do ponto central do fator X;

3.2.7. $X_{(1)}$: valor da variação positiva do fator X;

3.2.8. $X_{(-1)}$: valor da variação negativa do fator X;

3.2.9. E_{critico} : valor crítico dos efeitos;

3.2.10. E_x : valor do efeito do fator X.

3.3. Construção da curva de calibração e avaliação da linearidade

3.3.1. Aquisição dos dados

3.3.1.1. Primeiramente obter 7 pontos (par x,y ou concentração, área do pico) para cada composto, em triplicata;

3.3.1.2.

3.3.1.3. Para construção da curva de calibração, faz-se a regressão linear dos 5 pontos consecutivos, que apresentarem a melhor linearidade (avaliado pelo R^2), entre os 7 pontos;

3.3.1.4.

3.3.1.5. Acha-se a equação da reta que correlaciona a área medida no cromatograma e a concentração do composto a ser analisado. A equação encontrada para a curva de calibração deve utilizar a mesma quantidade de algarismos significativos que os valores usados para sua construção;

3.3.1.6.

3.3.1.7. O primeiro ponto da curva de calibração é o ponto imediatamente acima do limite de quantificação do método;

3.3.1.8.

3.3.1.9. Os extremos da curva de calibração devem diferir entre si no máximo 1 (uma) ordem de grandeza.

3.3.2. Tratamento dos dados

- 3.3.2.1. Os cinco pontos consecutivos (feitos em triplicata, totalizando 15 resultados) que apresentaram a melhor linearidade são avaliados pela função “Curva de Calibração” do software Action®;
- 3.3.2.2. Deve-se avaliar a existência de *outliers* através do teste de Bonferroni. O diagnóstico de Pontos Influentes (DFFITS, DFBETAS e Distância de Cook) também deve ser observado, antes de excluir o *outlier*. Se os testes indicarem a existência de *outlier*, excluir o resultado e proceder novamente a análise dos 14 resultados restantes pela função do Action®. Caso contrário, prosseguir conforme o próximo item.
- 3.3.2.3. Nota: Deve ser excluído um único resultado. Se na segunda análise pelo Action® os testes indicarem a presença de um novo *outlier*, avaliar com muita prudência a necessidade de excluí-lo. Se mais *outliers* forem detectados, fazer uma análise crítica da metodologia, pois erros grosseiros podem estar ocorrendo.
- 3.3.2.4. Os pontos que compõe a curva de calibração devem ser avaliados como homo ou heterocedásticos pelos testes de Cochran, Breusch-Pagan, Goldfeld-Quandt e Brown-Forsythe. Adotar a indicação da maioria dos testes. Caso houver empate, desconsidere o resultado do teste de Brown-Forsythe (teste muito robusto com necessidade de muitas replicatas para um resultado confiável). Caso os testes revelem valores homocedásticos, pode-se prosseguir para o próximo item, caso o teste revele valores heterocedásticos, uma análise crítica das medidas envolvidas deve ser feita, geralmente aplicando-se a regressão linear ponderada.
- 3.3.2.5. Nota 1: Com a função “Curva de Calibração” também é possível fazer a regressão ponderada, utilizando-se de pesos (inversamente proporcionais à variância dos pontos) para a correção.
- 3.3.2.6. Nota 2: Aplicada a regressão ponderada, é necessário retornar ao início dos tratamentos de dados (verificação de *outliers* e Pontos Influentes).
- 3.3.2.7. Nota 3: Após a aplicação da regressão ponderada, os testes de verificação de homo ou heterocedasticidade devem indicar a HOMOCEDASTICIDADE dos resíduos, pois a utilização dos pesos corrige a heterocedasticidade.
- 3.3.2.8. Nota 4: se não houver indicação de homocedasticidade, alterar o modo de cálculo dos pesos (inicialmente utiliza-se como $w_i = 1/s^2$, mas existem outras formas de calcular).
- 3.3.2.9. Após obtenção da reta ajustada, aplicam-se os testes de qualidade do ajuste: Análise de Resíduos, ANOVA e o teste da Falta de Ajuste. Se o teste da falta de ajuste indicar que o modelo linear não é o mais indicado, observar o gráfico de resíduos vs valores ajustados pois esse gráfico mostra a tendência de desvios dos resíduos e consequentemente o modelo que melhor se ajusta aos dados.
- 3.3.2.10. Nota: Testar modelos polinomiais primeiramente, exponenciais em segundo lugar e outros se necessário. Após mudar o modelo, deve-se iniciar todo o tratamento de dados novamente (*outliers*, homocedasticidade e qualidade do ajuste do modelo).

3.4. Avaliação da Precisão

3.4.1. Aquisição dos dados

- 3.4.1.1. No primeiro ponto da curva de calibração (definido como o ponto de concentração baixa) e no último ponto da curva (ponto de concentração alta), deve-se fazer 6 replicatas cada.

3.4.2. Tratamento dos dados

- 3.4.2.1. Avaliar o desvio padrão relativo (ou coeficiente de variação, CV) para os valores das concentrações alta e baixa. O CV deve ser menor do que 20% (segundo EPA e APHA) e caso seja maior, a condição de precisão não é alcançada e uma análise crítica do método é necessária;
- 3.4.2.2. A aquisição de dados deve ser feita sob condições de repetibilidade (intra-dias) e precisão intermediária (inter-dias). Na Precisão Intermediária, é recomendado que se respeite o limite máximo de 7 dias consecutivos para a aquisição dos dados, sob as mesmas condições ambientais.

3.5. Veracidade e exatidão**3.5.1. Aquisição dos dados**

- 3.5.1.1. Deve-se medir 6 replicatas para o branco da matriz e 6 replicatas do valor de referência para as concentrações alta e baixa;
- 3.5.1.2. Nota: Como na etapa de extração se utiliza da dessorção térmica, o valor de referência precisa ser feito em função da massa dos compostos, pois não haverá uma etapa de concentração em solvente (dessorção líquida dos compostos). Dessa forma, é necessário injetar 1 uL de uma solução, na qual nesse volume (1 uL), esteja a massa correspondente à concentração do branco fortificado.
- 3.5.1.3. Calcula-se então a média C₁ dos valores de área das replicatas para a matriz fortificada, a média C₂ dos valores de área para o branco da matriz e a média C₃ para os valores de área para a injeção da massa dos compostos, que será utilizada como valor de referência.

3.5.2. Tratamento dos dados

- 3.5.2.1. O valor de veracidade será estimado com base na Recuperação, então deve-se usar a diferença de C₁ e C₂ dividida por C₃, que é o valor de referência da concentração de fortificação;

$$\text{Recuperação} = \frac{(C_1 - C_2)}{C_3} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

- 3.5.2.2. A Exatidão será calculada com valores absolutos, e não com as médias das áreas C₁, C₂ e C₃.

- 3.5.2.3. Nota: utilizar, por exemplo o valor da replicata nº 4 de C₁, C₂ e C₃.

3.6. Limites de detecção e quantificação

- 3.6.1. O limite de detecção do método (MDL) é calculado com base no valor do coeficiente angular da reta ajustada (b) para a curva de calibração e o desvio padrão (SD) das 6 replicatas de branco segundo a Equação 3:

$$MDL = \frac{3,3 \cdot SD}{b} \quad \text{Equação 3}$$

Research in Quality Assurance for Laboratories Instituto de Química de São Carlos (IQSC) Universidade de São Paulo (USP)
POP-RQA-005	Procedimento Operacional Padrão Validação de Método	Data Efetiva 06/01/2015

3.6.2. O limite de quantificação (LOQ) será o primeiro ponto da curva de calibração, com o critério de apresentar precisão ($\leq 20\%$) e incerteza em níveis aceitáveis.

4. Responsáveis

Ricardo dos Santos Camargo
Elaborador e Revisor

Igor Renato Bertoni Olivares
Aprovação

Revisão
001

Página 5 de 5

Apêndice 8 Procedimento de Cálculo de Incerteza

Research in Quality Assurance for Laboratories

Instituto de Química de São Carlos (IQSC)
Universidade de São Paulo (USP)

POP-RQA-006

Procedimento Operacional Padrão

Cálculo de Incerteza

Data Efetiva

06/01/2015

1. Propósito

Definir a sistemática para cálculo de incerteza da amostragem e analítica.

2. Escopo

Aplica-se aos analistas que se utilizem da técnica de RSE/GC para análise quantitativa de hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs), benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) e alquilfenóis (produtos de degradação de surfactantes) em matrizes aquosas (água bruta superficial), com o uso de dessorção térmica e detector de ionização em chama.

3. Procedimento

3.1. Incerteza Analítica

3.1.1. Criar uma frase clara e concisa a respeito do que se está medindo;

3.1.2. Fazer um fluxograma das principais etapas do método;

3.1.3. Através do fluxograma, formular uma equação para o cálculo do mensurando;

3.1.4. Através dessa equação de cálculo do mensurando, identificar as principais fontes de incerteza;

3.1.5. Fazer um diagrama de Ishikawa para essas principais fontes;

3.1.6. Encontrar as subcomponentes de cada fonte de incerteza;

3.1.7. Quantificar cada fonte de incerteza levando-se em conta as regras de combinação de variâncias:

3.1.7.1. Para equações de cálculo do valor do mensurando em que apenas as operações de soma e subtração ocorrem, tal com $y=(p+q-r+\dots)$, a incerteza combinada deve ser calculada como na Equação 1:

$$u_c(y(p, q, r, \dots)) = \sqrt{u(p)^2 + u(q)^2 + u(r)^2 + \dots} \quad \text{Equação 0}$$

3.1.7.2. Para equações que além de subtração e soma possuam produtos ou divisões, tal como $y=(p+q)/r+\dots$, a incerteza combinada deve ser calculada como na Equação 2:

$$u_c(y(p, q, r, \dots)) = \sqrt{\left(\frac{u(p)}{p}\right)^2 + \left(\frac{u(q)}{q}\right)^2 + \left(\frac{u(r)}{r}\right)^2 + \dots} \quad \text{Equação 20.1}$$

3.1.8. Para calcular a subcomponente de diferença de temperatura de operação e calibração de vidrarias volumétricas e micropipetas, utiliza-se a Equação 3:

$$u_{(T)} = \frac{\Delta T \cdot C_{exp} \cdot V}{\sqrt{3}} \quad \text{Equação 3}$$

3.1.8.1. ΔT : diferença de temperatura de calibração e a temperatura de operação;

3.1.8.2. C_{exp} : coeficiente de expansão do líquido;

3.1.8.3. V : volume aferido.

Revisão

001

Página 1 de 5

3.1.9. Para a subcomponente de calibração, utiliza-se a Equação 4. O valor de Incerteza Expandida é retirado do certificado de calibração. Caso não haja certificado de calibração, pode-se proceder Verificação Intermediária (micropipetas) e utilizar o resultado de incerteza da verificação. Para vidrarias volumétricas, pode-se utilizar os valores de tolerância para cada classe de vidraria, dividindo a tolerância por $\sqrt{3}$ (Equação 5), caso se assuma uma distribuição retangular ou $\sqrt{6}$, caso se assuma uma distribuição triangular (Equação 6).

$$u_{(cal)} = U/k \quad \text{Equação 4}$$

$$u_{(cal)} = a/\sqrt{3} \quad \text{Equação 5}$$

$$u_{(cal)} = a/\sqrt{6} \quad \text{Equação 6}$$

3.1.10. Para a incerteza da pesagem, lembrar que são feitas duas operações: tara e massa bruta. Então a incerteza deve ser contabilizada duas vezes, utilizando-se da regra 1 de combinação de variâncias (3.1.7.1). A Incerteza Expandida pode ser substituída pela incerteza da verificação intermediária (Equação 7).

$$u(m) = \sqrt{\left(\frac{U}{k}\right)^2 + \left(\frac{U}{k}\right)^2} \quad \text{Equação 7}$$

3.1.11. Para calculo de um fonte de incerteza, que tenha duas subcomponentes com unidades de medição diferentes, como massa e volume, utiliza-se a regra 2 de combinação de incerteza (item 3.1.7.2)

3.1.12. O calculo da incerteza da curva de calibração é dado pelas Equações 8, 9 e 10.

$$u(cal) = \frac{S}{B_1} \cdot \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(c_{0(cal)} - \bar{c})^2}{S_{xx}}} \quad \text{Equação 8}$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [A_j - (B_0 + B_1 \cdot c_j)]^2}{n - 2}} \quad \text{Equação 9}$$

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

Equação 10

3.1.13. Sendo:

- 3.1.13.1. S , o desvio padrão dos resíduos da curva;
- 3.1.13.2. B_1 , o coeficiente angular da curva;
- 3.1.13.3. B_0 , é o coeficiente linear da curva
- 3.1.13.4. p , o número de replicatas de análise da amostra;
- 3.1.13.5. n , o número total de dados usados na regressão (5 pontos em 5 replicas, $n = 25$);
- 3.1.13.6. $c_{0(cal)}$, o resultado de concentração gerado pela curva;
- 3.1.13.7. $\bar{c}$, é a média dos pontos de calibração escolhidos;
- 3.1.13.8. S_{xx} , é um fator de correção;
- 3.1.13.9. A_j , é a área para cada replicata de cada ponto da curva;
- 3.1.13.10. c_j , cada ponto de calibração sendo repetido conforme suas replicatas;

3.1.14. Para as componentes de incerteza de Precisão e Recuperação (quando houver), os desvios padrão já calculados podem ser inseridos tal como estão, pois já são incertezas-padrão.

3.1.15. Para o cálculo da incerteza padrão combinada, utiliza-se da regra 2 de combinação de variâncias (item 3.1.7.2).

3.1.16. Para o cálculo da incerteza expandida, utiliza-se da Equação 11, com $k=2$. E incerteza percentual é calculada pela Equação 12.

$$U(c_0) = u_c(c_0) \cdot k$$

Equação 11

$$U(\%) = \frac{U(c_0)}{c_0} \cdot 100$$

Equação 12

3.2. Incerteza da Amostragem

3.2.1. Utiliza-se o método de divisão dupla, conforme Figura 1.

Figura 1: Método de divisão dupla com duas análises para cada duplicata de amostra.

Cálculo de Incerteza

3.2.2. Os cálculos são feitos com os resultados das duplicatas, para cada alvo amostral (i). Os resultados para cada conjunto de duplicatas são x_{i1} , x_{i2} , x_{i3} e x_{i4} . As médias das análises de cada amostra são dadas pelas Equações 13 e 14

$$\bar{x}_{i1} = \frac{(x_{i1} + x_{i2})}{2} \quad \text{Equação 13}$$

$$\bar{x}_{i2} = \frac{(x_{i3} + x_{i4})}{2} \quad \text{Equação 14}$$

3.2.3. As diferenças absolutas das análises, D_{i1} e D_{i2} , são representadas nas Equações 15 e 16.

$$D_{i1} = |x_{i1} - x_{i2}| \quad \text{Equação 15}$$

$$D_{i2} = |x_{i3} - x_{i4}| \quad \text{Equação 16}$$

3.2.4. Caso sejam tomados vários alvos amostrais, é necessário tomar a diferença absoluta média das análises, $\bar{D}_1$ e $\bar{D}_2$, como nas Equações 17 e 18.

$$\bar{D}_1 = \frac{\sum D_{i1}}{n} \quad \text{Equação 17}$$

$$\bar{D}_2 = \frac{\sum D_{i2}}{n} \quad \text{Equação 18}$$

3.2.5. A média das diferenças absolutas médias das análises é calculada segundo a Equação 19. E o desvio padrão da análise é tomado pela Equação 20.

$$\bar{D}_{análise} = \frac{\bar{D}_1 + \bar{D}_2}{2} \quad \text{Equação 19}$$

$$s_{análise} = \frac{\bar{D}_{análise}}{1,128} \quad \text{Equação 20}$$

Cálculo de Incerteza

3.2.6. É necessário estimar os desvios considerando as quatro análises em conjunto, gerando o desvio absoluto da medição, D_i , como na Equação 21.

$$D_i = \frac{\bar{x}_{i1} + \bar{x}_{i2}}{2} \quad \text{Equação 21}$$

3.2.7. Se forem tomados vários alvos amostrais, então é necessário utilizar a Equação 22 e para calcular o desvio absoluto médio de medição. E o desvio padrão da medição é calculado pela Equação 23.

$$\bar{D}_{\text{medição}} = \frac{\sum D_i}{n} \quad \text{Equação 22}$$

$$s_{\text{medição}} = \frac{\bar{D}_{\text{medição}}}{1,128} \quad \text{Equação 23}$$

3.2.8. Para calcular o desvio padrão da amostragem, que será a incerteza-padrão combinada da mesma, basta utilizar a Equação 24. O desvio padrão da análise é calculado como uma média de dois valores que são médias também (Equação 22). Por essa razão, se utiliza o desvio padrão da média para esse resultado ($s/\sqrt{n}$).

$$s_{\text{amostragem}} = \sqrt{(s_{\text{medição}})^2 - \left(\frac{s_{\text{análise}}}{\sqrt{2}}\right)^2} \quad \text{Equação 24}$$

3.2.9. Multiplicando-se o valor do desvio padrão da amostragem por k obtém-se a incerteza expandida (Equação 25) em unidades de concentração ou de forma percentual (Equação 26).

$$U_{(\text{amostragem})} = s_{\text{amostragem}} \cdot k \quad \text{Equação 25}$$

$$U(\%)_{(\text{amostragem})} = \frac{U_{(\text{amostragem})} \cdot 100}{c_0} \quad \text{Equação 26}$$

4. Responsáveis

Ricardo dos Santos Camargo
Elaborador e Revisor

Igor Renato Bertoni Olivares
Aprovação

Apêndice 9 Procedimento de Controle de Qualidade Intralaboratorial

Research in Quality Assurance for Laboratories Instituto de Química de São Carlos (IQSC) Universidade de São Paulo (USP)
POP-RQA-007	Procedimento Operacional Padrão Controle de Qualidade Intralaboratorial	Data Efetiva 06/01/2015

1. Propósito

Definir a sistemática para o controle de qualidade das análises processadas pelo método RSE/GC/FID.

2. Escopo

Aplica-se aos analistas que se utilizem da técnica de RSE/GC para análise quantitativa de hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs), benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) e alquilfenóis (produtos de degradação de surfactantes) em matrizes aquosas (água bruta superficial), com o uso de dessorção térmica e detector de ionização em chama.

3. Procedimento

3.1. Carta controle de Shewhart

3.1.1. Utilizar como amostra controle a solução padrão utilizada para fortificação do branco;

3.1.2. Realizar 10 análises e utilizar o teste de Grubbs para exclusão de possíveis *outliers*;

3.1.3. O eixo x do gráfico será o número consecutivo de resultados e o eixo y será composto pelos resultados. A linha central do gráfico será a média dos resultados prévios. As linhas do limite de controle superior e inferior serão calculadas levando em conta três vezes o desvio-padrão dos resultados prévios ($L.C.=\pm 3 \cdot s$) e os limites de atenção serão iguais a 2 vezes o desvio padrão ($L.A.=\pm 2 \cdot s$);

3.1.4. Realizar análises diárias da amostra controle e plotar os resultados na carta

3.2. Carta controle por Diferença

3.2.1. Utilizar como amostra controle uma matriz branca fortificada;

3.2.2. A linha central do gráfico é o 0 (nenhuma diferença). Utilizar o índice de repetibilidade da validação (Equação 1) para o cálculo dos limites. Para o limite de atenção, multiplicar o índice de repetibilidade pelo t de Student ($t_{(n-1,1-\alpha)}$) para 95% de confiança e para o limite de ação, 99% de confiança.

$$r = t_{(n-1,1-\alpha)} \cdot \sqrt{2} \cdot s_{rep} \quad \text{Equação 1}$$

3.2.3. Realizar análise da duplicata da matriz branca fortificada semanalmente e plote os resultados na carta.

3.3. Situação fora de controle

3.3.1. Requisitos para se declarar uma situação fora de controle (Figura 1):

3.3.1.1. 1 valor fora dos limites de controle;

3.3.1.2. 7 valores consecutivos de um lado da linha de quantidade desejada;

3.3.1.3. 10 de 11 valores consecutivos de um lado da linha de quantidade desejada;

3.3.1.4. 7 valores consecutivos em tendência ascendente ou descendente;

3.3.1.5. Dois de três valores consecutivos fora dos limites de atenção;

3.4. Quando uma situação fora de controle é detectada, é necessário remediar imediatamente e depois, proceder uma averiguação de porque a mesma ocorreu;

3.5. Encontrada a causa raiz do problema, a mesma deve ser corrigida;

3.6. Uma nova análise deve ser processada para observar se a medida foi efetiva para resolver a situação.

Figura 1: Situações fora de controle.

4. Responsáveis

Ricardo dos Santos Camargo
Elaborador e Revisor

Igor Renato Bertoni Olivares
Aprovação

Apêndice 10 Procedimento de Confecção de Barra Sortiva

Research in Quality Assurance for Laboratories Instituto de Química de São Carlos (IQSC) Universidade de São Paulo (USP)
POP-RQA-008	Procedimento Operacional Padrão Confecção de Barra Sortiva	Data Efetiva 06/01/2015

1. Propósito

Definir a sistemática para confecção da barra sortiva utilizada no método RSE.

2. Escopo

Aplica-se aos analistas que se utilizem da técnica de RSE/GC para análise quantitativa de hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs), benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) e alquilfenóis (produtos de degradação de surfactantes) em matrizes aquosas (água bruta superficial), com o uso de dessorção térmica e detector de ionização em chama.

3. Procedimento

3.1. Materiais

- 3.1.1. Estufa a 100°C;
- 3.1.2. Forno mufla a 200°C;
- 3.1.3. Dessecador;
- 3.1.4. Bomba de vácuo;
- 3.1.5. Barra de aço inox;
- 3.1.6. Vidro de relógio;
- 3.1.7. Espátula;
- 3.1.8. Molde da barra sortiva;
- 3.1.9. Chave Allen;
- 3.1.10. Cadinho de porcelana;
- 3.1.11. Luvas de alta temperatura;
- 3.1.12. Pipeta Pasteur;
- 3.1.13. Base de PDMS;
- 3.1.14. Agente de Cura do PDMS;
- 3.1.15. Papel higiênico;
- 3.1.16. Estilete;
- 3.1.17. Sonicador.

3.2. Confecção

- 3.2.1. Lavar a barra de aço em hexano (deixar em sonicador por 20 minutos) e secar;
- 3.2.2. Aferir a massa da barra de aço e anotar o valor exato;
- 3.2.3. Aferir 0,2 g de base de PDMS no vidro de relógio e anotar o valor exato;
- 3.2.4. Aferir 0,02 g de agente de cura do PDMS, com a ajuda da pipeta de Pasteur pingando gotas sobre a base de PDMS no vidro de relógio, e anotar o valor exato;
- 3.2.5. Com a espátula, misturar a base e o agente de cura de PDMS por 1 minutos;
- 3.2.6. Colocar o vidro de relógio no dessecador conectado à bomba de vácuo e efetuar vácuo por 30 minutos;
- 3.2.7. Ajustar a barra de aço no molde de teflon (conectar uma extremidade da barra na “cabeça” do molde para que a outra extremidade fique 3 mm para fora do molde);
- 3.2.8. Com a espátula, preencher as canaletas das duas faces do molde de teflon da barra sortiva (até o nível da face);
- 3.2.9. Inserir no dessecador e deixar por mais 15 minutos fazendo vácuo;
- 3.2.10. Retirar as duas faces e inserir a barra de aço nas canaletas e fechar a tarraxa com chave Allen.

- 3.2.11. Inserir o molde invertido (de cabeça para baixo) em um cadinho de porcelana (apoando as extremidades da tarraxa nas bordas do cadinho) e colocar na estufa a 100°C por 45 minutos;
- 3.2.12. Retirar o molde da estufa, retirar a tarraxa com a ajuda da chave Allen e com luvas de alta temperatura;
- 3.2.13. Retirar a barra com a fase de PDMS e inserir em cadinho de porcelana;
- 3.2.14. Colocar no forno mufla a 200°C por 2 horas;
- 3.2.15. Retirar a barra do forno mufla, deixar esfriar e cortar as rebarbas com estilete;
- 3.2.16. Lavar a barra em acetona por 30 minutos no sonicador.
- 3.2.17. Secar a barra no injetor do cromatógrafo a 330°C por 1 hora.

4. Responsáveis

Ricardo dos Santos Camargo
Elaborador e Revisor

Igor Renato Bertoni Olivares
Aprovação

Apêndice 11 Procedimento de Extração RSE

Research in Quality Assurance for Laboratories Instituto de Química de São Carlos (IQSC) Universidade de São Paulo (USP)
POP-RQA-009	Procedimento Operacional Padrão Extração RSE	Data Efetiva 06/01/2015

1. Propósito

Definir a sistemática para análises utilizando o método RSE/GC/FID.

2. Escopo

Aplica-se aos analistas que se utilizem da técnica de RSE/GC para análise quantitativa de hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs), benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) e alquilfenóis (produtos de degradação de surfactantes) em matrizes aquosas (água bruta superficial), com o uso de dessorção térmica e detector de ionização em chama.

3. Procedimento

3.1. Materiais necessários

- 3.1.1. Vial de extração modificado;
- 3.1.2. Peças de teflon;
- 3.1.3. Barra sortiva;
- 3.1.4. Barra de agitação;
- 3.1.5. Lacre para vial 20 mm;
- 3.1.6. Lacrador e deslacrador;
- 3.1.7. Proveta 25 mL
- 3.1.8. Água destilada*;
- 3.1.9. Padrão analítico*;
- 3.1.10. Micropipeta de 10 ou 100 µL*;
- 3.1.11. Bequer com acetona*;
- 3.1.12. Banho criostático com etanol a 5±1°C;
- 3.1.13. Aquecedor/agitador com seletor de temperatura a 135°C e agitação no nível 1;
- 3.1.14. Termômetro;
- 3.1.15. Imã.
- 3.1.16. *somente para ensaios que necessitem de fortificação.

3.2. Execução

3.3. Amostras fortificadas

- 3.3.1. Deixar o padrão analítico 15 minutos fora da geladeira (preferencialmente dentro da capela) para ficar a temperatura ambiente;
- 3.3.2. Colocar a barra de agitação no vial de extração;
- 3.3.3. Inserir a barra sortiva em uma das peças de teflon (para facilitar a conexão dentro do vial de extração);
- 3.3.4. Aferir 17 mL de água na proveta e transferir aproximadamente metade do conteúdo (±8 mL) para o vial de extração;
- 3.3.5. Não é possível transferir todo o volume para o vial, pois irá transbordar pelas saídas laterais.
- 3.3.6. Ligar o exaustor da capela;
- 3.3.7. Itens 3.3.8 a 3.3.17 têm de ser feitos com exaustão ligada.
- 3.3.8. Ambientar a micropipeta: aspirar a quantidade desejada de solvente (acetona) e descartar (repetir 5 vezes);
- 3.3.9. Retirar quantidade desejada de solução padrão com a micropipeta e descartar fora do frasco;

- 3.3.10. Retirar quantidade desejada de solução padrão com a micropipeta e descartar dentro do frasco;
- 3.3.11. Aferir a quantidade desejada de solução padrão e transferir para o vial de extração (com aproximadamente 8 mL de água destilada);
- 3.3.12. Fechar o fecho do frasco da solução padrão;
- 3.3.13. Encaixar as peças de teflon nos “braços” do vial de extração, já com a barra conectada a uma peça de teflon;
- 3.3.14. Observar que as peças de teflon têm lado para colocar nos braços do frasco de extração. Se não for possível conseguir o encaixe, inverter as peças.
- 3.3.15. Rosquear as roscas de cor preta de forma a conseguir uma boa vedação;
- 3.3.16. Completar o volume para 17 mL;
- 3.3.17. Com a ajuda do lacrador, lacrar o vial de extração com lacre de 20 mm;
- 3.3.18. Colocar o vial de extração no bloco de aquecimento;
- 3.3.19. Iniciar a contagem de tempo no timer (para 30 e 60 minutos);
- 3.3.20. Conectar os engates-rápido nas mangueiras que se acoplam nas peças de teflon;
- 3.3.21. Lembrar de devolver o recipiente com solução padrão à geladeira.
- 3.3.22. Anotar a temperatura que registra o termômetro a cada 30 minutos;
- 3.3.23. Decorridos 30 minutos de extração, abrir os registros de etanol refrigerado e deixar até o final da extração a refrigeração da barra;
- 3.3.24. Ao término da extração, retirar o termômetro do bloco de aquecimento para evitar que seja quebrado durante a retirada do vial de extração;
- 3.3.25. Fechar os registros e desacoplar os engates-rápidos;
- 3.3.26. Levar o vial até a capela, ligar a exaustão e desrosquear as roscas pretas.
- 3.3.27. Retirar as peças de teflon do vial (a barra sortiva fica sempre conectada a umas das peças). Desconectar a barra da peça de teflon, evitando tocar a fase sortiva (PDMS);
- 3.3.28. Nunca retirar a barra fazendo alavanca contra as paredes da peça de teflon porque isso danifica a parede de teflon e posteriormente pode gerar um ponto de vazamento.
- 3.3.29. Só a barra sortiva é retirada da capela. O restante dos materiais fica na capela com a exaustão ligada.
- 3.3.30. Chacoalhar a barra para retirar o excesso de matriz (água) e do etanol que fica no interior na parte oca da barra;
- 3.3.31. Secar a barra em papel absorvente;
- 3.3.32. No GC, baixar a pressão de 73 para 0 kPa e acionar o botão “Download”. Quando o GC emitir um estalo, significa que a pressão foi corrigida para 0.
- 3.3.33. Em uma das mãos, colocar a luva amarela de alta temperatura e com a outra desrosquear o injetor do GC com o auxílio de uma chave específica.
- 3.3.34. Depois de aberto o injetor, se houver outra barra no interior do liner, retirar a mesma. Se não, inserir diretamente a barra sortiva que será dessorvida.
- 3.3.35. Utilizar a pinça para manusear a barra.
- 3.3.36. Fechar o injetor.
- 3.3.37. Corrigir a pressão de 0 para 73 kPa. A pressão demora aproximadamente 1 minuto para estabilizar.
- 3.3.38. Enquanto a pressão estabiliza, inserir no menu “Single Run” > “Sample Login”, o nome da amostra;
- 3.3.39. Pressionar o botão “Start” no software, que habilita o sistema a entrar em “Stand By”.

Research in Quality Assurance for Laboratories

Instituto de Química de São Carlos (IQSC)

Universidade de São Paulo (USP)

POP-RQA-009

Procedimento Operacional Padrão

Data Efetiva**Extração RSE**

06/01/2015

- 3.3.40.** Talvez seja necessário corrigir a linha de base pressionando o botão “Zero CBM”, que deixa a linha de base próxima do valor 0;
- 3.3.41.** Assim que o sistema ficar pronto “Ready” (isso acontece quando a temperatura atinge 75 kPa), apertar o botão Start do GC (botão azul). A análise tem início.
- 3.3.42.** Enquanto a dessorção é feita, os resíduos da extração devem ser acondicionados em frasco próprio para rejeitos, utilizando a capela;
- 3.3.43.** Utilizar um ímã para fixar a barra de agitação para que não seja transferida junto com os resíduos para o frasco de rejeitos;
- 3.3.44.** Tampar o frasco de resíduos e colocar em local devido;
- 3.3.45.** As peças de teflon e a barra de agitação são lavadas com esponja e detergente e enxaguadas com água potável e posteriormente, água destilada;
- 3.3.46.** O vial de extração é lavado com gaspilhão e detergente, enxaguado com água potável e posteriormente, água destilada.

4. Responsáveis

Ricardo dos Santos Camargo
Elaborador e Revisor

Igor Renato Bertoni Olivares
Aprovação

Revisão
001

Página **3** de **3**

Apêndice 12 Procedimento de Solução Padrão

Research in Quality Assurance for Laboratories

Instituto de Química de São Carlos (IQSC)

Universidade de São Paulo (USP)

POP-RQA-010

Procedimento Operacional Padrão

Data Efetiva

Solução Padrão

06/01/2015

1. Propósito

Definir a sistemática para fazer a solução padrão de alquilfenóis, hidrocarbonetos poliaromáticos e BTEX.

2. Escopo

Aplica-se aos analistas que se utilizem da técnica de RSE/GC para análise quantitativa de hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs), benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) e alquilfenóis (produtos de degradação de surfactantes) em matrizes aquosas (água bruta superficial), com o uso de dessorção térmica e detector de ionização em chama.

3. Procedimento

3.1. Equipamentos necessários

- 3.1.1. Balança analítica;
- 3.1.2. Espátula de aço inox;
- 3.1.3. Sapata de aferição;
- 3.1.4. Balões volumétricos de 10 mL e 100 mL;
- 3.1.5. 2 Béqueres com acetona;
- 3.1.6. 6 Béqueres de 10 mL;
- 3.1.7. Papel absorvente;
- 3.1.8. Micropipeta de 100 µL;
- 3.1.9. Micropipeta de 10 µL (se necessária para diluições subsequentes).

3.2. Lavagem inicial

- 3.2.1. Balões, béqueres devem ser lavados com solução de extran 5%, enxaguados com água corrente e depois com água destilada e deixados de boca para baixo em papel absorvente para secagem;
- 3.2.2. Antes de iniciar a utilização dos mesmos, rinsar com acetona para facilitar a evaporação de água residual.
- 3.2.3. Se possível, após essa rinsagem (e se não houver resquícios de umidade nos balões), rinsar novamente acetona e injetar no GC/FID para observar se há alguma contaminação.

3.3. Execução

- 3.3.1. Ligar a balança e deixar 30 minutos para aquecer;
- 3.3.2. Como os padrões estão no congelador, retirar 15 minutos antes do início da pesagem;
- 3.3.3. Deixar as portinholas abertas para ambientar com a temperatura da sala;
- 3.3.4. Tem que ter um controle de temperatura (erlenmeyer com água e um termômetro);
- 3.3.5. Colocar a sapata de aferição, fechar todas as portinholas e tarar a balança;
- 3.3.6. Aferir as massas para os compostos, considerando a pureza de cada composto (vide Tabela 1);
- 3.3.7. Após a aferição, transferir a massa do composto para o balão volumétrico de 100 mL. Após a transferência, tampar o balão de 100 mL;
- 3.3.8. Anotar a massa exata de cada composto.
- 3.3.9. Tolerância de pesagem de 0,5 mg (0,0005 g).
- 3.3.10. Verificar a temperatura depois da pesagem de cada de composto.
- 3.3.11. Indeno[1,2,3-c,d]pireno foi excluído da lista pois não havia quantidade suficiente para aferir a massa.

Revisão
001

Página 1 de 4

- 3.3.12. Iniciar pelos compostos menos voláteis (ordem da Tabela 1);
- 3.3.13. Após a transferência, o balão deve ser fechado com sua tampa;
- 3.3.14. Lavar a espátula com água e detergente utilizando a esponja, enxaguar com água corrente e depois rinsar com água destilada.
- 3.3.15. Secar a espátula com papel absorvente;
- 3.3.16. Embeber outro papel absorvente com acetona e passar na espátula.
- 3.3.17. Depois com outro papel, secar a espátula.
- 3.3.18. Aguardar 5 minutos antes de pesar o próximo composto.
- 3.3.19. O tempo de 5 minutos é para garantir que a espátula esteja seca.
- 3.3.20. Repetir os passos 3.5 a 3.13 para os próximos compostos.
- 3.3.21. Para garantir que toda a massa seja transferida, rinsar a sapata com solvente (acetona) ao final da pesagem de todos os compostos;

Tabela 1. Massa a ser aferida para cada composto.

Composto	Pureza	Massa (mg)
Benzo[g,h,i]perileno	0,996	10,0
Dibenzo[a,h]antraceno	0,999	10,0
Benzo[k]fluoranteno	0,999	10,0
Benzo[b]fluoranteno	0,999	10,0
Benzo[a]antraceno	0,988	10,1
Benzo[a]pireno	0,996	10,0
Octilfenol	0,999	10,0
Nonilfenol	0,999	10,0
Criseno	0,999	10,0
Pireno	0,914	10,9
Fluoranteno	0,981	10,2
Fluoreno	0,985	10,1
Fenantreno	0,991	10,1
Antraceno	0,992	10,1
Acenaftileno	0,999	10,0
Acenafteno	0,999	10,0
Naftaleno	0,999	10,0

- 3.3.22. Para aferir os volumes dos compostos líquidos (BTEX), utilizar a capela;
- 3.3.23. Como também estão no congelador, esperar 15 minutos antes de aferir o volume;
- 3.3.24. Antes de iniciar os procedimentos, ligar a capela;
- 3.3.25. Ambientar a ponteira da micropipeta com acetona, aspirando e descartando em papel absorvente (repetir o procedimento 5 vezes);
- 3.3.26. Verter uma quantidade do composto (que seja possível aspirar com a micropipeta) em um béquer de 10 mL;
- 3.3.27. Com a micropipeta, aspirar e descartar a quantidade de volta ao béquer para ambientar a ponteira com o composto (repetir o procedimento 3 vezes);
- 3.3.28. Abrir o balão volumétrico;
- 3.3.29. Aspirar o volume (vide Tabela 2) e transferir para o balão volumétrico com os compostos anteriores (HPAs e alquilfenóis);
- 3.3.30. Fechar o balão volumétrico;

- 3.3.31. Descartar a ponteira;
- 3.3.32. Inserir uma nova ponteira;
- 3.3.33. Repetir os passos 3.17 a 3.24 para os demais compostos;
- 3.3.34. Completar o volume do balão volumétrico para 100 mL com acetona;
- 3.3.35. Para uma completa dissolução dos compostos, sonicar por 30 minutos;
- 3.3.36. Se ainda houver precipitado, sonicar sucessivamente até não haver precipitado;
- 3.3.37. Seguindo esses procedimentos a concentração final da solução será 0,1 g/L (1.105 µg L⁻¹) para hidrocarbonetos poliaromáticos e alquilfenóis e 0,6 g/L (6.105 µg L⁻¹) de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos;

Tabela 2: Volume a ser transferido de BTEX.

Composto	Pureza	Volume (uL)	Volume Corrigido (uL)
Benzeno	0,999	68,5	68,5
Tolueno	0,999	69,2	69,3
Etilbenzeno	0,999	69,2	69,3
o-xileno	0,999	68,2	68,3
m-xileno	0,997	69,8	70,0
p-xileno	0,996	69,8	70,0

3.3.38. Diluições subsequentes

- 3.3.38.1. Deixar a solução-mãe preparada no item 3 por 15 minutos fora da geladeira;
- 3.3.38.2. Ambientar a ponteira da micropipeta com acetona, aspirando e descartando em papel absorvente (repetir o procedimento 5 vezes);
- 3.3.38.3. Transferir uma quantidade razoável da solução-mãe para um béquer de 10 mL;
- 3.3.38.4. Com a micropipeta, aspirar e descartar a quantidade de volta ao béquer para ambientar a ponteira com o composto (repetir o procedimento 3 vezes);
- 3.3.38.5. Aspirar 500 µL da solução e transferir para outro balão volumétrico de 10 mL (contendo aproximadamente 5 mL de acetona);
- 3.3.38.6. Completar o volume para 10 mL e tampar o balão;
- 3.3.38.7. Homogeneizar o conteúdo do balão como ensinado em laboratórios de ensino saídos pelos quais passamos!
- 3.3.38.8. A concentração dessa solução será de 5 mg L⁻¹ (5000 µg L⁻¹) para hidrocarbonetos poliaromáticos e alquilfenóis e 30 mg L⁻¹ (30000 µg L⁻¹) para benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos;
- 3.3.38.9. As próximas diluições ficam a cargo do leitor (aplicando os passos 3.1 a 3.6 e calculando o volume necessário a ser pipetado).

3.3.39. Controle de estabilidade das soluções-padrão

- 3.3.39.1. A periodicidade de análise desse tipo de controle é semanal (se estiver fazendo análises) ou mensal (se não estiver fazendo análises);

- 3.3.39.2. A primeira análise deve ser realizada em até 48 horas após fazer a solução padrão;
- 3.3.39.3. Toda solução de compostos em solvente (acetona) deve ter controle de estabilidade implementado;
- 3.3.39.4. Retirar a solução do congelador e aguardar 15 minutos para alcançar a temperatura ambiente;
- 3.3.39.5. Ambientar microseringa com acetona, aspirando e descartando o volume em papel absorvente (repetir o procedimento 5 vezes);
- 3.3.39.6. Verter uma pequena quantidade em um béquer de 10 mL (o suficiente para retirar 10 μ L);
- 3.3.39.7. Com a microseringa, aspirar e descartar 10 μ L de volta ao béquer para ambientar a ponteira com a solução (repetir o procedimento 3 vezes);
- 3.3.39.8. Retirar 1 μ L e injetar em GC/FID;
- 3.3.39.9. Se o pico cromatográfico sobrecarregar (overload), significa que a quantidade de composto injetada é muito alta. Proceder então uma diluição adequada para esse controle.

4. Responsáveis

Ricardo dos Santos Camargo
Elaborador e Revisor

Igor Renato Bertoni Olivares
Aprovação

Apêndice 13 Procedimento de Amostragem

Research in Quality Assurance for Laboratories Instituto de Química de São Carlos (IQSC) Universidade de São Paulo (USP)
POP-RQA-011	Procedimento Operacional Padrão Amostragem	Data Efetiva 06/01/2015	

1. Propósito

Definir a sistemática para amostragem de água bruta, superficial em microbacias hidrográficas para o projeto de pesquisa “Análise de contaminantes voláteis e semivoláteis em microbacias de diferentes usos pelo acoplamento das técnicas *Refrigerated Sorptive Extraction e Gas Chromatography* (RSE/GC) em ambiente controlado pela ferramenta *Analytical Quality Assurance Cycle*”.

2. Escopo

Aplica-se aos analistas que são responsáveis pela amostragem.

3. Procedimento

3.1. Recursos Humanos

3.1.1. Deverão ser empregados, no mínimo, dois (2) técnicos com treinamento em amostragem.

Entende-se por treinamento: i) a leitura do guia ANA que foi utilizado para a elaboração do protocolo; ii) assistir os vídeos explicativos também disponibilizados pela ANA; iii) a familiarização com o formulário de campo a ser preenchido durante a coleta; iv) treinamento prático em amostragem, que consiste de um ensaio de amostragem em rio que simule situações que serão encontradas na coleta em campo;

3.1.2. Nesse treinamento devem ser contempladas competências requeridas na amostragem: conhecimento do alvo-amstral e variabilidade espaço-temporal do mesmo; conhecimento prático e teórico do procedimento de amostragem e de utilização dos equipamentos; conhecimento de técnicas de preservação de amostras e cuidados contra contaminação das mesmas; conhecimento a respeito do método analítico (interferentes, quantidade necessária de amostra, calibração, entre outros).

3.2. Equipamento de proteção individual (EPI)

3.2.1. Os técnicos deverão usar as seguintes vestimentas obrigatórias e acessórios:

- 3.2.1.1. Sapato fechado;
- 3.2.1.2. Calça comprida;
- 3.2.1.3. Luvas nitrílicas;
- 3.2.1.4. Jaleco;
- 3.2.1.5. Boné;
- 3.2.1.6. Protetor solar;
- 3.2.1.7. Repelente;

3.2.2. Se houver a necessidade de utilizar embarcações para realizar a amostragem, o colete salva-vidas também é um item obrigatório.

3.3. Equipamentos para amostragem, transporte e armazenamento

3.3.1. Para os compostos que serão monitorados (hidrocarbonetos poliaromáticos, benzeno, tolueno, etilbenzeno, xilenos, alquilfenóis) são necessários os seguintes equipamentos para a coleta de água:

- 3.3.1.1. Sondas (OD, pH, TDS, temperatura, condutividade);
- 3.3.1.2. 1 balde de alumínio (5L);
- 3.3.1.3. Frascos de vidro borossilicato âmbar com papel alumínio entre rosca e tampa (500 mL);

- 3.3.1.4. Caixas de isopor (de tamanhos variados);
- 3.3.1.5. Recipiente com água destilada (5 L);
- 3.3.1.6. Pisseta;
- 3.3.1.7. Luvas nitrílicas (azuis);
- 3.3.1.8. Câmera fotográfica;
- 3.3.1.9. GPS;
- 3.3.1.10. Pilhas;
- 3.3.1.11. Fita adesiva transparente;
- 3.3.1.12. Fita marrom para etiquetagem;
- 3.3.1.13. Caneta permanente/lápis;
- 3.3.1.14. Prancheta e papel;
- 3.3.1.15. Gelo;
- 3.3.1.16. Cabos/suporte para o balde de inox;
- 3.3.1.17. Canivete;

3.4. Procedimentos de lavagem dos equipamentos

3.4.1. Frascos de coleta (de vidro)

- 3.4.1.1. Os frascos que serão utilizados para coleta das amostras de água serão lavados da seguinte maneira:
 - 3.4.1.1.1. Enxaguar os frascos com água corrente (para retirar resíduos sólidos);
 - 3.4.1.1.2. Colocar os frascos em molho com detergente alcalino (5% em volume) por 24 h;
 - 3.4.1.1.3. Lavar os frascos com gaspilhão e enxaguar com água corrente (preencher o volume do frasco e esvaziar por, no mínimo, 10 vezes);
 - 3.4.1.1.4. Enxaguar com água destilada (mínimo de 3 vezes);
 - 3.4.1.1.5. Colocar os frascos em forno mufla (270°C) por no mínimo 8 h (tampas e septos devem ser lavados da mesma maneira, mas nessa etapa devem ser colocados em estufa a 90°C).
 - 3.4.1.1.6. Após retirar os frascos e os mesmos estiverem a temperatura ambiente, tampar e acondicionar em local livre de poeira;

3.4.2. Equipamentos de coleta e medição de campo

- 3.4.2.1. Antes de ir a campo, o balde de 5 L deve ser lavado com sabão alcalino (5% em volume, mas sem a necessidade de molho), enxaguado com água corrente em abundância e também com água destilada. Deve ser virado com a abertura para baixo para secagem sobre papel absorvente. Após a secagem, deve ser acondicionado em local livre de poeira.
- 3.4.2.2. A sonda paramétrica deve ser enxaguada com água corrente e depois com água destilada (apenas a parte onde ficam os eletrodos). O cabo que liga o registrador aos eletrodos pode ser limpo com um pano úmido. Após a secagem, acondicionar em local livre de poeira.
- 3.4.2.3. Durante a coleta, balde e sonda devem primeiramente ser rinsados com água do ponto de amostragem: o balde, que vai servir para coletar água para análise da sonda deve ser preenchido completamente. A sonda é então inserida e enxaguada dentro do balde. Após retirar a sonda, o balde deve ser inclinado e girado para que a água entre em contato com as bordas secas do balde (caso o balde não tenha sido preenchido completamente). A água é então descartada. Apenas após essa rinsagem a água será coletada e a análise pela sonda será processada.

3.4.2.4. Após a coleta, todos os equipamentos devem ser enxaguados com água destilada antes de passar para o próximo ponto de amostragem (tentativa de eliminar a contaminação cruzada). Em todos os pontos de amostragem, a rinsagem com água do ponto de amostragem (anterior à coleta) e o enxague com água destilada (posterior a coleta) devem ser processados.

3.4.3. Equipamentos de Análise

3.4.3.1. Compõem os equipamentos de análise: proveta, béquero, vial de extração, peças de PTFE para suporte da barra sortiva). Béquero, vial, peças de PTFE e proveta devem ser lavados com detergente alcalino 5%, enxaguados com água corrente em abundância e posteriormente com água destilada. Após a extração de cada amostra, o procedimento de lavagem deve ser repetido.

3.5. Procedimento para efetuar análises de brancos

3.5.1. Os brancos fazem parte dos procedimentos de Controle de Qualidade. O primeiro deles é o branco de lavagem da frascaria: 4% dos frascos (ou um mínimo de 5) devem ser rinsados com solvente orgânico e o solvente analisado em cromatógrafo para avaliar a presença de contaminação pelos compostos de interesse. Os frascos devem ser aleatoriamente escolhidos para o teste.

3.5.2. Os brancos de campo e transporte são preparados em conjunto: três frascos (A, B e C) são preenchidos com água destilada. Importante: Os frascos C devem ser preparados em quantidade igual ao número de pontos de amostragem. O frasco A é analisado imediatamente pela metodologia. Os outros dois frascos são transportados até o campo. Os frascos B e C permanecerão dentro da caixa de isopor com gelo desde a saída do laboratório. No campo, apenas os frascos C serão retirados, ficando o frasco B permanentemente na caixa de isopor. Para cada ponto de amostragem, um frasco C deve ser levado junto dos frascos de coleta, aberto ao mesmo tempo em que se inicia o preenchimento desses frascos e fechado quando a coleta do ponto estiver terminada. Assim, os frascos de coleta e o frasco C são acondicionados na caixa de isopor com gelo e encaminha-se para o próximo ponto de amostragem.

3.5.3. Os critérios para aceitação dos resultados dos brancos serão descritos na seção 9. Controle de Qualidade na Amostragem.

3.6. Procedimentos de transporte, coleta e preservação das amostras

3.6.1. Os frascos de vidro devem ser transportados em caixas de papelão ou similar no assoalho do veículo e sem empilhamento, evitando assim quebra de frascos com quedas. É conveniente levar frascos adicionais para o caso de quebra. Como já orientado na seção anterior, os frascos de controle B e C devem ser transportados na caixa de isopor com gelo (deve-se levar gelo adicional para manter a temperatura durante a ida ao campo). Temperatura de preservação é de $4 \pm 2^\circ\text{C}$.

3.6.2. Os equipamentos necessários para a amostragem são: balde de alumínio, sondas paramétricas, caixa de isopor (menor) com gelo, 3 frascos de coleta (recomenda-se levar um frasco adicional para o caso de quebra), o frasco C (branco do ponto de amostragem), pisseta com água destilada.

3.6.3. No ponto de amostragem, o primeiro procedimento é conferir as coordenadas anteriormente georreferenciadas. Como descrito na seção de lavagem, 1 balde de inox deve ser imerso na água e retirado e nessa água a sonda será enxaguada (10 segundos de imersão). Nenhuma medição é feita. A água é então descartada.

3.6.4. A coleta se inicia;

3.6.5. O mesmo balde será lançado no ponto de amostragem e será coletada água. Essa água será utilizada para fazer as coletas microbiológicas;

3.6.6. O balde é lançado no mesmo ponto, a coleta pode ser efetuada. Nesse momento deve-se abrir o frasco de coleta e o frasco C (este ficará aberto durante todo o processo);

3.6.7. Preencher completamente o frasco de coleta e deixar extravasar uma certa quantidade de amostra. O frasco é então fechado e o restante de água do balde, descartado. O frasco de coleta preenchido deve ser colocado imediatamente no frasco de isopor com gelo.

3.6.8. O mesmo procedimento é repetido para replicar a amostra (coleta e medição com sonda; coleta e preenchimento do frasco). Nessa segunda coleta, é feita uma rinsagem do balde com água destilada e depois essa água é transferida para o terceiro frasco de coleta, deixando extravasar volume como nos outros frascos, sendo posteriormente fechado (controle de contaminação cruzada entre os pontos de amostragem, descrito anteriormente). Após o último frasco ser fechado, o frasco C também é fechado e retorna para a caixa de isopor com gelo.

3.6.9. A coleta termina.

3.6.10. Essa operação não deve ultrapassar o tempo de 20 minutos (quanto mais se demora para replicar a amostragem, mais erros são embutidos ao processo, devido a variabilidade espaço-temporal do corpo hídrico, variações rápidas de temperatura entre outros). Todo o procedimento deve ser repetido a cada ponto de amostragem.

3.6.11. Uma observação importante durante a amostragem é de que o frasco de coleta que já foi preenchido e fechado deve ser acondicionado imediatamente na caixa com gelo. Chegando ao veículo, os frascos devem ser transferidos para a caixa com gelo maior e a caixa menor liberada para o próximo ponto de amostragem. O frasco C no momento em que é retirado do veículo para ser transportado para o ponto de amostragem não necessita de refrigeração, pois no momento em que é aberto deve estar na temperatura do ambiente (é claro, que depende do tempo que se demora para sair do veículo e iniciar a amostragem – se esse período for maior que 30 minutos é recomendável que o frasco fique na caixa com gelo até se chegar no ponto de amostragem).

3.6.12. O cuidado de refrigerar os frascos de controle de branco é necessário, pois se houver contaminação durante o transporte, a não preservação dos frascos pode degradar os compostos e a contaminação pode passar despercebida.

3.7. Procedimento para identificação dos frascos e preenchimento do formulário de amostragem

3.7.1. A identificação dos frascos deve ser feita previamente no laboratório, da seguinte maneira: deve haver um prefixo “B” seguido do número da bacia hidrográfica, com dois dígitos, seguido de um traço “-” seguido da sigla “OR” para identificar as análises de compostos orgânicos, seguidos do número “1” ou “2” para identificar a replicata. Exemplo: “B12-OR-2”;

- 3.7.2.** Os frascos de controle (brancos) devem ser identificados da seguinte forma: o frasco A será identificado apenas pela letra “A”, ocorrendo o mesmo para o frasco B, com a respectiva letra.
- 3.7.3.** Como deverá haver o mesmo número de frascos C para os pontos de amostragem, o rótulo do frasco C contará com o prefixo “B” seguido do número da bacia hidrográfica, com dois dígitos e a letra C, separados por hífen. Exemplo: “B12-C”
- 3.7.4.** O controle de contaminação cruzada, para cada ponto de amostragem deve ser identificado com prefixo “B” seguido do número da bacia hidrográfica, com dois dígitos e a letra X, separados por hífen. Exemplo: “B12-X”.
- 3.7.5.** Recomenda-se levar rótulos em branco, caneta permanente e fita adesiva para o caso de quebra de frascos já identificados.
- 3.7.6.** O formulário de amostragem deve haver as seguintes informações:
- 3.7.6.1. Nome do programa de amostragem;
 - 3.7.6.2. Nome dos técnicos responsáveis pela coleta;
 - 3.7.6.3. Natureza da amostra (no caso, um rio);
 - 3.7.6.4. Tipo de amostra (no caso, coleta simples);
 - 3.7.6.5. Condições meteorológicas das últimas 24 h;
 - 3.7.6.6. Equipamentos utilizados.
- 3.7.7.** Especificamente, em cada ponto de amostragem deve haver os seguintes itens:
- 3.7.7.1. Identificação do ponto de amostragem (código, coordenadas georreferenciadas e pontos de referência);
 - 3.7.7.2. Código dos frascos que foram utilizados na coleta.
 - 3.7.7.3. Condições meteorológicas no momento da amostragem;
 - 3.7.7.4. Data e hora em que se inicia e termina a coleta;
 - 3.7.7.5. Medidas de campo para cada replicata (temperatura da água, pH, condutividade, entre outros);
 - 3.7.7.6. Observações de campo;
 - 3.7.7.6.1. No item “Observações de campo” deve se anotar toda informação relevante que ocorreu durante a coleta que pode influenciar nos resultados de análise das amostras. Como exemplos pode se citar: presença de ventos fortes, aparência e cor da água amostrada (água fica suja após chuvas, etc.), presença de tráfego intenso (se o ponto estiver próximo a rodovias ou vias), eventuais problemas com os equipamentos, entre várias outras observações. Resultados de difícil interpretação podem ser melhor analisados tendo o conhecimento desses aspectos da coleta das amostras.
- 3.7.8.** Deve existir também um formulário para controle de temperatura da caixa de gelo maior, na qual serão acondicionados os frascos de coleta após a amostragem. Nesse formulário devem constar:
- 3.7.8.1. Nome do programa de amostragem;
 - 3.7.8.2. Nome do técnico que monitorou a temperatura;
 - 3.7.8.3. Data e hora de cada medição.

3.8. Procedimentos de armazenamento no laboratório e preparação para análise

Research in Quality Assurance for Laboratories Instituto de Química de São Carlos (IQSC) Universidade de São Paulo (USP)
POP-RQA-011	Procedimento Operacional Padrão Amostragem	Data Efetiva 06/01/2015

3.8.1. Na chegada ao laboratório, os frascos devem ser acondicionados em refrigerador a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$. De forma alguma devem ser acondicionados junto aos padrões analíticos e outros compostos voláteis. A validade das amostras é de duas (2) semanas após a coleta. Antes da análise, a amostra deve ser retirada do refrigerador e ficar a temperatura ambiente antes de ser filtrada. Após a filtragem a amostra pode ser analisada pelo método escolhido.

3.9. Procedimento para Controle de Qualidade

3.9.1. Os brancos de lavagem de frascaria devem ter seus resultados abaixo do limite de quantificação do método.

3.9.2. Os brancos de campo, de transporte e contaminação cruzada devem ter seus resultados no limite de 30% da área do pico do composto detectado.

4. Responsáveis

Ricardo dos Santos Camargo
Elaborador e Revisor

Igor Renato Bertoni Olivares
Aprovação

Quality management system for application of the analytical quality assurance cycle in a research project

R S Camargo and I R B Olivares

Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador São Carlsense, 400 CP 780, São Carlos, SP CEP 13560-970, Brazil

igorolivares@iqsc.usp.br

Abstract. The lack of quality assurance and quality control in academic activities have been recognized by the inability to demonstrate reproducibility. This paper aim to apply a quality tool called Analytical Quality Assurance Cycle on a specific research project, supported by a Verification Programme of equipment and an adapted Quality Management System based on international standards, to provide traceability to the data generated.