



Branco da amostra

Refere-se à análise de um branco da matriz de amostra isenta dos analitos de interesse que deve ser processada a cada batelada de amostras. É utilizado para avaliar a presença de contaminantes.

Se o resultado do branco de reagentes for inferior ao LD nenhuma ação é requerida.

Se o resultado for maior do que o LD e os resultados das amostras forem maiores do que o LQ pode ser necessário advertir que o analito foi detectado em baixa concentração no branco de reagentes.

Se o resultado for maior do que o LQ, ações corretivas devem ser tomadas.

Matriz da amostra fortificada e Duplicata de matriz da amostra fortificada

A matriz de amostra fortificada é uma porção da amostra na qual se adiciona uma quantidade conhecida de analito de interesse (Ex.: 10 vezes o LD ou o ponto médio da curva de calibração), antes da preparação da amostra. A matriz de amostra fortificada é usada para avaliar a recuperação do analito na matriz. Incluir uma matriz fortificada no início de cada batelada de amostras analisadas ou na base de 5% do total de amostras. Lançar o resultado na **Carta Controle de Recuperação** e na **Carta Controle de Duplicata**.

Curva de calibração

A curva de calibração é representação gráfica da relação entre a concentração de analito com a resposta do equipamento. A manutenção de um histórico de curva, auxilia na avaliação em longo prazo da performance do laboratório.

Padrão analítico contendo os analitos de interesse (ponto da curva de calibração)

É o primeiro procedimento de controle que deve ser realizado, sendo este determinante para o seguimento da análise das amostras. Antes de analisar a batelada de amostras, o operador deve verificar se o método empregado está dentro de condições adequadas, através da análise de um dos pontos da curva de calibração. Lançar o resultado na **Carta Controle de Médias** e só dar prosseguimento nas análises, se o resultado estiver dentro do intervalo de aceitação definida na carta.

Padrão de verificação (2º padrão – lote ou fabricante diferente)

É um padrão usado para verificar o padrão utilizado no preparo da curva de calibração. Deve ser de origem diferente. Lançar o resultado na **Carta Controle de Médias**.

Outros conceitos importantes

Padrão interno

Utiliza-se padrão interno nas análises de cromatografia. Um padrão interno é um analito adicionado no padrão e também nas amostras já processadas, momentos antes da análise. Servem para monitorar os tempos de retenção, calcular respostas relativas e quantificar os analitos presentes na amostra.

Surrogates e traçadores

Surrogates são utilizados em análises orgânicas e traçadores são usados em análises radioquímicas. São empregados para avaliar a performance do método em cada amostra. São adicionados nas amostras antes dos processos de extração e servem para avaliar a eficiência da extração e a porcentagem de recuperação de cada amostra. Se os resultados estiverem fora de controle tomar ações corretivas incluindo nova extração e análise. Lançar o resultado na carta controle de recuperação.

5.1.2. Limites de detecção e de quantificação

Determinar o limite de detecção do método (LD) para cada analito utilizando o procedimento descrito em 5.1.3.1. Recalcular o LD quando alterar alguma etapa do método.

Relatar os resultados da análise de acordo com a Tabela 2.

**Tabela 2:** Formas para relatar os resultados de análise.

Relatórios/Laudos que apresentam LD	Relatórios/Laudos que apresentam LQ
<ul style="list-style-type: none"> • Valores iguais ou menores que zero, relatar ND (não detectado); • Valores abaixo do LD, relatar ND; 	<ul style="list-style-type: none"> • Valores iguais ou menores que zero, relatar ND (não detectado); • Valores abaixo do LQ, relatar < LQ; • Valores iguais ou acima do LQ, relatar o valor.

5.1.2.1. Determinação dos limites de detecção e do limite de quantificação

O assunto Limites de Detecção é controverso principalmente devido a confusão gerada pela inadequada definição dos termos. Neste POP foram adotados os conceitos definidos no Standard Methods 21th Ed. (2005). A relação entre os limites pode ser definida aproximadamente como:

$$\text{LDE} : \text{MinLD} : \text{LD} : \text{LQ} = 1 : 2 : 4 : 10$$

Limite de detecção do equipamento (LDE)

É a concentração do analito numa solução padrão que gera um sinal 3 vezes maior do que a média do ruído do aparelho, ou a concentração que gera um sinal cinco vezes maior do que a taxa sinal x ruído. É útil para estimar a concentração de analito necessária para produzir um sinal que permita calcular o limite de detecção do método.

Menor limite de detecção (MinLD)

O menor limite de detecção é a menor concentração onde 99% das leituras geram um sinal detectável. É determinado por múltiplas injeções de uma solução padrão próximo a zero (Ex.: concentração da solução 5 vezes maior que o LDE). Calcular o desvio padrão dos resultados e multiplicar pelo valor da probabilidade normal 1,645 (para reduzir a 5% a probabilidade de erro tipo I – Falso negativo) ou por 3,290 (para reduzir a 5% também a probabilidade de erro tipo II – Falso detecção).

$$\text{MinLD} = \text{desvio padrão} \times 1,645 \quad \text{ou} \quad \text{MinLD} = \text{desvio padrão} \times 3,290$$

Ex.: Desvio padrão da amostra de 20 leituras = 0,1 mg/L

$$\text{MinLD} = 0,1 \times 3,290 = 0,33 \text{ mg/L}$$

Limite de detecção do método (LD ou LOD)

O Limite de detecção do método difere do MinLD pelo fato que as soluções contendo o constituinte de interesse são processadas da mesma forma que as amostras. O LD é maior que o MinLD devido a diferença nas eficiências de extração e fatores de concentração ao longo do tempo.

$$\text{LD} = \text{desvio padrão} \times t_{(C,v)}$$

Onde: C é o nível de confiança em %;

v é o n° de graus de liberdade, dado pela expressão $v = n - 1$.

Ex.: Preparar 7 soluções, processar e analisar em 3 dias diferentes. O valor encontrado para cada réplica deve estar entre 1 e 5 vezes o LD estimado. Calcular o desvio padrão e a partir desse o LD, utilizando a tabela de valores críticos da distribuição da função *t* de Student (Anexo I):

$$\text{Para } n = 7 \Rightarrow v = 6$$

$$\text{Para } C = 99\% \text{ e } v = 6 \Rightarrow t_{(99\%, n-1=6)} = 3,71$$

Se o desvio padrão for 0,1 mg/L, então o LD = $0,1 \times 3,71 = 0,37 \text{ mg/L}$



Limite de quantificação (LQ ou LOQ)

O limite de quantificação é o menor valor que pode ser quantificado com segurança. Ele pode coincidir com o LD em alguns casos e geralmente é definido pela menor concentração da curva de calibração do método. A forma de cálculo depende do tipo de método analítico:

a) *Para Análise de Metais por Espectrofotometria de Absorção Atômica ou por Espectrofotometria de Emissão Atômica:*

Determinar o desvio padrão de "n" leituras de uma solução de baixa concentração. Calcular o LQ utilizando uma das expressões conforme segue:

$$\text{LQ} = \text{desvio padrão} \times 10$$

ou

$$\text{LQ} = \text{LD} \times 2,5$$

b) *Para Análise de Compostos Orgânicos por Cromatografia:*

Determinar o desvio padrão de "n" leituras de uma solução de baixa concentração. Calcular o LQ utilizando uma das equações a seguir:

$$\text{LQ} = \text{Ruído do Equipamento} \times 10$$

ou

$$\text{LQ} = \text{LD} \times 4$$

ou

$$\text{LQ} = \text{desvio padrão} \times 10$$

c) *Para Análise de Compostos Radiomarcados por Contagem de Cintilação Líquida:*

Calcular o LD e o LQ, utilizando as seguintes expressões:

$$\text{LD} = \text{Ruído do Equipamento} \times 2$$

$$\text{LQ} = \text{Ruído do Equipamento} \times 3$$

5.1.2.2. Frequência de determinação dos limites

Os limites de detecção e quantificação devem ser calculados uma vez por ano e comparados com os limites de anos anteriores.

Esses limites, entretanto, podem ser calculados periodicamente. Isto pode ser facilmente realizado se tomarmos por base os valores das cartas controles de médias (ver item 5.1.5) de onde podem ser extraídos os desvios padrão de períodos definidos.

5.1.3. Recuperação

A recuperação é dada pela relação entre a quantidade do componente de interesse analisado e a quantidade teórica (esperada) na amostra. Pode ser avaliada a partir da determinação do analito na matriz de amostra fortificada, conforme item 5.1.2., e calculada pela expressão a seguir:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Concentração medida}}{\text{Nível de fortificação}} \times 100$$



Fração de massa	Faixa de aceitação	Exemplo
$\leq 1 \mu\text{g/kg}$	-50% a + 20%	Nível de fortificação = 0,8 $\mu\text{g/kg}$ Faixa de aceitação = 0,40 a 0,96 $\mu\text{g/kg}$
$> 1 \mu\text{g/kg}$ a 10 $\mu\text{g/kg}$	-30% a +10%	Nível de fortificação = 2,8 $\mu\text{g/kg}$ Faixa de aceitação = 1,96 a 3,08 $\mu\text{g/kg}$
$\geq 10 \mu\text{g/kg}$	-20% a +10%	Nível de fortificação = 14,4 $\mu\text{g/kg}$ Faixa de aceitação = 11,5 a 15,8 $\mu\text{g/kg}$

5.1.4. Calibração

Calibração do equipamento

A Bioensaios possui um programa de manutenção, verificação e calibração dos equipamentos. A frequência da manutenção, verificação e calibração devem seguir o que estiver especificado no POP do equipamento. As calibrações devem ser realizadas por empresas da Rede Brasileira de Calibração (RBC). Se o serviço necessário não estiver disponível na RBC, a verificação deve ser executada pelo fabricante ou por seu autorizado.

Calibração inicial

Realizar a curva de calibração com no mínimo três soluções padrão para curvas lineares ou cinco soluções para curvas não lineares. Escolher soluções com não mais do que uma ordem de magnitude entre elas. Escolher uma faixa que compreenda os resultados esperados para as amostras.

Verificação da curva de calibração

É um procedimento usado para verificar a manutenção das condições de análise após um período prolongado. Analisar um ponto da curva de calibração (preferencialmente o ponto médio) na frequência estabelecida no POP do ensaio; na falta de uma especificação, analisar o ponto médio da curva de calibração após 20 leituras ou no mínimo a cada 12 horas.

5.1.5. Cartas controle

Basicamente três tipos de cartas controle que podem ser empregadas para visualizar o histórico do processo de análise;

- Carta controle de médias: branco de reagentes, branco fortificado, padrões de verificação de calibração.
- Carta controle de recuperação: matriz da amostra fortificada, *surrogates* e traçadores.
- Carta controle de duplicatas: duplicata de matriz da amostra fortificada, duplicata de amostra.

5.1.6. Análise das cartas controle

Na carta controle de desvios padrão é permitido que 1 resultado em 20 apresente valor superior a 2s (95 % de confiança) e um valor em 100 apresente resultado superior a 3s (confiança de 99%).

Com base nestes parâmetros estatísticos as seguintes condições devem ser adotadas para tomada de ações.

*Limite de controle – Se um resultado for superior a um 3s, repita a análise imediatamente. Se o resultado for inferior a 3s continuar as determinações se for superior a análise deve ser interrompida e o problema corrigido.



*Limite de aviso – Se dois de três resultados consecutivos excedem 2s, repita a análise imediatamente. Se o resultado for inferior a 2s continuar as determinações se for superior avaliar possíveis tendências e corrigir o problema.

*Desvio Padrão – Se quatro de cinco resultados consecutivos excedem 1s, ou estejam em ordem crescente ou decrescente, repita a análise. Se o resultado for inferior a 1s ou inverter a ordem continuar as determinações caso contrario interromper a análise e corrigir o problema.

*Tendência – Se sete resultados sucessivos estão do mesmo lado da linha central (média), interromper as análises e corrigir o problema.

As considerações acima se aplicam quando as condições são as seguintes: resultados acima ou abaixo da média, mas não em ambos os lados, por exemplo, quatro de cinco resultados devem exceder a +1s ou -1s. Depois de corrigir o problema, as amostras contidas no lote fora de controle devem ser re-analisadas.

5.2. Avaliação da Qualidade (QA)

A avaliação da qualidade analítica é o processo usado para garantir que o controle de qualidade está sendo executado conforme previsto. Inclui amostras de verificação (proficiência interna), comparação interlaboratorial e auditorias de desempenho.

Amostras de verificação (proficiência interna)

Amostras de verificação com quantidades conhecidas de analitos, obtidas de fonte externa, ou preparadas internamente de maneira independente devem ser analisadas periodicamente para determinar a recuperação. O resultado deve ser relacionado ao analista que executou a análise e interpretado com base na faixa esperada de recuperação do método. Por exemplo, se a faixa esperada de recuperação é 85% a 115%, os resultados devem estar dentro desses limites.

Comparação interlaboratorial (ensaios de proficiência)

A Bioensaios deve participar de ensaios de proficiência para comparação periódica de sua performance relativa a outros laboratórios. Se o resultado do ensaio demonstrar que o resultado está fora do aceitável, examinar o procedimento de análise, corrigir falhas ou melhorar pontos fracos e intensificar a análise de amostras controle interna até que o resultado seja aceitável.

Auditorias de conformidade

Auditorias devem ser realizadas para verificar se os POPs ou os métodos estão sendo seguidos e se os resultados do controle de qualidade estão sendo analisados. As auditorias devem ser registradas e ações corretivas devem ser tomadas, quando necessário.

6. REGISTRO DE DADOS

Todos os dados gerados devem ser registrados em planilhas ou em livros de forma que permitam uma rápida recuperação das informações, sendo arquivados conforme POP-02.03. BIOENSAIOS.

7. HISTÓRICO DE REVISÕES

Versão	Data	Nº página	Síntese da alteração
00	06/12/05	---	Elaboração do documento
01	15/03/06	---	-
02	04/08/06	---	-
03	27/03/07	---	-
04	23/04/09	---	-
05	23/04/13	1 a 8	Alteração no sumário, itens 2, 3, 5.1 e inclusão do item 5.1.6 e Histórico de revisões.



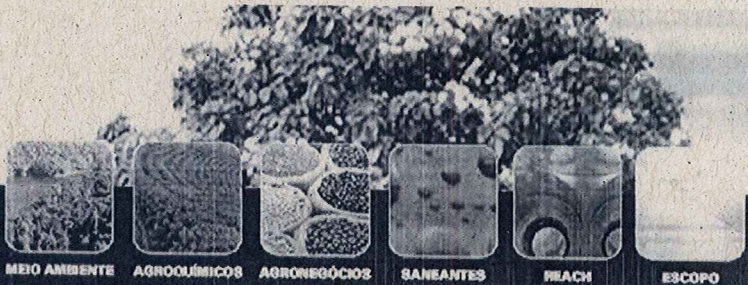
ANEXO I

Valores críticos da distribuição da função t de Student

n	n-1	Fator t	
		Confiança 95%	Confiança 99%
2	1	12,71	63,66
3	2	4,30	9,93
4	3	3,18	5,84
5	4	2,78	4,60
6	5	2,57	4,03
7	6	2,45	3,71
8	7	2,36	3,50
9	8	2,31	3,36
10	9	2,26	3,25
11	10	2,23	3,17
12	11	2,20	3,10
13	12	2,18	3,06
14	13	2,16	3,01
15	14	2,15	2,98
16	15	2,13 *	2,96 *
17	16	2,12 *	2,93 *
18	17	2,11 *	2,91 *
19	18	2,10 *	2,88 *
20	19	2,09	2,86
∞	∞	1,96	2,58

Fonte: DUX, 1990.

* Valores estimados a partir dos dados de $n=15$ e $n=20$.



BIOENSAIOS Análise e Consultoria Ambiental.
 Rua Palermo, 257 - Viamão - RS - Brasil - CEP 94480-775
 Fone: (51) 3493.6888 - Fax: (51) 3493.6885

BI-037/13

Viamão, 02 de Julho de 2013.

Comunicação

Aos Gerentes de setores,

Comunico que o procedimento POP-05.169 BIOENSAIOS "Garantia da Qualidade Analítica" foi revisado visando atender as NCs nº 25 e 28 evidenciadas na reavaliação do INMETRO segundo a norma ISO/IEC 17025 (março/2013). A nova versão (POP-05.169/05) visa apresentar conceitos das ferramentas que usamos como controle de qualidade nos ensaios de laboratório.

Solicito verificar a nova versão e dar ciência abaixo.

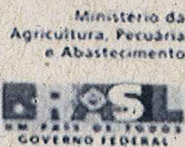
Atenciosamente,

[Assinatura]
 Vinícius Praia Carvalho

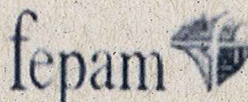
Nome	Setor	Assinatura	Data
Andrea Ferreira Machado	SQO-AGRO e SQO-RC	<i>[Assinatura]</i>	02/07/13
Everton Melo dos Santos	SFQ e SDT	<i>[Assinatura]</i>	02/07/13
Gisele de Azevedo Kimieciki	SA	<i>[Assinatura]</i>	02/07/13
Helena Campos Rolla	SM, SG e ST	<i>[Assinatura]</i>	02/07/13
Elisangela Patrícia Bender	SE	<i>[Assinatura]</i>	03/07/13



REBLAS021



Portaria 36 e 37 de 04/06/03
 Portaria 113 de 22/10/07



09/2013-DL



6201
 6202