



Ministério da
Ciência e Tecnologia



sid.inpe.br/mtc-m19/2011/06.03.13.48-NTC

**VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS DO
LABORATÓRIO DE AEROSSÓIS, SOLUÇÕES
AQUOSAS E TECNOLOGIAS - LAQUATEC**

Maria Cristina Forti
Roberta Lee Maciviero Alcaide

URL do documento original:
<<http://urlib.net/8JMKD3MGP7W/39QJ7P2>>

INPE
São José dos Campos
2011

PUBLICADO POR:

Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais - INPE

Gabinete do Diretor (GB)

Serviço de Informação e Documentação (SID)

Caixa Postal 515 - CEP 12.245-970

São José dos Campos - SP - Brasil

Tel.:(012) 3208-6923/6921

Fax: (012) 3208-6919

E-mail: pubtc@sid.inpe.br

CONSELHO DE EDITORAÇÃO E PRESERVAÇÃO DA PRODUÇÃO INTELLECTUAL DO INPE (RE/DIR-204):**Presidente:**

Dr. Gerald Jean Francis Banon - Coordenação Observação da Terra (OBT)

Membros:

Dr^a Inez Staciarini Batista - Coordenação Ciências Espaciais e Atmosféricas (CEA)

Dr^a Maria do Carmo de Andrade Nono - Conselho de Pós-Graduação

Dr^a Regina Célia dos Santos Alvalá - Centro de Ciência do Sistema Terrestre (CST)

Marciana Leite Ribeiro - Serviço de Informação e Documentação (SID)

Dr. Ralf Gielow - Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos (CPT)

Dr. Wilson Yamaguti - Coordenação Engenharia e Tecnologia Espacial (ETE)

Dr. Horácio Hideki Yanasse - Centro de Tecnologias Especiais (CTE)

BIBLIOTECA DIGITAL:

Dr. Gerald Jean Francis Banon - Coordenação de Observação da Terra (OBT)

Marciana Leite Ribeiro - Serviço de Informação e Documentação (SID)

Deicy Farabello - Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos (CPT)

REVISÃO E NORMALIZAÇÃO DOCUMENTÁRIA:

Marciana Leite Ribeiro - Serviço de Informação e Documentação (SID)

Yolanda Ribeiro da Silva Souza - Serviço de Informação e Documentação (SID)

EDITORAÇÃO ELETRÔNICA:

Vivéca Sant´Ana Lemos - Serviço de Informação e Documentação (SID)



Ministério da
Ciência e Tecnologia



sid.inpe.br/mtc-m19/2011/06.03.13.48-NTC

**VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS DO
LABORATÓRIO DE AEROSSÓIS, SOLUÇÕES
AQUOSAS E TECNOLOGIAS - LAQUATEC**

Maria Cristina Forti
Roberta Lee Maciviero Alcaide

URL do documento original:
<<http://urlib.net/8JMKD3MGP7W/39QJ7P2>>

INPE
São José dos Campos
2011

RESUMO

A Coordenação de Ciência do Sistema Terrestre do INPE, visando a consolidação de uma linha de pesquisa em Biogeoquímica Ambiental, implantou, a partir de 2010, facilidades para análise e preparação de amostras ambientais e desenvolvimento de tecnologias afins, o Laboratório de Aerossóis, Soluções Aquosas e Tecnologias. Este laboratório foi implantado para dar suporte, prioritariamente, às pesquisas relacionadas aos temas: Química da atmosfera, Transferências de espécies químicas nas Interfaces de Ecossistemas, Estudos da qualidade de corpos de água interiores e costeiros e Tecnologias Ambientais bem como deposição e emissão de espécies químicas em diferentes escalas geográficas e ambientes. O objetivo deste documento é estabelecer e uniformizar as normas para validação de todos os métodos analíticos a serem criados e/ou adaptados no Laboratório de Aerossóis, Soluções Aquosas e Tecnologias.

VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS - LABORATORY AEROSOLS, AQUEOUS SOLUTIONS AND TECHNOLOGIES - LAQUATEC

ABSTRACT

The Earth System Science Center at the National Institute for Space Research, aiming the consolidation of the Environmental Biogeochemistry research line, since 2010 is implementing laboratory facilities for environmental samples preparation and analysis and development of related technologies, the Laboratory of Aerosols, Aqueous Solutions and Technologies. This laboratory was deployed to support prioritarily the researches on themes related to: atmospheric chemistry, chemical species transfers through ecosystem interfaces, studies on continental and coastal water bodies quality, chemical species emission and deposition at different geographical scales as well as environmental technologies. The purpose of this document is to establish and standardize the validation procedures for all analytical methods to be developed and/or modified on the Laboratory of Aerosol Aqueous Solutions and Technologies premises.

LISTA DE FIGURAS

	<u>Pág.</u>
Figura 2.1 - Cromatogramas para cada concentração de solução padrão – (a) Padrão 1; (b) Padrão 2; (c) Padrão 3; (d) Padrão 4; (e) Padrão 5; (f): Padrão 6 e (g): Padrão 7.	8
Figura 2.2 – Gráficos com as comparações entre os coeficientes angulares das regressões obtidas a partir das injeções dos padrões 2 e 3.	10
Figura 3.1 – Resultado da curva de calibração para o fluoreto, gerado pelo software Magic Net IC.	13
Figura 3.2 – Resultado da curva de calibração para o cloreto, gerado pelo software Magic Net IC.	13
Figura 3.3 - Resultado da curva de calibração para o nitrato, gerado pelo software Magic Net IC.	14
Figura 3.4 - Resultado da curva de calibração para o sulfato, gerado pelo software Magic Net IC.	14
Figura 3.5 – Resultado das injeções em função das concentrações de cada analito e suas respectivas regressões lineares.	15
Figura 4.1 – Distribuição de Gauss (Baccan, 2000)	17
Figura 8.1 - Processo de fortificação de amostras.	25

LISTA DE TABELAS

	<u>Pág.</u>
Tabela 2.1 – Parâmetros de validação conforme o tipo de análise	4
Tabela 2.2 - Concentrações ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) das soluções padrão de ânions para calibração do método Ânions 1 no IC.	6
Tabela 2.3 - Média das concentrações ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) das injeções em triplicata.	7
Tabela 2.4 – Regressões Lineares para teste de seletividade.....	10
Tabela 3.1 - Coeficientes de correlação e regressão linear para cada analito.	15
Tabela 4.1 – Cálculo dos Limites e Intervalos de confiança (%).	18
Tabela 4.2 - Intervalo de confiança para significância de 95%, para cada padrão, em relação a cada analito.....	18
Tabela 5.1 - Valores de sensibilidade para cada analito ($\mu\text{S.cm}^{-1}.\text{min}/(\mu\text{mol.L}^{-1})$).	19
Tabela 6.1 - Cálculo do desvio padrão e do Limite de Detecção ($\mu\text{mol.L}^{-1}$).	21
Tabela 7.1 - Cálculo do limite de quantificação ($\mu\text{mol.L}^{-1}$).....	22
Tabela 8.1 – Valores de Exatidão (%) do método para o método Ânions 1	24
Tabela 9.1 - Cálculo do DPR (%) para verificação da precisão do método, para o método Ânions 1.....	28
Tabela 9.2 - Cálculo do limite de repetitividade.....	29
Tabela 10.1 – Determinação da robustez do método analítico.	32

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCST	Coordenação de Ciências do Sistema Terrestre
CMD	Concentração Média Determinada
CV	Coefficiente de Variação
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
IC	Cromatografia iônica
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
INPE	Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
ISO	International Organization for Standardization
LAQUATEC	Laboratório de Aerossóis, Soluções Aquosas e Tecnologias
LDE	Limite de detecção do Equipamento
LDM	Limite de Detecção do Método
LQ	Limite de Quantificação
MRC	Materiais de Referência ou Certificados
R	Coefficiente de Correlação Linear
r	Limite de Repetitividade
R	Limite de Reprodutibilidade
S_A	Variância do Método A
S_B	Variância do Método B
S_r	Desvio Padrão de Repetitividade
S_R	Desvio Padrão de Reprodutibilidade
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

μ	Valor Médio
σ	Desvio Padrão
μL	Volume (micro litros)
$\mu\text{mol.L}^{-1}$	Concentração, micro molar
$^{\circ}\text{C}$	Temperatura, graus Celsius
mM	Concentração, mili molar
MPa	Pressão, mega Pascal

SUMÁRIO

	<u>Pág.</u>
1	Considerações gerais 1
2	Parâmetros de Validação..... 4
2.1.	Especificidade e Seletividade 5
2.1.1.	Testes de Especificidade..... 5
2.1.2.	Testes de Seletividade 8
3	Linearidade, Função da Resposta ou Curva de Calibração..... 11
4	Intervalo de Trabalho 16
4.1.	Erros indeterminados 16
5	Sensibilidade..... 19
6	Limite de Detecção 20
7	Limite de Quantificação..... 22
8	Exatidão e Tendência 23
8.1.	Materiais de Referência ou Certificados (MRC) 24
8.2.	Recuperação 25
9	Precisão 27
9.1.	Repetitividade..... 28
9.1.1.	Limite de Repetitividade – “r” 28
9.2.	Reprodutibilidade..... 29
9.2.1.	Limite de Reprodutibilidade – “R” 30
9.3.	Precisão Intermediária..... 30
9.4.	Comparação da Precisão entre métodos 31
10	Robustez..... 32
11	Documentação de Métodos Validados..... 33
	Referências Bibliográficas 34
	Anexo 1 36

1 Considerações gerais

As empresas, universidades e institutos de pesquisas bem como órgãos reguladores no Brasil e de outros países exigem, cada vez mais, a validação de metodologias analíticas e, para tanto, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais com diretrizes a serem adotadas no processo de validação.

O desenvolvimento destas metodologias analíticas, bem como a implantação das mesmas, exige um processo de avaliação que estime sua eficiência. Esse processo é denominado validação.

A literatura dispõe de vários trabalhos que relatam a validação de métodos analíticos. Algumas definições sobre validação podem ser encontradas, dentre elas (Perez, 2010):

“A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências analíticas, assegurando confiabilidade dos resultados.”
ANVISA (ANVISA, 2003)

“Validação é o processo de definir uma exigência analítica e confirmar que o método sob investigação tem capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer.” (*Eurachem Working Group*, 2005).

“Confirmação por testes e apresentação de evidências objetivas de que determinados requisitos são preenchidos para um dado uso intencional.”
ISO/IEC17025 (ABNT, 2003).

A validação de métodos assegura a credibilidade destes durante o uso rotineiro, sendo algumas vezes mencionado como “o processo que fornece

uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado para fazer” (USP).

“Avaliação sistemática de um procedimento analítico para demonstrar que está sob as condições nas quais deve ser aplicado” (WHO).

Portanto, a validação deve garantir, através de avaliações experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, com confiabilidade, comparabilidade e rastreabilidade nos resultados.

Existem dois tipos de validação: a validação laboratorial, que consiste nas etapas de validação dentro de um único laboratório e é utilizada nas etapas preliminares do desenvolvimento de um método e na publicação de artigos para revistas científicas, sem a verificação da reprodutibilidade; a validação completa envolve todas as características de desempenho e estudo interlaboratorial.

Neste documento foi considerada somente a validação laboratorial no Laboratório de Aerossóis, Soluções Aquosas e Tecnologias - LAQUATEC, validando métodos não normalizados, desenvolvidos pelo próprio laboratório ou para métodos normalizados usados fora do objetivo para o qual foram desenvolvidos.

Segundo o INMETRO (2010), depois de cumpridas todas as etapas de validação, é apropriado elaborar um procedimento operacional para que o método possa ser implantado de maneira clara e sem ambigüidades. A elaboração destes procedimentos operacionais é também uma das atribuições do LAQUATEC.

Para alcançar as exigências de uma validação é necessário que o método apresente os parâmetros adequados à análise como: especificidade,

linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de qualificação e exatidão. Material de referência e/ou padrões de trabalho (para os quais a identidade e o teor sejam comprovados) também deve ser utilizada durante a validação desses métodos.

A seguir são apresentados os detalhes destes parâmetros de validação.

2 Parâmetros de Validação

O método será considerado validado desde que sejam avaliados os parâmetros relacionados a seguir:

- Especificidade e Seletividade
- Linearidade
- Intervalo de trabalho
- Precisão
- Limite de detecção (sensibilidade)
- Limite de qualificação
- Exatidão
- Robustez

Dependendo do tipo de análise, os parâmetros a serem calculados, durante o processo de validação, podem variar de acordo com o tipo de ensaio como mostrado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Parâmetros de validação conforme o tipo de análise

Parâmetros	Tipo de Ensaio			
	Qualitativo	Determinação do Componente Principal	Análise de espécies Traço	Propriedades Físicas
Precisão		✓	✓	✓
Estabilidade/Seletividade	✓	✓	✓	✓
Tendência e Recuperação		✓	✓	✓
Robustez	✓	✓	✓	✓
Sensibilidade/Linearidade e Intervalo de Trabalho		✓	✓	✓
Limite de detecção	✓		✓	
Limite de Quantificação			✓	

Fonte: *In-House Method Validation – A guide for Chemical Laboratories* LGC/VAM, 2003.

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

2.1. Especificidade e Seletividade

Geralmente, uma amostra consiste dos analitos a serem quantificados e de outros componentes que podem provocar efeito na medição, mas que não se quer quantificar.

A especificidade e a seletividade estão relacionadas ao evento da detecção. Método específico é aquele que produz resposta para apenas um analito em meio de outros componentes, enquanto que um método seletivo produz respostas para vários analitos, distinguindo-os uns dos outros além de quantificá-los.

2.1.1. Testes de Especificidade

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

Como exemplo, para técnicas cromatográficas, além das comparações visuais de cromatogramas, diferentes parâmetros devem ser calculados nos cromatogramas para descrever a especificidade do método. Os parâmetros mais importantes são: resolução, retenção relativa (fator de separação), fator de capacidade (fator de retenção), fator de simetria e número de pratos teóricos. (Eith, 2006).

Para exemplificação dos parâmetros de validação, os parâmetros serão calculados para o método Ânions 1, utilizado no LAQUATEC para a quantificação de ânions presentes em soluções aquosas por Cromatografia Iônica (IC)

Para a construção da curva de calibração feita para um volume de injeção de 110,67 µL (método Ânions 1), foi preparada uma solução composta (contendo todos os ânions de interesse), com valor de concentração mais alto, e a partir desta foram feitas diluições, totalizando sete padrões de concentrações diferentes (incluindo a água purificada tipo II, padrão 1). Na Tabela 2.2 são apresentados os valores teóricos para as concentrações de cada analito a ser pesquisado.

Tabela 2.2 - Concentrações ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) das soluções padrão de ânions para calibração do método Ânions 1 no IC.

Concentração Média ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)				
Padrões	Fluoreto	Cloreto	Nitrato	Sulfato
1	0	0	0	0
2	1,05	1,13	0,645	0,625
3	2,63	2,82	1,61	1,56
4	5,26	5,63	3,23	3,12
5	10,5	11,3	6,45	6,25
6	21,1	22,5	12,9	12,5
7	52,6	56,3	32,3	31,2

As injeções das sete soluções padrão foram analisadas no Cromatógrafo Iônico *850 Professional IC*, da Metrohm, com três repetições para cada solução padrão.

As características de operação do equipamento durante a injeção dos padrões foram:

- Volume de injeção 110,67 µL;
- Canal: Condutividade;
- Tempo de análise: 11 minutos;

- Integração: Automática;
- Tipo de Coluna: *Metrosep A Supp 5 100/4.0*;
- Composição do Eluente: 3,2 mM de Na₂CO₃; 1,0 mM de NaHCO₃
- Fluxo: 0,700 ml.min⁻¹;
- Pressão: 5,18 MPa;
- Temperatura: 25,5 °C.

Na Tabela 2.3 são apresentados os valores das concentrações médias, adquiridas das injeções em triplicata para cada solução padrão dos analitos.

Tabela 2.3 - Média das concentrações ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) das injeções em triplicata.

Concentração Média ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)				
Padrões	Fluoreto	Cloreto	Nitrato	Sulfato
1	0	0	0	0
2	1,09	1,45	0,584	0,756
3	2,72	3,40	1,77	1,62
4	5,31	5,92	3,52	3,49
5	10,4	10,8	6,28	6,04
6	20,8	21,3	12,5	11,9
7	52,7	56,9	32,4	31,4

Na Figura 2.1 são apresentados os cromatogramas para cada valor de concentração dos padrões. Observa-se que os picos para cada analito têm o mesmo valor de tempo de retenção para valores de concentração de padrões diferentes, comprovando visualmente a especificidade do método.

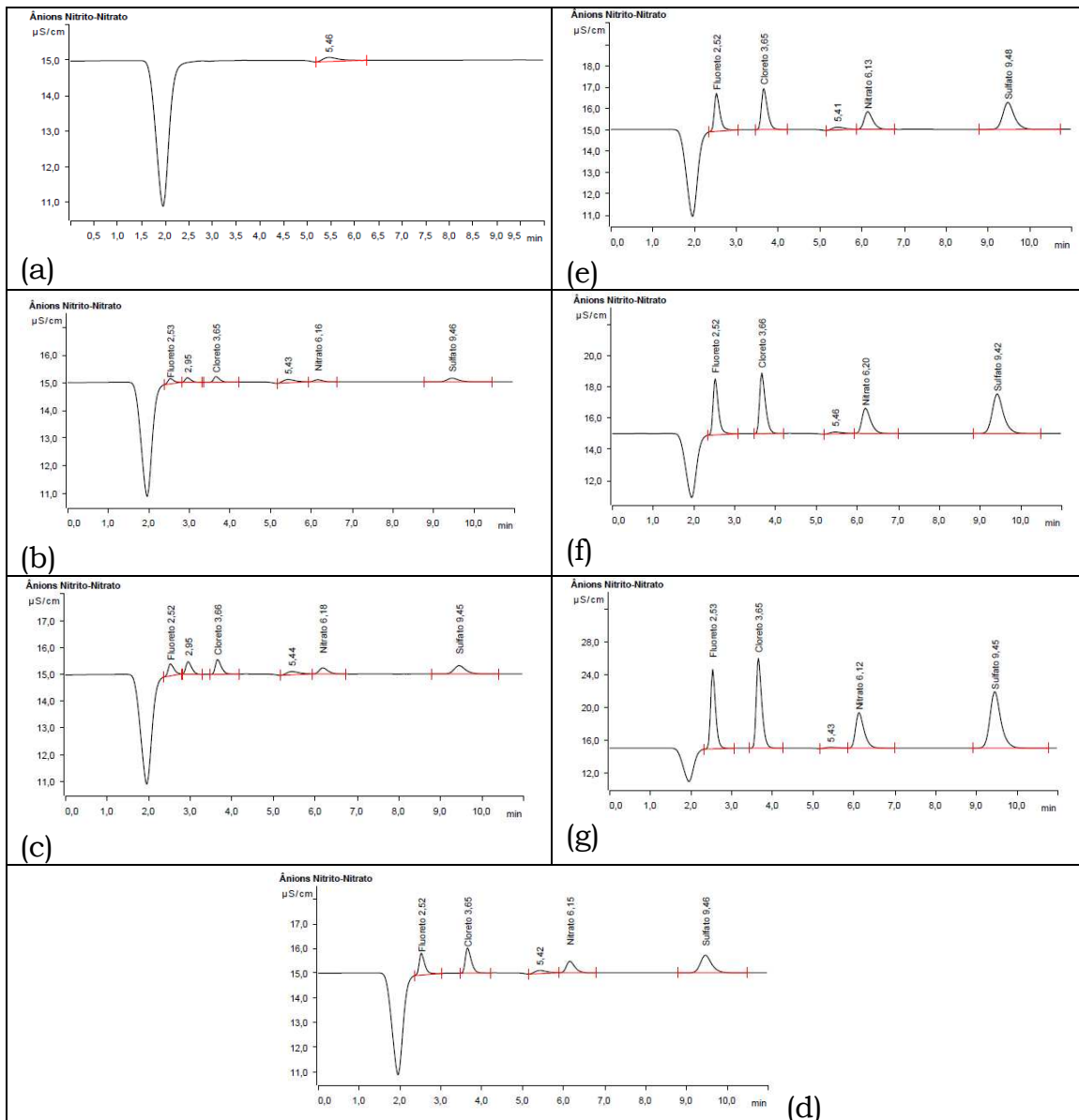


Figura 2.1 - Cromatogramas para cada concentração de solução padrão de – (a) Padrão 1; (b) Padrão 2; (c) Padrão 3; (d) Padrão 4; (e) Padrão 5; (f): Padrão 6 e (g): Padrão 7.

2.1.2. Testes de Seletividade

Existem casos em que a matriz da amostra pode ter componentes que interferem no desempenho do detector selecionado, porém sem causar um sinal visível no teste de especificidade.

A seletividade pode ser testada comparando-se os coeficientes angulares das curvas de adição padrão. Isto é feito a partir de dois grupos de amostras com a mesma adição de analito para cada nível de concentração. Um grupo inclui a matriz da amostra (contendo um nível básico do analito) e o outro grupo não inclui a matriz de amostra. Se os coeficientes angulares destas duas curvas de regressão linear forem os mesmos, o único efeito de matriz presente é a interferência natural causada pelo nível básico do analito.

Em relação ao método Ânions 1, cuja matriz não possui detecção da concentração dos analitos a serem pesquisados, uma vez que é a própria água pura tipo II, serão comparados os coeficientes angulares das regressões obtidas a partir das injeções dos padrões 2 e 3 de concentração de cada analito, como mostrado nos gráficos da Figura 2.2. Na Tabela 2.4 são apresentados os coeficientes angulares das curvas de adição padrão, para cada nível de cada analito.

Através da análise da Figura 2.2 e dos coeficientes angulares apresentados na Tabela 2.4, verifica-se que os coeficientes angulares destas duas curvas de regressão linear são os mesmos, tendo como único efeito de matriz a interferência natural causada pelo nível básico do analito, o que demonstra a seletividade do método Ânions 1.

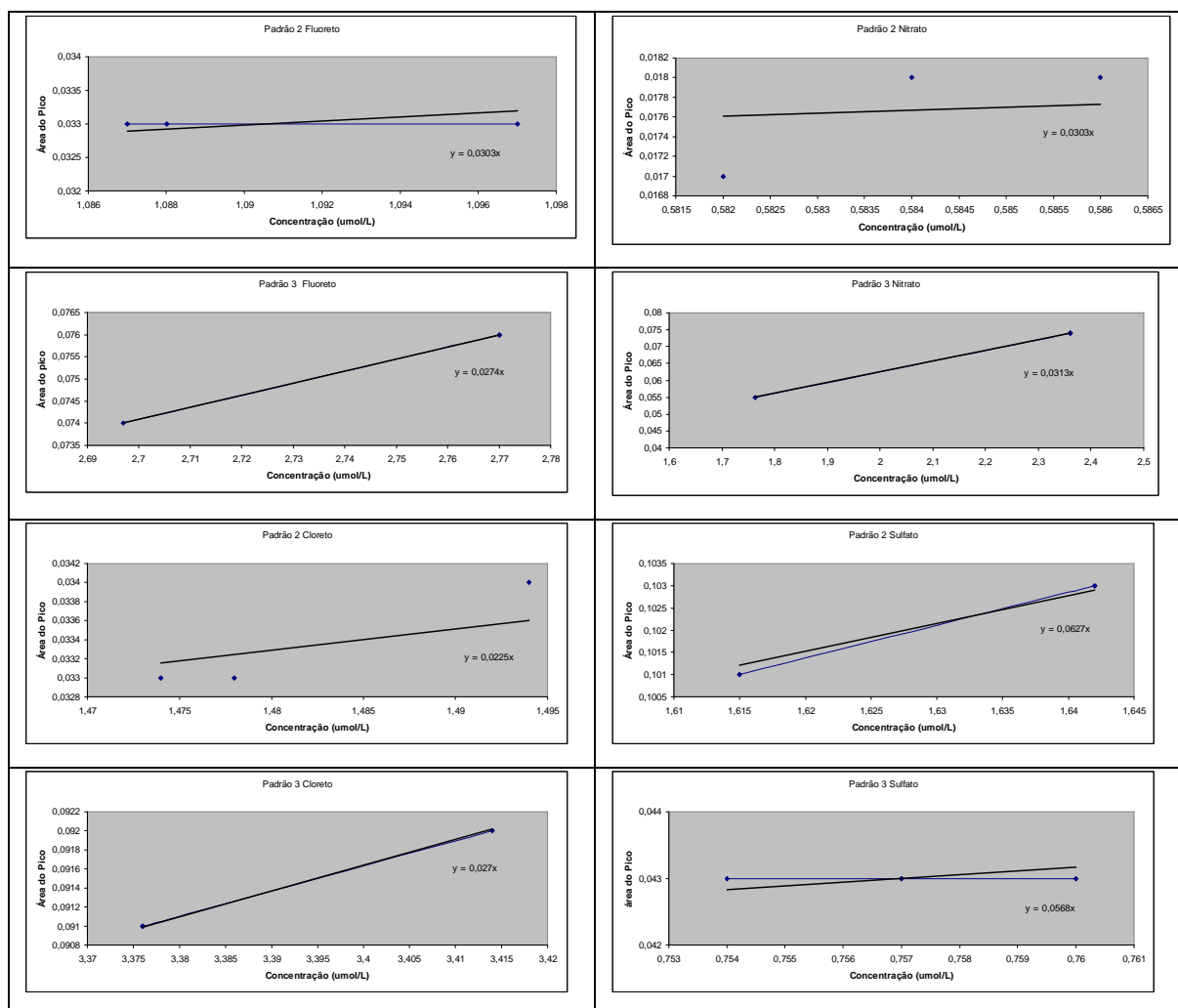


Figura 2.2 – Gráficos com as comparações entre os coeficientes angulares das regressões obtidas a partir das injeções dos padrões 2 e 3.

Tabela 2.4 – Regressões Lineares para teste de seletividade.

Analitos	Regressão linear	
	Padrão 2	Padrão 3
Fluoreto	0,03*x	0,03*x
Cloreto	0,02*x	0,02*x
Nitrato	0,03*x	0,03*x
Sulfato	0,06*x	0,06*x

3 Linearidade, Função da Resposta ou Curva de Calibração

Linearidade é a capacidade de um método analítico em produzir resultados que sejam linearmente proporcionais à concentração do analito nas amostras, em uma dada faixa de concentração. A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito (ABNT, 2003).

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

A curva de calibração apresenta os dados estatísticos de interseção, da equação de regressão linear, o coeficiente de correlação ou de determinação e a concentração estimada das soluções padrão. Por isso, é necessária uma quantidade suficiente de soluções padrão para a definição adequada entre a concentração e a resposta (Brito, 2003) Por se tratar de um método para uso científico, recomenda-se que o cálculo seja feito com no mínimo de 5 valores de concentração, que estes estejam dentro de um intervalo definido, em geral do analito a ser determinado no conjunto de amostras.

A equação da reta que relaciona as duas variáveis é representada pela Equação 3.1:

$$Y = a * x + b \quad (3.1)$$

Onde:

y = resposta medida (área do pico, etc.);

x = concentração;

a = coeficiente angular= sensibilidade;

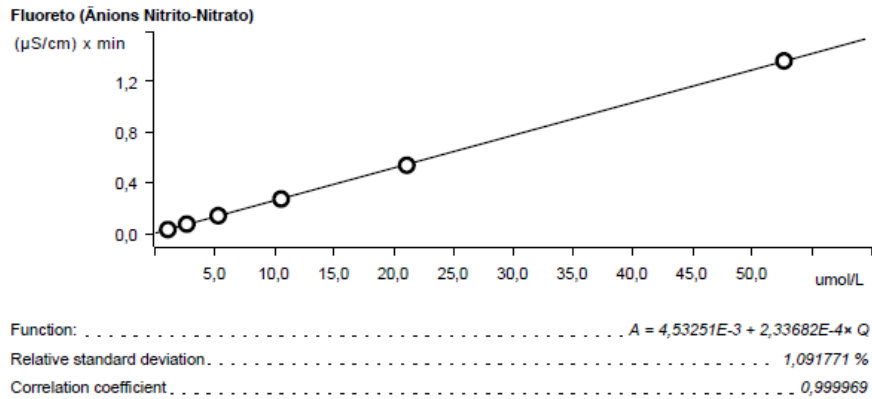
b = interseção com o eixo y, quando x = 0.

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito ou então calculada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados.

O coeficiente de correlação linear (R) é freqüentemente usado para indicar o quanto a reta pode ser considerada adequada como modelo matemático, ou seja, a linearidade pode ser demonstrada pelo coeficiente de correlação da curva de calibração, que não deve ser estatisticamente diferente de 1, observando-se que a inclinação da reta seja diferente de zero. No caso, segundo Brito (2003) considera-se:

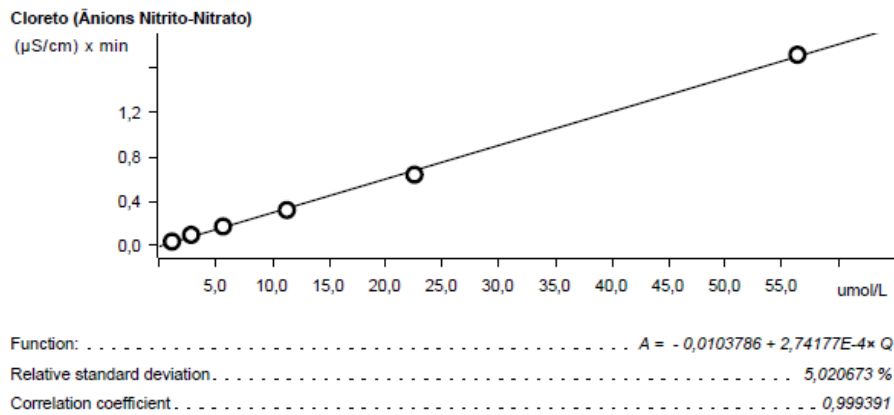
$R=1$	Correlação Perfeita
$0,91 < R < 0,99$	Correlação Fortíssima
$0,61 < R < 0,90$	Correlação Forte
$0,31 < R < 0,60$	Correlação Média
$0,01 < R < 0,30$	Correlação Fraca
$R=0$	Correlação Nula

A seguir são apresentados nas Figuras 3.1 até 3.4 os gráficos dos resultados das injeções feitas durante a calibração do método Ânions 1, para cada analito de interesse. Esses gráficos são gerados automaticamente do *software Magic Net IC*, instalado no computador ligado ao cromatógrafo iônico 850 *Professional IC*.



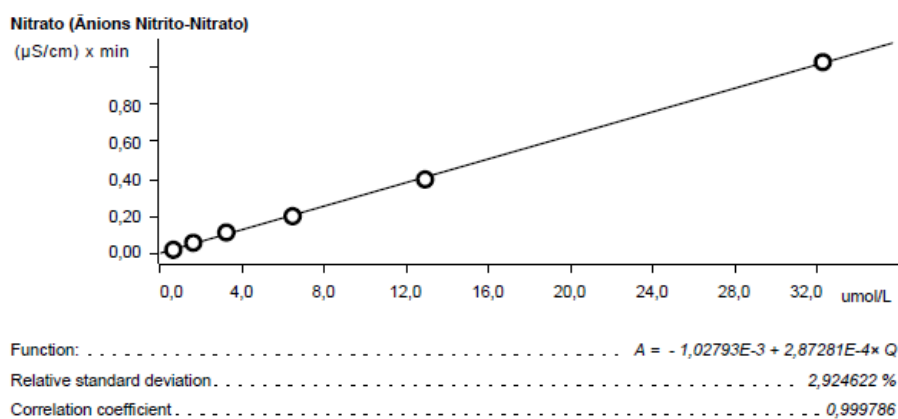
Sample type	Index	Conc.	Volume	Area	Ident	Date	Used
Standard 1	1	0,000	110,67	n. d.	Agua 1A	2011-01-04 14:47:49 UTC-2	used
Standard 4	1	5,265	110,67	0,143	P4 anions	2011-01-04 15:44:45 UTC-2	used
Standard 5	1	10,530	110,67	0,274	P3 anions	2011-01-04 16:30:17 UTC-2	used
Standard 3	1	2,632	110,67	0,076	P5 ânions	2011-01-05 09:19:28 UTC-2	used
Standard 6	1	21,060	110,67	0,542	P2 ânions	2011-01-05 10:33:09 UTC-2	used
Standard 7	1	52,650	110,67	1,369	P1 Ânions	2011-01-05 12:01:16 UTC-2	used
Standard 2	1	1,053	110,67	0,033	P6 Ânions	2011-01-05 12:39:46 UTC-2	used

Figura 3.1 – Resultado da curva de calibração para o fluoreto, gerado pelo *software Magic Net IC*.



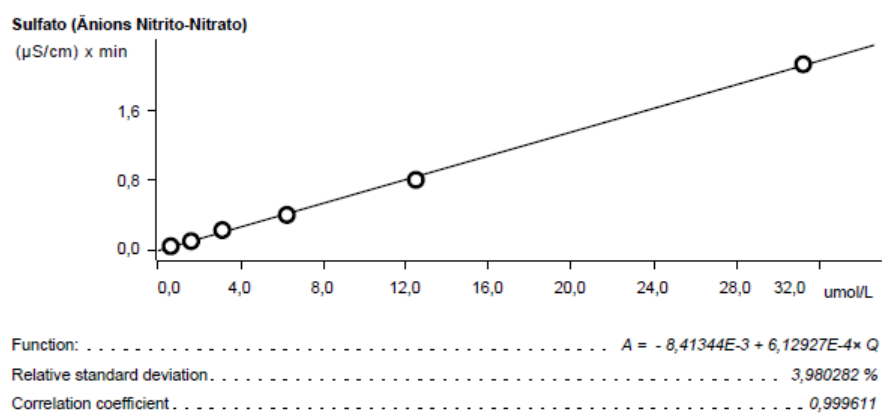
Sample type	Index	Conc.	Volume	Area	Ident	Date	Used
Standard 1	1	0,000	110,67	n. d.	Agua 1A	2011-01-04 14:47:49 UTC-2	used
Standard 4	1	5,635	110,67	0,169	P4 anions	2011-01-04 15:44:45 UTC-2	used
Standard 5	1	11,270	110,67	0,317	P3 anions	2011-01-04 16:30:17 UTC-2	used
Standard 3	1	2,817	110,67	0,094	P5 ânions	2011-01-05 09:19:28 UTC-2	used
Standard 6	1	22,540	110,67	0,635	P2 ânions	2011-01-05 10:33:09 UTC-2	used
Standard 7	1	56,350	110,67	1,716	P1 Ânions	2011-01-05 12:01:16 UTC-2	used
Standard 2	1	1,127	110,67	0,033	P6 Ânions	2011-01-05 12:39:46 UTC-2	used

Figura 3.2 – Resultado da curva de calibração para o cloreto, gerado pelo *software Magic Net IC*.



Sample type	Index	Conc.	Volume	Area	Ident	Date	Used
Standard 1	1	0,000	110,67	n. d.	Agua 1A	2011-01-04 14:47:49 UTC-2	used
Standard 4	1	3,226	110,67	0,111	P4 anions	2011-01-04 15:44:45 UTC-2	used
Standard 5	1	6,452	110,67	0,199	P3 anions	2011-01-04 16:30:17 UTC-2	used
Standard 3	1	1,613	110,67	0,055	P5 ânions	2011-01-05 09:19:28 UTC-2	used
Standard 6	1	12,900	110,67	0,397	P2 ânions	2011-01-05 10:33:09 UTC-2	used
Standard 7	1	32,260	110,67	1,029	P1 Ânions	2011-01-05 12:01:16 UTC-2	used
Standard 2	1	0,645	110,67	0,018	P6 Ânions	2011-01-05 12:39:46 UTC-2	used

Figura 3.3 - Resultado da curva de calibração para o nitrato, gerado pelo software *Magic Net IC*.



Sample type	Index	Conc.	Volume	Area	Ident	Date	Used
Standard 1	1	0,000	110,67	n. d.	Agua 1A	2011-01-04 14:47:49 UTC-2	used
Standard 4	1	3,123	110,67	0,228	P4 anions	2011-01-04 15:44:45 UTC-2	used
Standard 5	1	6,244	110,67	0,402	P3 anions	2011-01-04 16:30:17 UTC-2	used
Standard 3	1	1,611	110,67	0,102	P5 ânions	2011-01-05 09:19:28 UTC-2	used
Standard 6	1	12,490	110,67	0,802	P2 ânions	2011-01-05 10:33:09 UTC-2	used
Standard 7	1	31,230	110,67	2,124	P1 Ânions	2011-01-05 12:01:16 UTC-2	used
Standard 2	1	0,624	110,67	0,043	P6 Ânions	2011-01-05 12:39:46 UTC-2	used

Figura 3.4 - Resultado da curva de calibração para o sulfato, gerado pelo software *Magic Net IC*.

Através dos valores das áreas dos picos e da concentração média de cada analito e nível de concentração, podemos traçar os gráficos dos resultados das injeções em função da concentração do analito, mostrados a seguir na Figura 3.5. Além disso, na Tabela 3.1 é apresentado um resumo contendo os coeficientes de correlação e a equação da regressão linear (determinada pelo método dos mínimos quadrados) de cada analito.

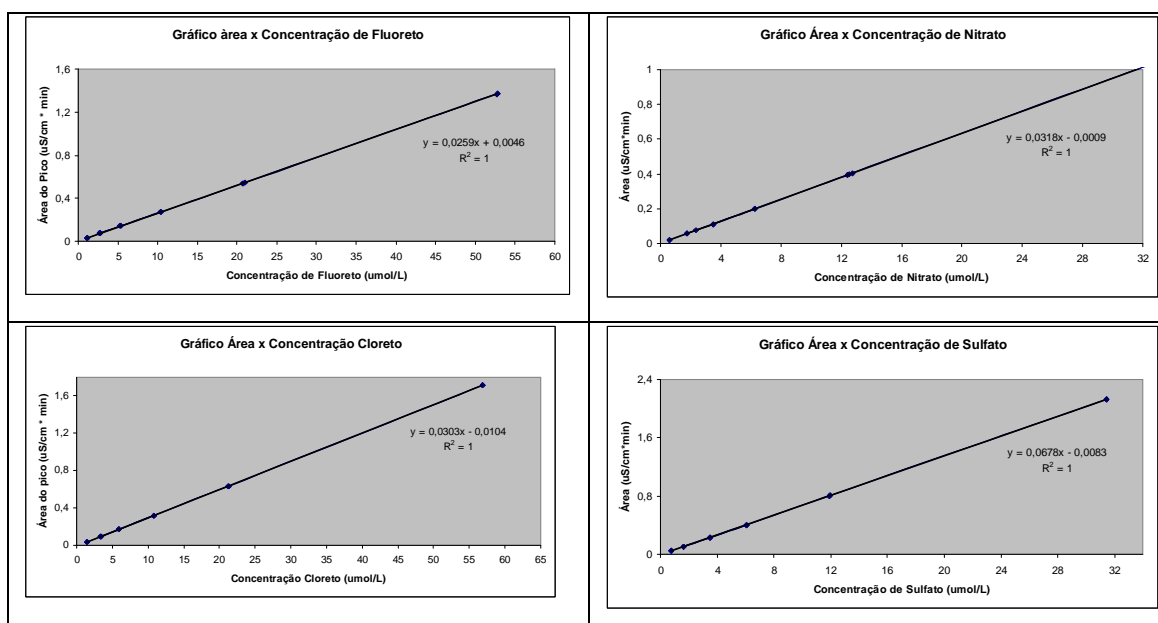


Figura 3.5 – Resultado das injeções em função das concentrações de cada analito e suas respectivas regressões lineares.

Tabela 3.1 - Coeficientes de correlação e regressão linear para cada analito.

Analitos	Coeficiente de Correlação (R)	Regressão Linear
Fluoreto	1	$0,0259x - 0,035$
Cloreto	1	$0,0305x - 0,009$
Nitrato	1	$0,0318x - 0,001$
Sulfato	1	$0,0678x - 0,0067$

4 Intervalo de Trabalho

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentrações do analito ou valores da propriedade no qual o método pode ser aplicado.

No limite inferior da faixa de concentração, os fatores limitantes são os valores dos limites de detecção e de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição.

A faixa linear é definida como a faixa de concentrações na qual a sensibilidade pode ser considerada constante e é normalmente expressa nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico.

Geralmente, os analistas primeiramente definem o intervalo de trabalho (com base no valor de concentração do analito que desejam analisar) e depois, partir da curva de calibração, determinam se a relação entre o sinal e a concentração é linear (Brito, 2003).

A princípio, são necessários vários pontos de calibração, de preferência maior ou igual a cinco, para determinar o intervalo de trabalho. A faixa de trabalho e a faixa linear podem ser diferentes para cada tipo de amostra, devido ao efeito das interferências provenientes da matriz. Na seção E deste documento apresenta-se um discussão sobre o limite de detecção com os limites de detecção para cada analito de interesse do método Ânions 1 e indicando-se como ele pode ser calculado.

4.1. Erros indeterminados

Os erros indeterminados são aqueles de origem não detectada. Mesmo com a eliminação de todas as fontes de erros determinados, verifica-se uma pequena flutuação presente em medidas sucessivas. Essa flutuação é causada pelos erros indeterminados (Baccan, 2000).

Admitindo-se que se possa medir uma grandeza infinitas vezes sem que existam erros determinados, a distribuição desses resultados apresentaria valores de desvios padrão com uma distribuição simétrica conhecida como Distribuição de Gauss, Figura 4.1.

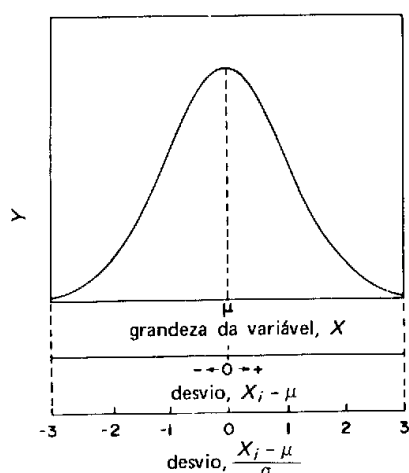


Figura 4.1 – Distribuição de Gauss (Baccan, 2000) onde X_i é a variável de interesse, μ é o valor médio dessa grandeza e σ é o desvio padrão da amostra.

Assim, os erros indeterminados seguiriam a curva normal de distribuição como mostrado na Figura 4.1 e análise estatística dessa curva apresenta o seguinte resultados (Baccan, 2000):

- 68% das medidas estarão no intervalo $\mu \pm 1\sigma$
- 95% das medidas estarão no intervalo $\mu \pm 2\sigma$
- 99,7% das medidas estarão no intervalo $\mu \pm 3\sigma$

Os limites que encerram cada uma dessas áreas são chamados limites de confiança. O intervalo coberto pela área é o intervalo de confiança. As expressões utilizadas para o cálculo desses limites são mostradas na Tabela 4.1 onde σ é o desvio padrão da amostra. Na Tabela 4.2 são mostrados os valores calculados para estes limites para o método Ânions 1 em ($\mu\text{mol.L}^{-1}$), com confiança de 95%.

Tabela 4.1 – Cálculo dos Limites e Intervalos de confiança (%).

Limite de Confiança	Intervalo de Confiança	Nível de Confiança
$\pm 1\sigma$	$\mu \pm 1\sigma$	68 %
$\pm 2\sigma$	$\mu \pm 2\sigma$	95 %
$\pm 3\sigma$	$\mu \pm 3\sigma$	99,7 %

Tabela 4.2 – Concentração média e intervalo de confiança para significância de 95%, para cada padrão, em relação a cada analito ($\mu\text{mol.L}^{-1}$).

Concentração Média ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)				
Padrões	Fluoreto	Cloreto	Nitrato	Sulfato
1	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
2	1,09 \pm 0,0110	1,45 \pm 0,0212	0,584 \pm 0,00400	0,756 \pm 0,00611
3	2,72 \pm 0,0816	3,41 \pm 0,0427	1,77 \pm 0,0140	1,62 \pm 0,0181
4	5,31 \pm 0,0519	5,92 \pm 0,0157	3,52 \pm 0,00200	3,49 \pm 0,00987
5	10,4 \pm 0,0393	10,8 \pm 0,0163	6,28 \pm 0,00346	6,044 \pm 0,00462
6	20,8 \pm 0,259	21,3 \pm 0,0370	12,5 \pm 0,286	11,9 \pm 0,0374
7	52,7 \pm 0,0569	56,9 \pm 0,0140	32,4 \pm 0,0311	31,4 \pm 0,00757

5 Sensibilidade

A sensibilidade é um parâmetro que fornece a variação da resposta em função da variação da concentração do analito, isto é indica quanto o método é sensível a variações nas concentrações. Se o método identificar pequenas variações de concentração do analito pode-se dizer que o método é sensível até esse nível de concentração. Matematicamente, a sensibilidade pode ser expressa pelo coeficiente angular da equação da regressão linear da curva de calibração, conforme a Equação 5.1 (Brito, 2003), e é determinada simultaneamente com os testes de linearidade. A sensibilidade depende da natureza do analito e da técnica de detecção utilizada.

$$S = \frac{dx}{dc} \quad (5.1)$$

Onde:

S = sensibilidade;

dx = variação da resposta;

dc = variação da concentração.

Na Tabela 5.1 são apresentados os valores de sensibilidade, para cada analito, calculados a partir das curvas de calibração para o método Ânions 1.

Tabela 5.1 - Valores de sensibilidade para cada analito ($\mu\text{S.cm}^{-1}.\text{min}$)/($\mu\text{mol.L}^{-1}$).

Analito	Sensibilidade ($\mu\text{S.cm}^{-1}.\text{min}$)/($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
Fluoreto	$S=0,0259$
Cloreto	$S=0,0305$
Nitrato	$S=0,0318$
Sulfato	$S=0,0678$

6 Limite de Detecção

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito ou de uma propriedade (análise de traço, por exemplo), é importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método.

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

O limite de detecção do método (LDM) é definido como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero. O LDM é determinado por meio de análise completa de uma dada matriz contendo o analito (ABNT, 2003; Nascimento, 2008).

O método analítico deve ser especificado e o LDM para cada analito deve ser expresso nas unidades apropriadas, de acordo com o preconizado no método analítico. A matriz da amostra usada para determinar o LDE deve ser identificada.

Para determinar os limites para o método Ânions 1, para cada analito foram feitas 3 repetições para cada valor de concentração, assim, o grau de liberdade é 2.

Na literatura existem várias formas de calcular estes limites, mas devido a robustez, os cálculos para a determinação do LDE e LDM, utilizando o valor t de *Student* com teste unilateral (detalhes no Anexo 1) (Montgomery, 2001), com 99% de confiança e admitindo uma distribuição normal dos resultados, estão representados nas Equações 6.1 e 6.2, respectivamente:

$$LDE = \bar{X} + t * s \quad (6.1)$$

$$LDM = t * s \quad (6.2)$$

Onde:

LDE = limite de detecção;

LDM = limite de detecção do método

\bar{X} = média das intensidades de sinal obtidas para n leituras do branco

s = desvio padrão da média de leituras do branco ou coeficiente linear da equação da curva de calibração.

Na Tabela 6.1 são mostrados os valores dos desvios padrão para cada analito e para cada faixa de concentração, bem como a média dos desvios padrão para cada analito e o cálculo do LDM. Como não são detectados valores significativos de concentração dos analitos no branco, os cálculos foram feitos a partir dos valores obtidos a partir do menor nível de concentração.

Tabela 6.1 - Cálculo do desvio padrão e do Limite de Detecção ($\mu\text{mol.L}^{-1}$).

Desvio Padrão e LDM ($\mu\text{mol.L}^{-1}$).				
Padrão	Fluoreto	Cloreto	Nitrato	Sulfato
1	0	0	0	0
2	0,00551	0,0106	0,00200	0,00305
3	0,0408	0,0214	0,00700	0,00907
4	0,0260	0,00757	0,00100	0,00493
5	0,0196	0,00814	0,00173	0,00231
6	0,129	0,0185	0,145	0,0187
7	0,0284	0,00700	0,0155	0,00379
Média do Desvio	0,0357	0,0104	0,0246	0,00598
LDM	0,0384	0,0737	0,0139	0,0213

7 Limite de Quantificação

O Limite de Quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão. Pode ser considerado como sendo a concentração do analito correspondente ao valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 desvios-padrão. Algumas vezes é também denominado “Limite de Determinação”. Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). Este limite, após ter sido determinado, deve ser testado para averiguar se a exatidão e a precisão conseguidas são satisfatórias. Com relação ao método Ânions 1, os limites de quantificação foram considerados como sendo a concentração do analito correspondente a média do branco mais 10 vezes o desvio padrão, para cada analito, representados pela Equação 7.1:

$$LQ = \bar{X} + 10 * s \quad (7.1)$$

Onde:

LQ = Limite de quantificação

\bar{X} = média das intensidades de sinal obtidas para n leituras do branco

s = desvio padrão da média das leituras do branco.

Os valores dos limites de quantificação foram calculados a partir do menor valor de concentração ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) do método Ânions 1 e são mostrados na Tabela 7.1.

Tabela 7.1 - Cálculo do limite de quantificação ($\mu\text{mol.L}^{-1}$).

Limite de Quantificação ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)				
	Fluoreto	Cloreto	Nitrato	Sulfato
Desvio padrão médio	1,09	1,45	0,584	0,756
Concentração média	0,0357	0,0104	0,0246	0,00598
LQ= X+ 10s	1,45	1,55	0,830	0,816

8 Exatidão e Tendência

A exatidão de um método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro. Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros: uso de materiais de referência, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação. A exatidão, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos.

A determinação da tendência total com relação aos valores de referência apropriados é importante no estabelecimento da rastreabilidade aos padrões reconhecidos. A tendência pode ser expressa como recuperação analítica, definida como $\frac{\text{valor observado}}{\text{valor esperado}}$.

Esta tendência deve ser corrigida ou demonstrada ser desprezível, mas em ambos os casos, a incerteza associada com a determinação da tendência permanece como um componente essencial da incerteza global.

Segundo a ANVISA (Brasil, 2003), a exatidão deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo e pode ser expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, Equação 8.1:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} * 100 \quad (8.1)$$

Para os valores experimentais adquiridos durante a construção da curva de calibração (método Ânions 1), a exatidão (%) calculada é apresentada na Tabela 8.1.

Tabela 8.1 – Valores de Exatidão (%) do método para o método Ânions 1

Exatidão (%)				
Padrão	Fluoreto	Cloreto	Nitrato	Sulfato
1	100	100	100	100
2	96,4	71,7	90,51	78,9
3	96,7	79,1	95	96,3
4	99,2	105,03	90,9	88,4
5	99,01	95,64	97,32	96,77
6	99,13	94,31	97,30	95,65
7	99,8	100,96	99,5	99,3

8.1. Materiais de Referência ou Certificados (MRC)

Sempre que possível, os materiais de referência certificados devem ser utilizados no processo de validação de um método de ensaio. Um MRC possui um valor de concentração, ou outra grandeza, para cada parâmetro e uma incerteza associada. É muito importante, portanto, que o fornecimento desses MRC seja realizado por organismos reconhecidos e confiáveis.

Na avaliação da exatidão utilizando um material de referência, os valores obtidos pelo laboratório (média e o desvio padrão de uma série de análises em replicata) devem ser comparados com os valores certificados do material de referência. Para esta comparação podem ser utilizados diversos critérios de decisão, entre os quais:

- Erro relativo;
- Teste de hipóteses;
- Índice z (*z Score*), e
- Erro normalizado.

O cálculo para tais critérios pode ser orientado pela ABNT (2003). Nos processos de comparação, caso não ocorra resultados satisfatórios, deve ser

efetuado um plano de ações corretivas para verificar as causas e reavaliar o ensaio.

8.2. Recuperação

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras adicionadas com quantidades conhecidas do mesmo (*spike*). O analito pode ser adicionado às amostras em pelo menos três diferentes concentrações, por exemplo, próximo ao limite de detecção, próximo à concentração máxima permissível e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método. A limitação deste procedimento é a de que o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que o presente na amostra.

O estudo de recuperação consiste na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse, seguida pela determinação da concentração do analito adicionado. É também chamado de processo de fortificação (Figura 8.1).

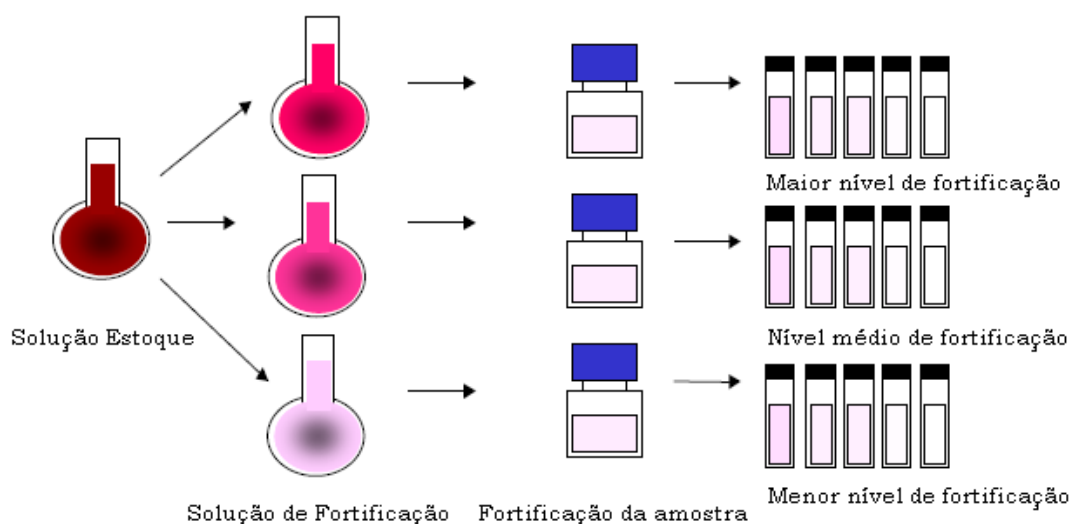


Figura 8.1 - Processo de fortificação de amostras.

A quantidade percentual recuperada pelo processo pode ser calculada através da Equação 8.2. Mais detalhes sobre este tópico pode ser encontrada em Brito (2003).

$$\text{Re } c\% = \frac{[\text{valor}_{obtido} - \text{valor}_{real}]}{\text{valor}_{real}} * 100 \quad (8.1)$$

9 Precisão

A precisão de um método analítico é o parâmetro que avalia a proximidade entre as medidas experimentais na mesma amostra. Geralmente é expresso com desvio-padrão, variância ou coeficiente de variação (CV) de diferentes medidas.

Ambas repetitividade e reprodutibilidade são geralmente dependentes da concentração do analito e, deste modo, deve ser determinada para um diferente número de concentrações e, em casos relevantes, a relação entre precisão e a concentração do analito deve ser estabelecida. O coeficiente de variação (CV%) ou desvio padrão relativo (DPR) pode ser mais útil neste caso, pois foi normalizado com base na concentração e deste modo ele é praticamente constante ao longo da faixa de interesse, contanto que esta não seja muito grande, podendo ser calculado pela Equação 9.1:

$$DPR\% = \frac{[DP]}{CMD} * 100 \quad (9.1)$$

Onde:

DP = desvio padrão;

CMD = concentração média determinada

Os valores dos coeficientes de variação ou desvio padrão relativo – DPR (%) para o método Ânions 1 são apresentados na Tabela 9.1.

Tabela 9.1 - Cálculo do DPR (%) para verificação da precisão do método, para o método Ânions 1.

Desvio Padrão Relativo - DPR –(%)				
Padrão	Fluoreto	Cloreto	Nitrato	Sulfato
1	0	0	0	0
2	0,78	0,714	0,342	0,396
3	0,952	0,232	0,0522	0,339
4	0,489	0,134	0,0284	0,158
5	0,188	0,0757	0,0276	0,0382
6	0,621	0,0852	1,15	0,155
7	0,0539	0,0124	0,0479	0,0102
Média do DPR	0,441	0,179	0,236	0,157

9.1.Repetitividade

É o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo analito, efetuadas sob as denominadas *condições de repetitividade*: mesmo procedimento de medição; mesmo observador; mesmo instrumento usado sob mesmas condições; mesmo local, e repetições em curto espaço de tempo.

A repetitividade pode ser expressa quantitativamente em termos da característica da dispersão dos resultados e pode ser determinada por meio da análise de padrões, material de referência ou adição ao branco em várias concentrações na faixa de trabalho.

9.1.1. Limite de Repetitividade – “r”

A partir do desvio padrão dos resultados das análises e sob condições de repetitividade, é aconselhável calcular o limite de repetitividade “r” que capacita o analista a decidir se a diferença entre análises de duplicatas de uma amostra, determinada sob condições de repetitividade, é significativa.

O limite de repetitividade (r) é calculado pelas Equações 9.2 e 9.3.

$$r = t_{\infty} \sqrt{2} * S_r \quad (9.2)$$

Ou, para um nível de significância de 95%

$$r = 2,8 * S_r \quad (9.3)$$

Onde:

r = limite de repetitividade

Sr = desvio-padrão de repetitividade associado aos resultados considerados;

Para o método Ânions 1, os valores dos limites de repetitividade ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) para a curva de calibração são mostrados na Tabela 9.2.

Tabela 9.2 - Cálculo do limite de repetitividade.

Limite de repetitividade ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)				
Padrão	Fluoreto	Cloreto	Nitrato	Sulfato
1	0	0	0	0
2	0,0154	0,0296	0,00560	0,00855
3	0,114	0,0598	0,0196	0,0254
4	0,0727	0,0212	0,00280	0,0138
5	0,0550	0,0228	0,00485	0,00647
6	0,362	0,0519	0,405	0,0524
7	0,0797	0,0196	0,0435	0,0106
Média do limite de repetitividade	0,0999	0,0293	0,0688	0,0167

9.2.Reprodutibilidade

É o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo analito, efetuadas sob condições variadas de medição.

Embora a reprodutibilidade não seja um componente de validação de método executado por um único laboratório, é considerada importante quando um

laboratório busca a verificação do desempenho dos seus métodos em relação aos dados de validação obtidos por meio de comparação interlaboratorial.

A partir do desvio padrão obtido sob condições de reprodutibilidade é possível calcular o limite de reprodutibilidade “R”, o qual permite ao analista decidir se a diferença entre os valores da duplicata das amostras analisadas sob condições de reprodutibilidade é significativa.

9.2.1. Limite de Reprodutibilidade – “R”

Do mesmo modo que para a repetitividade, o limite de reprodutibilidade (R) é dado pelas Equações 9.4 e 9.5:

$$R = t_{\infty} \sqrt{2} * S_R \quad (9.4)$$

Ou, para um nível de significância de 95%

$$R = 2,8 * S_R \quad (9.5)$$

Onde:

R = limite de reprodutibilidade

S_R = variância de reprodutibilidade associada aos resultados considerados, para cada laboratório;

9.3. Precisão Intermediária

A precisão intermediária, também denominada de reprodutibilidade interna, refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como:

- Diferentes analistas;
- Diferentes equipamentos;
- Diferentes tempos.

Essa medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um laboratório e, como tal, mais aconselhável.

Dependendo da análise e do tipo de aplicação do estudo da precisão intermediária, existem vários métodos para determinação e controle desse parâmetro de qualidade, tal como através de gráfico de controle de amplitude, que poderá ser aplicado para replicatas de amostras e para padrões estáveis ao longo do tempo;

9.4.Comparação da Precisão entre métodos

Considerando a exatidão dos métodos adequada, quando se pretende avaliar se dois métodos (A e B) têm diferenças significativas entre si, em termos de precisão, pode-se recorrer ao teste F.

O teste F tem como base o cálculo da razão entre as variâncias dos dois métodos, colocando-se a maior no numerador, de modo que a razão seja maior ou igual a um, segundo a Equação 9.6:

$$F_{calculado} = \frac{S_A^2}{S_B^2} \quad (9.5)$$

Em seguida, é comparado o valor obtido com o valor tabelado de F.

Se $F_{calculado} \leq F_{tabelado}$, os dois métodos não apresentam diferenças significativas entre si, relativamente às suas precisões.

10 Robustez

A robustez de um método de análise mede a sensibilidade que o método apresenta de pequenas variações. Um método diz-se robusto se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando esse está sendo executado.

A avaliação da robustez pode ser realizada durante o desenvolvimento do método a ser analisado. Nestes testes são aplicados experimentos estatísticos que avaliam os efeitos das alterações em diferentes variáveis do método. Na Tabela 10.1 estão relacionados os principais parâmetros que podem resultar em variação na resposta do método.

Tabela 10.1 – Determinação da robustez do método analítico.

Preparo das Amostras	<ul style="list-style-type: none">• <i>Estabilidade das soluções analíticas</i>• <i>Tempo de retenção</i>
Espectrofotometria	<ul style="list-style-type: none">• <i>Variação do pH da solução</i>• <i>Temperatura</i>• <i>Diferentes fabricantes de solventes</i>
Cromatografia Líquida	<ul style="list-style-type: none">• <i>Variação do pH da fase móvel</i>• <i>Variação da composição da fase móvel</i>• <i>Temperatura</i>• <i>Fluxo</i>
Cromatografia Gasosa	<ul style="list-style-type: none">• <i>Diferentes lotes ou fabricantes de colunas</i>• <i>Temperatura</i>• <i>Velocidade do gás de arraste</i>

11 Documentação de Métodos Validados

Com a finalidade de rastrear os processos de validação de um método, todos os dados relevantes nesse processo tais como o planejamento, os experimentos e os resultados obtidos, devem ser documentados e registrados.

Depois do processo de validação, é importante o desenvolvimento do procedimento operacional, de forma que o método validado possa ser implantado sem ambigüidades.

É preferível que, ao se escrever um método de análise, as informações sejam descritas, tanto quanto possível, na ordem em que o usuário vai precisar delas.

Convém que um procedimento de análise seja coerente, claro, correto e tão completo quanto necessário, dentro dos limites estabelecidos pelo seu campo de aplicação. Na padronização do formato dos métodos validados, sugere-se utilizar a ABNT ISO/IEC Diretiva – Parte 3, a Norma ISO 78/2, além dos requisitos da NBR ISO/IEC 17025 para a sistemática de controle de documentos do laboratório.

Referências Bibliográficas

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR ISO/IEC 17025**: requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2001. 20 p.

ARAGÃO, N. M; VELOSO, M. C. M; ANDRADE, J. B. Validação de métodos cromatográficos de análise – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “Química Verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova** (On line). São Paulo, v.32, n.9, p.2476-2478, 2009.

BACCAN, N; ANDRADE, J. C; GODINHO, O. E. S; BARONE, J. S. **Química Analítica Quantitativa Elementar**. Edgard Blücher, 3 Ec., São Paulo, 2000.

BRASIL, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **INMETRO: DOQ_CGCCRE-008**. Orientações sobre validação de Métodos e Ensaio Químicos. Brasília, 2003. 35p

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE n.899**, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF., 02 de jun.2003. Disponível em: [HTTP://anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03.thm](http://anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03.thm). Acesso em jan.2010.

BRITO, N. M; AMARANTE JUNIOR, O. P; POLESE, L; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: Estratégia e Discussão. Pesticidas: **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**. Curitiba, v.13, p.129-146, 2003.

CAMÕES, M. F; GOLÇALVES, M. E, CARNEIRO, R. N; BENOLIEL, M. J; PAIVA, J. M. Validação do Método de determinação Simultânea dos íons Brometo e Bromato por Cromatografia Iônica em Águas de Consumo Humano. **Química Nova** (on Line) Lisboa, Portugal, v.27, n.3, p503-507, 2004.

EITH, C; KOLB, M; RUMI, A; SEUBERT, A; VIEHWEGER, H. K. **Práticas Cromatográficas de íons – Uma Introdução**. **Monografia Metrohm**. Metrohm LTDA, Segunda Edição, CH-9101 Herisau, Suíça, 2006.

EURACHEM NEDERLAND. **Seleção, uso e interpretação de programas de ensaios de proficiência (EP) por laboratórios**: 2000/Eurachem Nederland Laboratory of the Government Chemist of United Kingdom; tradução ANVISA – Brasília: SENAI/DN, 2005.

FREITAS, S. M. **Metodologia Estatística para Validação de Métodos Analíticos Aplicável à Metrologia Química**. Dissertação de Mestrado. PUC, Programa de Pós-graduação em Metrologia para Qualidade Industrial, 2003.

IMIOTO, M. N.; FREITAS, R. J. S. Determinação dos Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ) em Análise de Resíduos de Pesticidas Organohalogenados por Cromatografia em Fase Gasosa. Pesticidas: **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**. Curitiba, v.18 p.35-44, 2008.

MENDES, A. S. R. **Implementação e Validação de Medos Analíticos**. Laboratório Regional de Controle da Qualidade da Água. Estação da Alegria. 9050 – FUNCHAL.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiment**. Arizona State University. 5 th ed. John Wiley & Sons, Inc. United States of America, 2001.

NASCIMENTO, A. R.; ZIOLLI, R. L.; ARARUN, J. T.; PIRES, C. S.; SILVA, T. B. Avaliação do desempenho analítico do método de determinação de TPH (total Petroleum Hydrocarbon) por detecção no infravermelho. **Eclética Química**, v.33, n.1, p.35-42, São Paulo, 2008.

PEREZ, M. A. F. Validação de Métodos Analíticos: Como Fazer? Por que ela é importante? **Boletim de Tecnologia e Desenvolvimento de Embalagens**. v.22, n.3, Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), 2010.

RIBANI, M; BOTTOLI, C.B.G; COLLINS, C. H; JARDIN, I. C. S. F; MELO, L. F. C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova** (on Line). São Paulo, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

SANTOS, F. L. M. **Caracterização química e definição de protocolos analíticos para efluente de esgoto tratado, para uso em sistema de irrigação agrícola**. Dissertação de Mestrado. Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 79f., 2009.

SILVA, P. S; ALVES, M. C. C. Como Iniciar a Validação de Métodos Analíticos. ENQUALAB – 2006 – Congresso e Feira de Qualidade em Metrologia. Rede Metrológica do Estado de São Paulo – REMESP, São Paulo, 2006.

Anexo 1

II. Percentage Points of the *t* Distribution*

$\nu \backslash \alpha$.40	.25	.10	.05	.025	.01	.005	.0025	.001	.0005
1	.325	1.000	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657	127.32	318.31	636.62
2	.289	.816	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	14.089	23.326	31.598
3	.277	.765	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	7.453	10.213	12.924
4	.271	.741	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	5.598	7.173	8.610
5	.267	.727	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	4.773	5.893	6.869
6	.265	.727	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	4.317	5.208	5.959
7	.263	.711	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.019	4.785	5.408
8	.262	.706	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	3.833	4.501	5.041
9	.261	.703	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	3.690	4.297	4.781
10	.260	.700	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	3.581	4.144	4.587
11	.260	.697	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	3.497	4.025	4.437
12	.259	.695	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.428	3.930	4.318
13	.259	.694	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.372	3.852	4.221
14	.258	.692	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.326	3.787	4.140
15	.258	.691	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.286	3.733	4.073
16	.258	.690	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.252	3.686	4.015
17	.257	.689	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.222	3.646	3.965
18	.257	.688	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.197	3.610	3.922
19	.257	.688	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.174	3.579	3.883
20	.257	.687	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.153	3.552	3.850
21	.257	.686	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.135	3.527	3.819
22	.256	.686	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.119	3.505	3.792
23	.256	.685	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.104	3.485	3.767
24	.256	.685	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.091	3.467	3.745
25	.256	.684	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.078	3.450	3.725
26	.256	.684	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.067	3.435	3.707
27	.256	.684	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.057	3.421	3.690
28	.256	.683	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.047	3.408	3.674
29	.256	.683	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.038	3.396	3.659
30	.256	.683	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.030	3.385	3.646
40	.255	.681	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	2.971	3.307	3.551
60	.254	.679	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	2.915	3.232	3.460
120	.254	.677	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617	2.860	3.160	3.373
∞	.253	.674	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	2.807	3.090	3.291

ν = degrees of freedom.

* Adapted with permission from *Biometrika Tables for Statisticians*, Vol. 1, 3rd edition, by E. S. Pearson and H. O. Hartley, Cambridge University Press, Cambridge, 1966.