
FICHA TÉCNICA

TÍTULO:

Guia RELACRE 13

VALIDAÇÃO DE MÉTODOS INTERNOS DE
ENSAIO EM ANÁLISE QUÍMICA

EDIÇÃO: RELACRE

DESIGN GRÁFICO: RELACRE

CAPA: Alda Rosa

IMPRESSÃO: Espaço 2 Gráfico

TIRAGEM: 500 exemplares

DEPÓSITO LEGAL: 149304/00

ISBN: 972-8574-02-9

Guia RELACRE 13

EDIÇÃO: FEVEREIRO 2000

VALIDAÇÃO



DE MÉTODOS INTERNOS



DE ENSAIO



EM



ANÁLISE QUÍMICA



A presente edição foi elaborada pelo grupo de trabalho **GT03** “Validação de Métodos Internos”, da Comissão Técnica 03 da RELACRE.

É intenção da RELACRE proceder à revisão deste documento sempre que se revele oportuno.

Coordenador do grupo : Augusto F. Rodrigues Castro - SMAS - Porto

Coord. substituto do grupo : Luís José Cabrita - Lab. Ref. Sines – Petrogal

Colaboradores :

Aida Marques	CTIC
Ana Contreiras	DGFCQA
Arsénio Ferreira	L. LUB - PETROGAL
Bárbara Alfaiate	IST
Berta Cardiga	INDEP
Elsa Rola	ARSENAL DO ALFEITE
Helena Lourenço	IPIMAR
Hélia Fernandes	LNEC
Ilda Damas Móra	INSA
Isilda Andrade	INETI
Judite Correia	EPAL
Manuela Cunha	ARSENAL DO ALFEITE
Maria da Luz Ferreira	LNIV - Lisboa
Maria do Céu Bernardes	LPQ
Maria Isménia N. Soares	LNIV - Lisboa
Maria Lígia Martins	LNIV - Lisboa
Maria Noémia Gomes	LNIV - Porto
Teresa Carreira	SMAS - Loures
Vitor Vale Cardoso	EPAL
Carlos Ferreira	DRAEDN
Jorge Ribeiro	L. REF. PORTO – PETROGAL
Lúcia Sousa Santos	SMAS - Oeiras e Amadora
Regina Marques	SMAS - Loures

Agradecimentos :

- Eng^o Leopoldo Cortez (Coordenador CTR03), pelo apoio prestado na elaboração deste guia;
- Dr^a Maria José C. Machado (IGM) e Eng^a Maria João Monteiro (Centro de Qualidade Alimentar - ESB) pela ajuda prestada, na discussão de alguns assuntos deste Guia.

Direitos de Autor protegidos segundo legislação em vigor.

Proibida cópia total ou parcial sem autorização escrita da RELACRE.

1. ASPECTOS TEÓRICOS	1
1.1 OBJECTIVO	1
1.2 INTRODUÇÃO	1
1.3 DEFINIÇÕES	1
2. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS INTERNOS DE ENSAIO	3
2.1 DESCRIÇÃO DO MÉTODO	3
2.2 GRAU DE EXIGIBILIDADE	4
2.3 AVALIAÇÃO INDIRECTA	6
2.3.1 ESPECIFICIDADE/SELECTIVIDADE	6
2.3.2 QUANTIFICAÇÃO	7
2.3.2.1 Curvas de Calibração	7
2.3.2.2 Limiares Analíticos do Método de ensaio	16
2.3.2.3 Sensibilidade	20
2.3.3 PRECISÃO	21
2.3.3.1 Repetibilidade	21
2.3.3.2 Reprodutibilidade	23
2.3.3.3 Precisão Intermédia	27
2.3.3.4 Comparação da Precisão Entre Métodos	30
2.3.4 EXACTIDÃO	30
2.3.5 ROBUSTEZ	30
2.4 AVALIAÇÃO DIRECTA	34
2.4.1 MATERIAIS DE REFERÊNCIA CERTIFICADOS	34
2.4.2 ENSAIOS INTERLABORATORIAIS	38
2.4.3 TESTES COMPARATIVOS	40
3. BIBLIOGRAFIA	48

1. ASPECTOS TEÓRICOS

1.1 OBJECTIVO

Este documento - “Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química” - tem como objectivo a uniformização de critérios utilizados para demonstrar que um método interno de ensaio, nas condições em que é praticado, tem as características necessárias para a obtenção de resultados com a qualidade exigida.

Este documento estabelece linhas de orientação a seguir pelos Laboratórios Químicos que pratiquem métodos internos de ensaio.

1.2 INTRODUÇÃO

Um método de ensaio é um processo que envolve manipulações susceptíveis de acumularem erros (sistemáticos e/ou aleatórios), podendo assim, em algumas situações, alterar de forma significativa o valor do resultado final.

É fundamental que os Laboratórios disponham de meios e critérios objectivos, para demonstrarem, através da Validação, que os métodos internos de ensaio que executam, conduzem a resultados credíveis e adequados à qualidade pretendida.

1.3 DEFINIÇÕES

Para os fins deste documento adoptaram-se as seguintes definições:

Ensaio - Operação técnica que consiste em determinar uma ou mais características de um produto, processo ou serviço, segundo um modo operativo especificado (NP EN 45001).

Método de Ensaio - Procedimento técnico definido para a realização de um ensaio (NP EN 45020).

Método Normalizado - Método de ensaio que segue o indicado numa norma de ensaio ou documento normativo equivalente. Assume-se que, estes métodos foram devidamente validados, estão sujeitos a actualização periódica, e são reconhecidos pela comunidade laboratorial nacional ou internacional (Guia Lab G03). Incluem-se neste tipo de métodos, métodos internacionalmente reconhecidos, tais como os da A.O.A.C., Standard Methods, para os quais, devem ser verificados os parâmetros fundamentais de validação, nas condições de execução e para os fins específicos de cada Laboratório, de forma a evidenciar a fiabilidade dos resultados obtidos.

Método Interno - Método de ensaio que não segue uma norma de ensaio (nacional ou internacional) ou documento normativo equivalente. Excluem-se desta situação as traduções e as reformatações (sem alteração do conteúdo técnico) de normas existentes (Guia Lab G03). Incluem-se nesta definição, os métodos adaptados/modificados, cujo conteúdo técnico deriva de Normas, mas que não segue as mesmas na íntegra.

Norma de Ensaio - Norma que define métodos de ensaio, por vezes acompanhadas de outras disposições respeitantes ao ensaio, tais como amostragem, utilização de métodos estatísticos e sequência de ensaios (NP EN 45020).

Norma - Documento estabelecido por consenso e aprovado por um organismo reconhecido, que fornece, para utilização comum e repetida, regras, linhas orientadoras ou características, para actividades ou seus resultados, visando garantir um nível de ordem óptimo, num dado contexto. As normas devem fundamentar-se em conhecimentos conjugados da ciência, da técnica e da experiência (NP EN 45020).

Documento Normativo - Documento que define regras, linhas orientadoras ou características para actividades ou seus resultados. Incluem-se nesta definição, normas, definições técnicas, códigos de boa prática e regulamentos (NP EN 45020).

Organismo Reconhecido - Organismo de normalização ou outra organização com reconhecida credibilidade internacional no sector técnico em causa.

Material de Referência Certificado - Material de Referência em que os valores de uma ou mais propriedades foram certificados por um processo tecnicamente válido, e que é acompanhado de um certificado (ou outro documento) emitido por um organismo de certificação (Guia ISO 30).

Material de Referência - Material ou substância com uma ou mais propriedades suficientemente bem estabelecidas para serem usadas na calibração de aparelhos, avaliação de métodos de análise ou atribuição de valores a materiais (Guia ISO 30).

Ensaio Interlaboratorial - Organização, realização e avaliação de ensaios da mesma amostra (ou similares) ou material por dois ou mais Laboratórios diferentes, de acordo com condições previamente definidas (Guia ISO 43).

2. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS INTERNOS DE ENSAIO

2.1 DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Quando se pretende validar um método interno de ensaio ter-se-á de efectuar a sua descrição e caracterização.

A descrição dos métodos internos de ensaio deve ser feita em documentos, de forma detalhada, de modo que qualquer pessoa com preparação adequada o possa executar. Estes documentos deverão conter os mesmos elementos de uma norma, nomeadamente:

Elementos identificadores do documento

- Título ou designação do ensaio;
- Código identificador do ensaio;
- Revisão/edição;
- Data de entrada em vigor e responsáveis pela sua elaboração e aprovação;
- Número de cada página e número total de páginas.

Elementos descritivos do método

- Resumo ou referência aos princípios teóricos da determinação indicando as grandezas influentes no resultado;
- Campo de aplicação (tipo de produtos, grandeza a determinar, gama de medição, restrições, etc);
- Equipamento, material e reagentes;
- Processo de calibração (utilização de padrões, ensaios de referência ou em branco, traçado da curva de calibração, etc);
- Procedimento de ensaio (condições operatórias, condições ambientais, critérios de aceitação/rejeição, etc);
- Processo de cálculo dos resultados (fórmulas, tratamento de dados, apresentação de resultados, etc).

Elementos bibliográficos e normativos

- Referências bibliográficas e normativas.

Deverão, quando aplicável, existir elementos/registos complementares sobre:

- Amostragem (colheita, preparação, conservação e acondicionamento das amostras);
- Características do método utilizado pelo Laboratório;
- Precauções de segurança;
- Validação do método;
- Validação e controlo do “Software” (cálculos e apresentação de resultados);
- Controlo de aplicação em rotina;
- Cálculo de incertezas.

2.2 GRAU DE EXIGIBILIDADE

Sempre que um Laboratório pratica métodos internos de ensaio terá que instruir um processo de validação desses métodos, que inclua todos os registos obtidos. A validação dos métodos internos deve ser adaptada a cada caso, sendo progressivamente mais exigente para as situações indicadas:

1- Uma modificação menor da técnica e/ou do equipamento e/ou do produto relativamente a uma norma (ou documento normativo equivalente) existente. Neste caso as alterações não levantam dúvidas sobre a equivalência técnica dos resultados;

2- Uma modificação maior da técnica e/ou do equipamento e/ou do produto relativamente a uma norma (ou documento normativo equivalente) existente. Neste caso as alterações originam dúvidas sobre a equivalência técnica dos resultados.

3- Método baseado em técnica de ensaio conhecida, cuja aplicação ao ensaio pretendido venha descrita em literatura científica não existindo norma de ensaio correspondente.

4- Método de ensaio baseado em técnica de ensaio conhecida, mas cuja aplicação ao ensaio pretendido não venha descrita em literatura científica.

5- Método baseado em técnicas de ensaio, inovadoras, não descritas na literatura científica.

Geralmente as situações 1 e 2 são as mais frequentes, enquanto as situações 4 e 5 se encontram mais em Laboratórios de Investigação.

Avaliado o grau de exigibilidade requerido para um método interno será necessário realizar alguns estudos de validação antes de o colocar em rotina, durante a sua implementação ou sempre que ocorra uma alteração relevante do mesmo.

Os **requisitos mínimos** para a validação de métodos internos de ensaio dependem do tipo de método em causa e compreendem o estudo e conhecimento dos parâmetros seguintes:

- Gama de trabalho/Linearidade;
- Limiares analíticos (Detecção e Quantificação);
- Sensibilidade;
- Precisão;
- Exactidão.

Isto é, para análises qualitativas, não faz sentido determinar o limite de quantificação, a precisão, a exactidão e a linearidade/gama de trabalho. Neste tipo de análises, o limite de detecção, a selectividade/especificidade e a robustez são os pontos mais importantes na validação. Em análise quantitativa, e caso o método seja aplicado em gamas vestigiárias, já todos os requisitos acima citados são importantes. No caso de métodos quantitativos, com aplicações a gamas de concentrações elevadas, não faz sentido estudar os limiares analíticos. Para métodos inovadores, o estudo da robustez do método poderá ser um factor chave para validar o mesmo. Assim, cabe ao Laboratório analisar quais os parâmetros a incluir no seu plano de validação, perante o tipo de metodologia em questão.

O processo de validação envolve o estudo de parâmetros por **avaliação directa** e por **avaliação indirecta** e deverá pelo menos abranger as partes ou alterações cuja validação não tenha sido feita por um organismo reconhecido.

2.3 AVALIAÇÃO INDIRECTA

Este tipo de validação é efectuada por determinação e evidência dos seus parâmetros característicos.

2.3.1 ESPECIFICIDADE/SELECTIVIDADE

A Selectividade é a capacidade de um método identificar e distinguir um analito em particular numa mistura complexa sem interferência dos outros componentes. Esta característica é essencialmente função do princípio de medida utilizado, mas depende no entanto do tipo de compostos a analisar.

Diz-se que um método é específico quando permite discriminar o analito relativamente a outras substâncias, eventualmente presentes na amostra a analisar, ou seja, quando oferece garantias que a grandeza medida provém apenas do analito. Assim, será necessário averiguar a possível interferência de outras substâncias eventualmente presentes na amostra, utilizando para o efeito uma amostra complexa (multi-componente).

Para avaliar as interferências poder-se-á realizar um teste de recuperação utilizando uma série de amostras, com a mesma matriz, em que apenas varia a concentração do analito em proporções bem conhecidas e ao longo de toda a gama de trabalho. Convém que as amostras sejam analisadas em duplicado e em condições de repetibilidade.

Um método analítico pode ser considerado aplicável (específico e selectivo) quando na prática, e após a realização de testes de recuperação, se verificar que as taxas de recuperação são próximas de 100%. O êxito das taxas de recuperação depende obviamente do tipo de metodologia praticada, isto é, se para alguns métodos se admite intervalos de recuperação mais alargados devido às próprias características do método, para outros não poderão ser tolerados grandes intervalos. Caberá ao Laboratório, que realiza ensaios de recuperação, ter critérios de aceitação relativos às taxas de recuperação conseguidas, baseados em dados e factos credíveis.

2.3.2 QUANTIFICAÇÃO

Para interpretar as informações veiculadas pelos estudos e ensaios efectuados, o analista apoia-se no cálculo de vários parâmetros, entre os quais se destacam:

- Curvas de calibração;
- Limiares analíticos do método de ensaio;
- Sensibilidade.

2.3.2.1 Curvas de Calibração

Em análises quantitativas, a calibração indica um processo pelo qual a resposta dum sistema de medida se relaciona com uma concentração ou uma quantidade de substância conhecida.

Em métodos instrumentais de análise, a calibração analítica do equipamento processa-se geralmente do seguinte modo:

- O analista prepara uma série de soluções padrão em que a concentração do parâmetro a dosear é conhecida;
- Estas soluções padrão de calibração são medidas num equipamento analítico, nas mesmas condições das amostras a analisar;
- Estabelece-se um gráfico de calibração (sinal do equipamento em função da concentração) e determina-se a concentração do parâmetro nas amostras, por interpolação.

Considerações:

- É desejável que a calibração analítica seja efectuada aquando da análise, devendo existir critérios para aceitação das curvas de calibração relativos à linearidade e à estabilidade entre calibrações, definidos internamente. Recomenda-se o uso da norma ISO 8466-1 como referência para calibrações analíticas, designadamente para efectuar regressões lineares pelo método dos mínimos quadrados;
- Quando não é efectuada a curva de calibração diária, para cada série de amostras, caberá ao Laboratório definir um processo para verificação da validade da curva usada, face a critérios de aceitação de desvios (Ex: evidenciar a sua estabilidade através de um histórico de curvas de calibração);
- Os padrões de calibração devem distribuir-se equitativamente pela gama de trabalho;
- O branco de calibração (solução com todos os reagentes, com excepção do analito a analisar) é muitas vezes diferente de zero e deve ser incluído na curva de calibração, quando aplicável;
- Caso se utilize o método dos mínimos quadrados, o eixo vertical (eixo y) representa sempre a resposta instrumental do equipamento e, o eixo horizontal, (eixo x) representa sempre as concentrações dos padrões, uma vez que se assume que os erros associados aos valores de **x** são desprezáveis face aos de **y**. No caso do equipamento/software efectuar os cálculos de outro modo, o Laboratório deve evidenciar em que condições se obtêm resultados comparáveis;
- Quando a curva de calibração representa uma função polinomial do primeiro grau, isto é, uma recta, e caso se utilize o método dos mínimos quadrados para as regressões lineares, pressupõe-se que os erros têm uma distribuição normal e que existe homogeneidade de variâncias ao longo da recta.

A forma algébrica da equação de uma recta é dada por :

$$y = a + b x$$

Em que **a** representa a ordenada na origem e **b** o declive da recta.

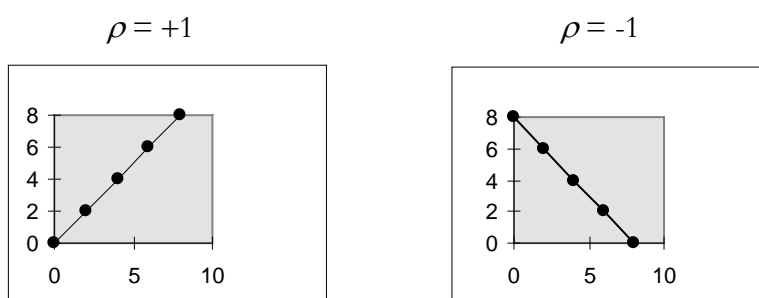
Esta recta é formada por um conjunto de pares ordenados e independentes, (x_1, y_1) ; (x_2, y_2) ; ...; (x_i, y_i) ; ...; (x_N, y_N) que deverá corresponder a N pontos marcados na recta. O ponto (x_1, y_1) pertence geralmente ao branco. A média de valores de x (concentração dos padrões utilizados) representa-se por \bar{x} e a média dos valores de y (sinal instrumental) representa-se por \bar{y} .

O cálculo do **coeficiente de correlação**, (ρ) pode ser usado como um dos parâmetros para avaliar uma calibração analítica :

$$\rho = \frac{\sum_{i=1}^N \{(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})\}}{\sqrt{\left[\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \cdot \left\{ \sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2 \right\} \right]}}$$

O valor do coeficiente de correlação, pode tomar valores entre -1 e $+1$ ($-1 \leq \rho \leq +1$). Na figura seguinte abaixo, verifica-se que um valor de $\rho = +1$ representa uma correlação positiva (recta de declive positivo) e que um valor de $\rho = -1$ representa uma correlação negativa (declive negativo).

Em análise química, dependendo dos critérios internos do Laboratório e do próprio método analítico, as curvas de calibração, geralmente, devem ter valores de coeficientes de correlação superiores a 0,995.



Gama de trabalho

Quando se utiliza uma metodologia que envolve o traçado de uma curva de calibração, a gama de trabalho pode ser avaliada pelo teste de homogeneidade das variâncias. Recomenda-se a norma ISO 8466-1 para modelos lineares e a norma ISO 8466-2 para modelos polinomiais de 2º grau. O recurso a ajustes polinomiais deve ser devidamente fundamentado.

Para métodos que não envolvam o traçado de curvas de calibração, a gama de trabalho terá de ser definida previamente e poderá ser função de alguns factores como a quantidade de amostra disponível, da boa visualização dos pontos de viragem e volumes gastos no caso de volumetrias.

Neste Guia será abordada a avaliação da gama de trabalho para métodos que utilizem modelos de calibração lineares, dado serem os mais frequentes. De acordo com a norma ISO 8466-1 são recomendados dez pontos de calibração, não devendo ser em número inferior a cinco, distribuindo-se de igual modo na gama de concentrações. O primeiro e o último padrão são analisados em 10 réplicas independentes. Para um exemplo com padrões como recomendado na ISO 8466-1 o quadro típico será :

i	x_i	$y_{i,1}$	$y_{i,2}$	$y_{i,3}$	$y_{i,4}$	$y_{i,5}$	$y_{i,6}$	$y_{i,7}$	$y_{i,8}$	$y_{i,9}$	$y_{i,10}$
1											
2											
3											
4											
5											
6											
7											
8											
9											
10											

representando x_i a concentração e y_{ij} o sinal instrumental.

Teste de homogeneidade de variâncias

Determinam-se as variâncias associadas ao primeiro e último padrão (S^2_1 e S^2_{10}) do seguinte modo:

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

sendo:

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^{10} y_{i,j}}{n_i}$$

para $i=1$ e $i=10$.

Sendo :

i - o número do padrão (neste caso i vai de 1 a 10)

j - o número de repetição efectuada para cada padrão

As variâncias são testadas para examinar se existem diferenças significativas entre elas, nos limites da gama de trabalho efectuando o cálculo do valor teste PG:

$$a) PG = \frac{S_{10}^2}{S_1^2}$$

$$b) PG = \frac{S_1^2}{S_{10}^2}$$

sendo :

a) quando $S^2_{10} > S^2_1$

b) quando $S^2_1 > S^2_{10}$

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

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

Linearidade

A linearidade pode ser avaliada através de um modelo estatístico, de acordo com a norma ISO 8466-1. A partir de um conjunto de pares ordenados, calcula-se a função de calibração linear (ISO 8466-1) e a função de calibração não linear (ISO 8466-2), bem como os respectivos desvios-padrão residuais, $S_{y/x}$ e S_{y2} .

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

$$DS^2 = (N - 2) \cdot S_{y/x}^2 - (N - 3) \cdot S_{y2}^2$$

em que N é o número de padrões de calibração.

Calcula-se o valor teste, PG:

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y2}^2}$$

Compara-se este valor de PG com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor / Fisher :

- Se $PG \leq F$: a função de calibração é linear.
- Se $PG > F$: a função de calibração é não linear.

No caso de $PG > F$, deve-se avaliar a possibilidade de reduzir a gama de trabalho. Caso se justifique recorrer à ISO 8466-2 ou a uma função susceptível de bom ajuste.

Para avaliar a linearidade poder-se-à também recorrer a uma representação gráfica da função juntamente com o cálculo e análise do coeficiente de correlação. Este teste de linearidade deve ser bem interpretado, pois os coeficientes de correlação são bons indicadores de correlação, mas não necessariamente de linearidade.

A análise da gama de trabalho e da linearidade, tal como descrito anteriormente, deve ser encarada como um estudo que deve ser realizado durante a fase de validação/implementação do método de ensaio, ou sempre que se justifique. Todavia, no caso da gama de trabalho estar já definida em referência bibliográfica reconhecida, pode tornar-se desnecessário analisa-la. Isto é, em rotina, apenas a linearidade da curva de calibração utilizada num determinado método analítico deverá ser sempre avaliada através da sua representação gráfica juntamente com a análise do coeficiente de correlação.

Método dos mínimos quadrados

Por este método demonstra-se que os coeficientes **a** (ordenada na origem) e **b** (declive) da recta de regressão de **y** em **x**, $y = a + b x$, são dados por:

$$b = \frac{\sum_{i=1}^N [(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})]}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

$$a = \bar{y} - b \cdot \bar{x}$$

Sendo :

x_i - valores individuais de concentração

y_i - valores individuais de sinal instrumental

\bar{x} - média de valores de **x** (concentração dos padrões utilizados)

\bar{y} - média dos valores de **y** (sinal instrumental)

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

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

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

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

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

$$S_a = S_{y/x} \cdot \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N x_i^2}{N \cdot \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}}$$

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

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

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

Nota prática : a utilização de software, como a folha de cálculo “Microsoft Excel”, através de algumas ferramentas disponíveis (“Ferramentas - Analisar Dados - Regressão), permite aceder facilmente aos parâmetros estatísticos aqui citados.

A concentração do analito na amostra (x_0) pode ser obtida a partir das equações seguintes :

a) Valor obtido a partir de um sinal instrumental y_0 :

$$\bar{x} = \frac{y_0 - a}{b}$$

b) Valor médio obtido a partir de uma série de replicados, independentes, \bar{y}_0 sobre uma mesma amostra :

$$\bar{x} = \frac{\bar{y}_0 - a}{b}$$

A incerteza do valor interpolado de uma concentração x_0 qualquer, é a combinação da incerteza da determinação do valor medido e a incerteza da estimativa dos coeficientes de regressão. Da propagação dos erros, segue-se que para cada valor de concentração x_0 , existe um intervalo de confiança do verdadeiro valor de y_0 , cujos limites descrevem duas hipérbolas que envolvem a recta de calibração. Assim, o desvio padrão estimado para uma concentração qualquer x_0 é dado por :

$$S_{x_0} = \frac{S_{y/x}}{b} \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{y}_0 - \bar{y})^2}{b^2 \cdot \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}}$$

Sendo :

n – número de ensaios independentes (replicados) efectuados para a amostra

Os limites de confiança de x_0 podem ser calculados pela equação:

$$x_0 \pm t \cdot S_{x_0}$$

em que t representa a variável de Student para $(N-2)$ graus de liberdade, a determinado nível de confiança.

O desvio padrão do método (S_m) é uma característica que permite ao analista verificar a qualidade do seu trabalho:

$$S_m = \frac{S_{y/x}}{b}$$

O coeficiente de variação do método, CV_m , expresso em %, é dado por:

$$CV_m = \frac{S_m}{x} \cdot 100$$

2.3.2.2 Limiares Analíticos do Método de ensaio

Existem várias formas de calcular os limiares analíticos. Em seguida são sugeridas algumas abordagens, recomendadas na bibliografia internacional, que poderão ser utilizadas para determinar estes parâmetros da Qualidade.

Limite de Detecção (L.D.)

Teor mínimo medido, a partir do qual é possível **detectar** a presença do analito com uma certeza estatística razoável. Este limiar analítico corresponde à mais pequena quantidade de substância a analisar que pode ser detectada numa amostra, mas não necessariamente quantificada como valor exacto.

Uma leitura inferior ao limite de detecção não significa, obviamente, a ausência do analito a medir. Apenas se pode afirmar que, com uma probabilidade definida, a concentração do componente em causa será inferior a um certo valor.

Em termos qualitativos, o conceito de limite de detecção corresponde à concentração mínima que é possível distinguir do branco, ou seja, de uma amostra que contém a mesma matriz mas não contém o analito (note-se que existem vários tipos de brancos).

Para uma correcta definição do limite de detecção é necessário introduzir dois conceitos de estatística: erro do tipo I e erro do tipo II.

- O erro do tipo I (risco α) é a probabilidade de concluir pela presença do componente em análise quando de facto não existe esse componente na amostra;
- O erro do tipo II (risco β) é a probabilidade de concluir pela ausência do componente em análise, quando ele de facto existe.

Para uma correcta análise dos limiares analíticos, estes dois tipos de erros devem ser minimizados, optando-se por usar as recomendações da IUPAC ($\alpha = \beta = 5\%$).

Em termos quantitativos o limite de detecção é obtido por:

a) Caso geral

$$\mathbf{L.D.} = \mathbf{X_0} + \mathbf{K} \cdot \mathbf{\sigma_0}$$

em que :

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

Se a lei de probabilidade de $\mathbf{X_0}$ é suficientemente conhecida e partindo do princípio que é gausseana (distribuição normal de erros) então toma-se o valor de $\mathbf{K} \cong 3,3$ para um nível de confiança de cerca de 99,7%.

Assim, $\mathbf{L.D.} \cong \mathbf{X_0} + \mathbf{3,3} \cdot \mathbf{\sigma_0}$

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

Neste caso ter-se-á :

$$L.D. = \frac{\left[3,3 \cdot S_{y/x} \right]}{b}$$

em que :

- $S_{y/x}$ é o desvio padrão residual da curva de calibração (ver método dos mínimos quadrados)
- b é o declive da mesma.

Limite de Quantificação (L.Q.)

Corresponde à menor pequena concentração medida a partir da qual é possível a **quantificação** do analito, com uma determinada exactidão e precisão. Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). Este limiar, após ter sido determinado, deve ser testado para averiguar se a exactidão e precisão conseguida é satisfatória. Este teste pode ser realizado através da passagem, em condições de precisão intermédia, de uma série de padrões internos, cuja concentração é próxima ou igual ao limiar de quantificação. Segundo as recomendações da IUPAC, o coeficiente de variação (desvio padrão a dividir pela média dos valores encontrados) para estes padrões não deve exceder 10%.

Quantitativamente, o limite de quantificação é determinado por :

a) Caso geral

$$L.Q. = X_0 + 10 \sigma_0$$

em que:

- X_0 é a média aritmética do teor medido de uma série de brancos (entre 10 e 20 ensaios), preparados de forma independente e lidos ao longo de vários dias de trabalho, isto é, reproduzindo o mais possível a situação de rotina;
- σ_0 representa o desvio padrão associado a X_0 .

b) Caso do Padrão vestígio ou branco fortificado

Poder-se-á utilizar para estimar o L.Q. um conjunto de padrões vestígio ou brancos fortificados, independentes, testados em condições de precisão intermédia, e sobre os quais serão feitos estudos de exactidão e precisão (erro relativo em relação ao Padrão vestígio e coeficiente de variação, respectivamente). Adoptar-se-á como estimativa do L.Q., a concentração utilizada, desde que os parâmetros antes citados revelem níveis aceitáveis (por exemplo : inferiores ou iguais a 10%)

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

$$L.Q. = \frac{\left[10 \cdot S_{y/x} \right]}{b}$$

em que :

- $S_{y/x}$ é o desvio padrão residual da curva de calibração (ver método dos mínimos quadrados)
- b é o declive da mesma.

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

A actualização destes Limites (Detecção e Quantificação) deverá ser efectuada :

- Sempre que ocorrem alterações de factores de influência tais como analista, reagentes, equipamento, ambiente, entre outros;
- Sempre que se faz nova curva de calibração e se utilize a alínea c), poderá ser feito um estudo ao longo do tempo e adoptar como limiares analíticos a média aritmética dos limites de detecção e de quantificação de uma série significativa de curvas de calibração, desde que se observe estabilidade nos valores de limiares obtidos.

Nos casos em que se utiliza, no traçado de uma curva de calibração, escalas não lineares, como é o caso de gráficos semi-logarítmicos, os **limiares analíticos** deverão ser avaliados de forma diferente e caso a caso. Um exemplo típico deste tipo de abordagem é o dos métodos potenciométricos, em que se usa a

técnica da intersecção dos segmentos lineares. Recomenda-se, neste caso, a consulta da norma ASTM D4127.

2.3.2.3 Sensibilidade

A sensibilidade pode ser definida como o quociente entre o acréscimo do valor lido ΔL e a variação da concentração ΔC correspondente aquele acréscimo.

$$Sensib. = \frac{\Delta L}{\Delta C}$$

Esta característica avalia a capacidade de um método (ou equipamento) para distinguir pequenas diferenças de concentração de um analito. Assim, a sensibilidade é definida como sendo a derivada de primeira ordem da curva de calibração nessa zona de concentração.

Se a curva de calibração for definida por um modelo linear, a sensibilidade será constante ao longo de toda a gama de trabalho e igual ao declive dessa recta de calibração.

Se a curva de calibração for definida por uma função quadrática (polinómio de 2º grau do tipo $y = c.x^2 + d.x + e$), a sensibilidade será dada por $y = 2.c.x + d$ nesse ponto de concentração.

A sensibilidade tem bastante interesse pelo seu aspecto relativo, isto é:

- quando se pretende averiguar a evolução desta grandeza ao longo do tempo;
- quando se compara a sensibilidade de vários métodos analíticos, baseados em modelos lineares, para um mesmo analito;
- quando se compara a sensibilidade para vários analitos.

Este conceito de sensibilidade (associado à magnitude do sinal), não deve ser confundido com limite de detecção (associado à capacidade de resolução do sinal).

2.3.3 PRECISÃO

A precisão é um termo geral que pretende avaliar a **dispersão** de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. É importante salientar que será mais realista estudar preferencialmente a precisão sobre amostras, para minimizar efeitos de matriz.

Existem duas medidas extremas para avaliar esta **dispersão**, designadas por repetibilidade e reprodutibilidade. Entre estas duas medidas extremas de precisão existe uma situação intermédia que se designa por precisão intermédia ou variabilidade intralaboratorial. Convém referir que geralmente a precisão varia com a gama de concentrações.

2.3.3.1 Repetibilidade

A repetibilidade exprime a precisão de um método de ensaio efectuado em condições idênticas, isto é, refere-se a ensaios efectuados sobre uma mesma amostra, em condições tão estáveis quanto possível, tais como:

- mesmo Laboratório;
- mesmo analista;
- mesmo equipamento;
- mesmo tipo de reagentes
- curtos intervalos de tempo.

O limite de repetibilidade (r) é o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade específica (normalmente 95%), a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio (X_i , X_{i-1}), obtidos nas condições acima referidas.

Na prática aceitam-se os resultados de duas determinações efectuadas em condições de repetibilidade se $|X_i - X_{i-1}| \leq r$. Caso a amplitude entre os dois ensaios seja superior ao limite, dever-se-à, numa primeira fase, fazer uma análise crítica e, caso seja necessário, recorrer à repetição de ensaios segundo um plano assente em dados bibliográficos ou normas, nomeadamente a Norma ISO 5725-2 e ISO 5725-6.

Determinação da repetibilidade

A repetibilidade pode ser determinada através de um ensaio interlaboratorial ou a partir de ensaios efectuados no próprio Laboratório.

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

Quando se pretende avaliar a repetibilidade através de um ensaio interlaboratorial, o número de medições, em cada nível de concentrações, poderá ser inferior ($n \geq 2$). Em ambos os casos, o cálculo é efectuado separadamente para cada nível de concentração i , a partir dos resultados obtidos e eliminando os valores aberrantes (ISO 5725-2, ASTM E178).

A estimativa da variação (S_r^2) de um método de análise pode ser determinada pela média ponderada das estimativas das variações de w séries de análises estudadas nas condições de repetibilidade. Tendo em conta que a repetibilidade pode variar com o teor do elemento a dosear, esta última condição assegura, em princípio, a igualdade estatística das variações de w séries de análises. Assim, a variância associada à repetibilidade do método de ensaio, para cada nível i de concentração :

$$S_{ri}^2 = \frac{\sum_{w=1}^p [(n_{wi} - 1) \cdot S_{wi}^2]}{\sum_{w=1}^p (n_{wi} - 1)}$$

sendo:

S_{ri}^2 - variância de repetibilidade associada aos resultados considerados, para cada Laboratório;

S_{wi}^2 - variância associada aos resultados considerados, para cada Laboratório;

$(n_{wi}-1)$ - graus de liberdade da série de análises;

p - número de Laboratórios participantes.

Para um nível de confiança de 95 %, o limite de repetibilidade (r) é avaliado segundo :

$$r = t \cdot \sqrt{2} \cdot S_{ri} = 1,96 \cdot \sqrt{2} \cdot S_{ri}$$

sendo:

S_{ri} – desvio padrão de repetibilidade associada aos resultados considerados;

isto é:

$$r = 2,8 \cdot \sqrt{S_{ri}^2}$$

Caso o Laboratório obtenha mais de dois resultados, o limite de repetibilidade (r) é calculado de acordo com Norma ISO 5725-6.

O Coeficiente de Variação de Repetibilidade (CV_r), para cada nível de concentrações, expresso em percentagem, é dado por :

$$CV_r = \frac{S_{ri}}{\bar{x}} * 100$$

sendo :

CV_r numericamente igual ao desvio padrão de repetibilidade (S_{ri}) a dividir pela média dos valores considerados (\bar{x}).

2.3.3.2 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade refere-se à **precisão** de um método efectuado em condições de ensaio diferentes, utilizando o mesmo método de ensaio, sobre uma mesma amostra, fazendo-se variar as condições de medição, tais como:

- diferentes laboratórios;
- diferentes operadores;
- diferentes equipamentos;
- e/ou épocas diferentes;

O limite de reprodutibilidade (R) é o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade específica (normalmente 95%), a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio, obtidos nas condições referidas.

Determinação da reprodutibilidade

A reprodutibilidade de um método de análise é obtida a partir de ensaios interlaboratoriais. Assim, é enviada uma série de amostras aos p laboratórios participantes, os quais realizam ensaios sobre a mesma amostra.

O valor da variância associada à reprodutibilidade é calculado do seguinte modo:

$$S_{Ri}^2 = S_{Li}^2 + S_{ri}^2$$

sendo :

S_{Ri}^2 - variância da reprodutibilidade;

S_{Li}^2 - variância interlaboratorial (variância dos erros sistemáticos)

S_{ri}^2 - variância da repetibilidade (variâncias dos erros aleatórios).

$$S_{Li}^2 = \frac{S_{di}^2 - S_{ri}^2}{n_i}$$

$$S_{di}^2 = \frac{1}{p-1} \cdot \sum_{w=1}^p n_{wi} \cdot \left(\bar{x}_{wi} - \bar{x}_i \right)^2$$

$$\bar{x}_i = \frac{1}{p-1} \cdot \left[\sum_{wi=1}^p n_{wi} - \frac{\sum_{w=1}^p n_{wi}^2}{\sum_{w=1}^p n_{wi}} \right]$$

sendo:

S_{ri}^2 - variância de repetibilidade associada aos resultados considerados, para cada Laboratório;

S_{wi}^2 - variância associada aos resultados considerados, para cada Laboratório;

n_{wi} – número de ensaio efectuados pelo Laboratório para um determinado nível de concentrações;

p - número de Laboratórios participantes.

\bar{x}_{wi} - média aritmética dada pelo Laboratório para um determinado nível de concentração. (Quando apresentam dois traços em cima, representa a média das médias dessa grandeza x).

Nota :

- Caso a variância interlaboratorial (S_{Li}^2) seja negativa, assume-se que esta toma o valor zero.

Do mesmo modo que a repetibilidade e , para um nível de confiança de 95%, o limite de reprodutibilidade (R) é avaliado segundo :

$$R = t \cdot \sqrt{2} \cdot S_{Ri} = 1,96 \cdot \sqrt{2} \cdot S_{Ri} \quad (\text{ISO 5725-6})$$

isto é :

$$R = 2,8 \cdot \sqrt{S_{Rj}^2}$$

sendo:

t – valor tabelado de t de Student;

S_{Ri}^2 - variância de reprodutibilidade associada aos resultados considerados, para cada Laboratório;

S_{Ri} – Desvio padrão de reprodutibilidade associada aos resultados considerados, para cada Laboratório.

Caso se obtenha mais de um resultado, por cada laboratório, o limite de reprodutibilidade é calculado de acordo com a Norma ISO 5725-6.

O cálculo da reprodutibilidade é efectuado para cada nível, separadamente, após eliminação dos valores aberrantes (ISO 5725-2, ASTM E178).

O Coeficiente de Variação de Reprodutibilidade (CV_R), expresso em percentagem, é dado por :

$$CV_R = \frac{S_{Ri}}{\bar{x}} \cdot 100$$

sendo :

CV_R numericamente igual ao desvio padrão de reprodutibilidade (S_{Ri}) a dividir pela média dos valores considerados (\bar{x}).

Relação funcional entre os desvios padrões de repetibilidade e/ou reprodutibilidade e a média (\bar{x}) de valores de cada nível

Convém pesquisar se o desvio padrão de repetibilidade e/ou de reprodutibilidade dependem da média de valores para cada nível de concentração e, se assim acontecer, é conveniente determinar o tipo de relação funcional existente, de forma a permitir relacionar qualquer média de resultados com o respectivo desvio padrão de repetibilidade e/ou de reprodutibilidade.

Três tipos de relação serão tidos em consideração :

- a) $S_{r/R} = b \cdot x$ Recta passando pela origem
- b) $S_{r/R} = a + b \cdot x$ Recta com ordenada na origem positiva
- c) $\log S_{r/R} = c + b \cdot \log x$ relação logarítmica / relação exponencial

Sendo:

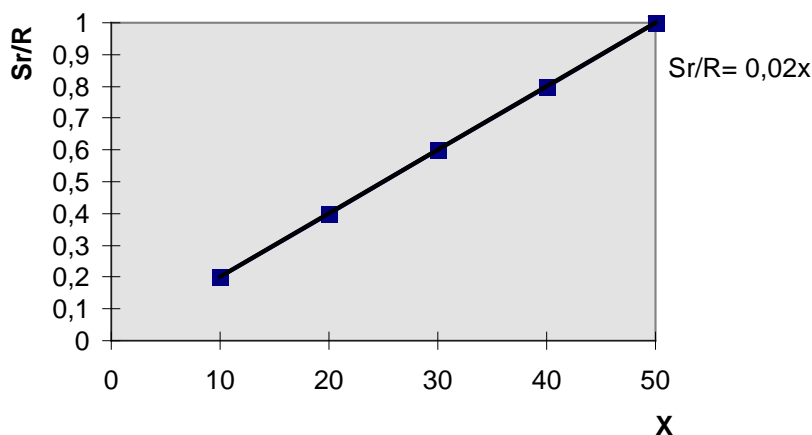
a – ordenada na origem;

b – declive;

c - ordenada na origem quando se trata de uma relação logarítmica.

NOTA - O facto de colocar $S_{r/R}$ significa que os cálculos tanto se aplicam à repetibilidade como à reprodutibilidade.

Exemplo:



Normalmente, uma destas relações (**a**, **b** ou **c**) ajusta-se de forma satisfatória. caso contrário, poder-se-à optar por um método numérico com procedimento matemático de ajuste alternativo, de acordo com o previsto na Norma ISO 5725-2.

As duas medidas de dispersão referidas representam os extremos da variabilidade de um método de ensaio, sendo a repetibilidade uma medida de variabilidade mínima e a reprodutibilidade uma medida de variabilidade máxima dos resultados. Entre estas medidas extremas, existe uma situação intermédia, que se designa por precisão intermédia (ISO 5725-3).

2.3.3.3 Precisão Intermédia

A precisão intermédia refere-se à precisão avaliada, sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exactamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como:

- diferentes analistas;
- diferentes equipamentos;
- diferentes épocas;
- com/sem verificação da calibração.

Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados num laboratório e, como tal, mais aconselhável de usar, pelo que se desenvolverá, neste guia, apenas a situação intralaboratorial.

Para determinar a precisão intermédia de um método, efectua-se **n** medições em replicado, duplicado ou em ensaio único, sobre a amostra, nas condições pré-definidas, pois existem vários métodos de estudar este tipo de precisão. Quando aplicável, este procedimento é repetido sobre outras amostras, abrangendo outras gamas de concentração.

Na maioria dos casos, o valor da precisão intermédia é função da gama de concentração do ensaio e o seu cálculo é efectuado, preferencialmente, a partir dos resultados obtidos, após eliminação dos resultados aberrantes (ISO 5725-2, ASTM E178). A visualização gráfica dos valores também pode ser útil para identificar a existência de valores aberrantes (ISO 5725-3).

Dependendo do ensaio e do tipo de aplicação do estudo da precisão intermédia, existem vários métodos para determinação e controlo desse parâmetro de qualidade, nomeadamente :

- Através de Cartas de Controlo de Amplitudes, que poderão ser aplicadas, entre outras, para réplicas, para duplicados de amostra e para padrões estáveis ao longo do tempo (ISO 5725-6 , ISO 8258)

- Através da expressão :

$$S_{i(\)} = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2} \quad (\text{ISO 5725-3})$$

Sendo:

Si() - desvio padrão de precisão intermédia (onde os símbolos relativos às condições intermédias de precisão podem aparecer entre parêntesis, Ex: **Si(T.O.)** significa tempo e Operadores diferentes)

t - nº de amostras ensaiadas (não confundir com *t* de Student);

n - nº ensaios efectuados por amostra,

j - nº da amostra (que vai de 1 a *t* amostras);

k - nº do resultado obtido para a amostra *j* (que vai de 1 a *n*);

y_{jk} – resultado individual (k) para a amostra j de 1 a t

\bar{y}_j – representa a média aritmética dos resultados da amostra j de 1 a t

Neste caso, a determinação da precisão intermédia é feita através da recolha de t valores de n ensaios de amostras ou padrões. A precisão intermédia, tal como mostra a expressão de cálculo, é baseada na dispersão entre ensaios. É recomendado que o valor de “ $t(n-1)$ ” seja, pelo menos, igual a 15.

Quando $n = 2$, esta última equação toma a forma :

$$Si_{()} = \sqrt{\frac{1}{2 \cdot t} \cdot \sum_{j=1}^t (y_{j1} - y_{j2})^2}$$

Sendo:

Y_{j1} – primeiro resultado obtido para a amostra j ;

Y_{j2} - segundo resultado obtido para a amostra j .

Um método simplificado para estimar a precisão intermédia baseia-se na execução de n medições ($n \geq 15$), em condições pré-definidas, sobre:

- uma mesma amostra;
- amostras supostamente idênticas;
- padrões.

A estimativa da precisão intermédia $Si_{()}$, neste caso, é dada por :

$$Si_{()} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (y_k - \bar{y})^2} \quad (\text{ISO 5725-3})$$

em que $Si_{()}$ é o desvio padrão de precisão intermédia relativo a essa gama e onde os símbolos relativos às condições intermédias de precisão podem aparecer entre parêntesis (Ex: $Si_{(T.O.)}$ significa tempo e Operadores diferentes). Este método revela-se menos eficiente quando comparado com os anteriores.

Sendo:

n – nº de amostras / padrões;

Y_k – resultado individual obtido;

\bar{y} – representa a média aritmética dos resultados individuais obtidos.

Recomenda-se a leitura da Norma ISO 5725-3 para aprofundar conhecimentos nesta área. Na Norma ISO 5725-6 são expostos vários exemplos práticos de estimativa e controlo da precisão intermédia, através das cartas de controlo, pelo que se recomenda a consulta desta norma.

2.3.3.4 Comparação da Precisão Entre Métodos

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. Este baseia-se no cálculo da razão (PG) entre as variâncias dos dois métodos ($PG = S_A^2/S_B^2$). Estas variâncias devem ser colocadas de modo a que esta razão seja maior ou igual a um. Em seguida é comparado o valor desta razão com o valor de F de Snedecor, atendendo aos graus de liberdade em questão. Se $PG \leq F$, os dois métodos não apresentam diferenças significativas entre si, relativamente às suas precisões.

2.3.4 EXACTIDÃO

Este parâmetro característico é determinado através de uma avaliação directa (ver 2.4).

2.3.5 ROBUSTEZ

A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Um método diz-se robusto se se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando este está a ser executado.

Para determinar a robustez de um método de ensaio, pode-se recorrer ao teste de YOUNDEN. Trata-se de um teste simples, que permite não só avaliar a robustez do método, como também seriar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência (por excesso ou por defeito) de cada uma dessas variações. Convém salientar que quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança desse relativamente à sua precisão.

Este teste baseia-se na realização de um determinado número de ensaios sobre uma amostra (normalmente até oito, pois acima deste número a análise da robustez torna-se difícil), realizados segundo um plano de controlo de factores (até um máximo de sete), susceptíveis de influenciarem o processo. Os ensaios devem ser realizados em replicados, de forma a não causar interpretações erradas. Chamam-se factores aos parâmetros cujos efeitos de flutuação se pretendem quantificar através dos resultados dos ensaios. Assim, é avaliado o efeito de cada factor em estudo, através de uma análise dos resultados experimentais.

O procedimento para elaboração do teste de YOUNDEN é o seguinte:

- a) Análise pormenorizada através das prescrições do método e da experiência pessoal e histórica, para a selecção de sete factores (A, B, C, D, , G) ou de três factores de interesse (A, B, C), independentes entre si e susceptíveis de influenciarem os resultados finais das determinações.
- b) Fixação dos valores nominal e alternativo para quantificação dos desvios dos factores em relação aos valores prescritos. Representa-se normalmente o valor nominal por “1” e o valor alternativo por “-1”.
- c) Fixação das condições de realização da série de ensaios tais como :
 - procedimentos de ensaio
 - registos de resultados.
- d) Elaboração de um quadro típico para o plano de ensaios:

Utilizando três factores,

	A	B	C	REi
1° ENSAIO	1	1	1	RE1
2° ENSAIO	1	-1	-1	RE2
3° ENSAIO	-1	1	-1	RE3
4° ENSAIO	-1	-1	1	RE4
	RA	RB	RC	

Utilizando sete factores,

	A	B	C	D	E	F	G	REi
1º ENSAIO	1	1	1	1	1	1	1	RE1
2º ENSAIO	1	1	-1	1	-1	-1	-1	RE2
3º ENSAIO	1	-1	1	-1	1	-1	-1	RE3
4º ENSAIO	1	-1	-1	-1	-1	1	1	RE4
5º ENSAIO	-1	1	1	-1	-1	1	-1	RE5
6º ENSAIO	-1	1	-1	-1	1	-1	1	RE6
7º ENSAIO	-1	-1	1	1	-1	-1	1	RE7
8º ENSAIO	-1	-1	-1	1	1	1	-1	RE8
	RA	RB	RC	RD	RE	RF	RG	

em que :

- REi - resultado experimental obtido pela combinação do ensaio i;
- A, B, C,.....G - factores em análise (valor nominal/valor alternativo);
- Ri (A G) - efeitos de cada factor (i).

e) Tratamento dos resultados experimentais obtidos, nas condições de aplicação do teste e cálculo dos efeitos através das equações seguintes :

$$Ri = \frac{\sum REi(1) - \sum REi(-1)}{\sum REi(1)}$$

ou

$$Ri = \frac{\sum REi(1) - \sum REi(-1)}{Z}$$

em que Z corresponde a metade do número de ensaios (para o caso de sete factores e oito ensaios, Z = 4).

Recomenda-se o cálculo pela segunda fórmula do Ri. No entanto os resultados são comparáveis pelas duas fórmulas.

Resolve-se o sistema de equações lineares para cada factor/nível, atendendo a que existem quatro experiências em que o factor foi mais alterado e outras quatro em que este foi menos alterado:

Por exemplo, para o factor **A** :

$$RA = \frac{RE1 + RE2 + RE3 + RE4 - (RE5 + RE6 + RE7 + RE8)}{4}$$

f) Ordenação dos valores de efeitos obtidos

g) Crítica dos valores obtidos

h) Controlo mais rigoroso dos factores de maior influência.

O teste de YOUNDEN assenta nos seguintes pressupostos :

- um elevado conhecimento do método em estudo e de todos os factores que potencialmente o podem influenciar, os quais devem ser os escolhidos nesta análise;
 - não entrar em linha de conta com a variabilidade associada ao método de ensaio em estudo;
 - o laboratório deverá garantir que todos os factores, que não foram objecto de estudo, se mantêm constantes.
- Nota : Para aprofundar conhecimentos nesta matéria recomenda-se a consulta do Standard Methods for Water and Wastewater.

Situação alternativa:

Testar o método em condições de precisão intermédia, isto é, fazendo variar as condições operatórias dentro do próprio laboratório, tal como definido na parte 2.3.3.3, ao longo de um elevado número de dias, obtendo um número significativo de resultados. Em seguida, deverá ser elaborada uma análise detalhada e cuidada dos resultados em termos de precisão do método.

Esta situação alternativa não oferece as vantagens do teste de YOUDEN, sendo no entanto um processo capaz de fornecer uma informação valiosa acerca do comportamento da metodologia em condições de trabalho diferentes.

Como é óbvio, esta fase da validação será feita numa fase final de todo o processo de validação do método de ensaio.

2.4 AVALIAÇÃO DIRECTA

Este tipo de avaliação visa essencialmente conhecer a **exactidão** dos métodos de ensaio. Esta é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como convencionalmente verdadeiro.

O termo **exactidão**, quando aplicado a uma série de resultados de ensaio, implica uma combinação de componentes de erros aleatórios e componentes de erros sistemáticos.

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exactidão de uma metodologia são, entre outros, os seguintes :

- Materiais de Referência Certificados;
- Ensaio Interlaboratoriais;
- Testes comparativos.

2.4.1 MATERIAIS DE REFERÊNCIA CERTIFICADOS

Sempre que possível, os Materiais de Referência Certificados (MRC) devem ser usados no processo de validação de um método de ensaio. Além disso, estes materiais constituem uma excelente ferramenta no Controlo Externo da Qualidade de uma análise química.

Um MRC possui um valor de concentração (ou outra grandeza) para cada parâmetro e uma incerteza associada (em alguns casos, nomeadamente quando se está perante um MRC multi-componente, pode acontecer que nem todos os parâmetros tenham incerteza atribuída). A aquisição de um MRC terá de

ser feita a um organismo fornecedor reconhecido e credível. Divulgam-se em seguida algumas entidades que comercializam MRC's :

- **IRMM** – Institute for Reference Materials and Measurements – anteriormente designado por BCR;
- **NIST** - National Institute of Standards and Technology, dos Estados Unidos da América;
- US Geological Survey dos Estados Unidos da América;
- US Environmental Protection Agency dos Estados Unidos da América;
- National Research Council do Canadá;
- Agência Internacional de Energia Atómica.

Recomenda-se a consulta dos Guias ISO 30, 31, 33 e 35, da base de dados internacional para materiais de referência “COMAR” (disponível no Instituto Português da Qualidade), assim como “navegar” nas páginas da INTERNET, para aprofundar conhecimentos nesta área.

O uso correcto dos MRC consiste na sua análise para avaliar o desempenho do Laboratório. O valor obtido na análise de um MRC deve ser comparado com o valor certificado, determinando-se o erro e exactidão da análise. Quando o valor obtido não se encontrar dentro do intervalo de incerteza indicado para o valor certificado, o Laboratório deve procurar as causas desse desvio e tentar eliminá-las ou aceitá-las. Conforme o rigor definido para os seus resultados, o Laboratório pode adoptar critérios diferentes para aceitação dos resultados dos MRC.

Em seguida, apresentam-se alguns processos para avaliação dos resultados obtidos da análise de um MRC :

- Erro relativo;
- Teste de hipóteses (teste t);
- Factor de desempenho Z (“Z-score”);
- Erro normalizado.

Erro Relativo

Uma forma de avaliar a exactidão de um método de ensaio é através do cálculo do *erro relativo* (Er), expresso em percentagem (%). Este é calculado pela expressão:

$$Er = \frac{(X_{lab} - X_v)}{X_v} \cdot 100$$

em que:

X_{lab} - valor obtido experimentalmente (ou a média aritmética de valores obtidos);

X_v - valor aceite como verdadeiro, ou seja, o valor certificado do MRC.

O **erro relativo** exprime a componente de erros sistemáticos. Cabe ao Laboratório definir qual o seu grau de exigência em termos de exactidão do método em estudo, o qual deve assentar sempre que possível em dados bibliográficos referentes ao método em questão ou na ausência de tais dados, em critérios de bom senso. Um valor de "Er" inferior ou igual a 5 % em alguns casos pode ser satisfatório, sendo no entanto este valor meramente indicativo.

Teste de hipótese (teste t)

O Laboratório poderá também averiguar a existência de erros sistemáticos associados à metodologia praticada, através de um teste de hipótese:

teste t

$$t = \frac{(X_{lab} - X_v) \cdot \sqrt{N}}{S_{x_{lab}}}$$

sendo :

X_{lab} - média dos valores experimentais obtidos pelo laboratório na análise do MRC;

N - número de amostras ensaiadas;

$S_{x_{lab}}$ - o desvio padrão associado à média dos valores do laboratório (**X_{lab}**).

Em seguida o valor t (em módulo) é comparado com o valor crítico t_{tab} (tabelado para determinado grau de confiança e $N-1$ graus de liberdade) e toma-se como critério de aceitação :

- Se $|t| \geq t_{tab}$, **não ficou** estatisticamente evidenciada a existência de erros sistemáticos e logo o ensaio é satisfatório;
- Se $|t| > t_{tab}$, **ficou** estatisticamente evidenciada a existência de erros sistemáticos e logo o ensaio é **não** satisfatório.

Factor de desempenho Z (“Z-score”)

Outra forma de avaliar o desempenho do Laboratório na análise de um MRC é o cálculo do factor de desempenho Z :

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

sendo :

X_{lab} - valor obtido pelo Laboratório;

X_v - valor aceite como verdadeiro, ou seja, o valor certificado do MRC;

S - unidade de desvio, que pode ser a incerteza do MRC ou ainda outra unidade de desvio interna.

A avaliação poderá ser feita (Guia ISO/CEI 43) de acordo com seguinte escala de pontuação:

$|Z| \leq 2$: Satisfatório

$2 < |Z| \leq 3$: Questionável

$|Z| > 3$: Incorrecto

O factor de desempenho Z é função da unidade de desvio adoptada, isto é, poder-se-à utilizar outra escala de pontuação que não a citada anteriormente.

Erro Normalizado

Caso o laboratório calcule a incerteza do seu resultado (U_{lab}), o valor verdadeiro (X_v) deve estar dentro do intervalo de incerteza de X_{lab} . Quando tal não acontece, este intervalo poderá estar subestimado. Nestes casos, é geralmente empregue o conceito de erro normalizado (En) para efectuar a avaliação do desempenho (Guia ISO/CEI 43):

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

Em que :

U_{ref} - incerteza associada ao valor verdadeiro.

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

Sempre que nos processos de avaliação utilizados não se verificarem as condições satisfatórias, deverá ser elaborado um plano de acções correctivas de forma a procurar as causas do sucedido, corrigi-las e reavaliar-se o ensaio.

A periodicidade da análise dos MRC's deve ser estipulada em função da frequência de análises efectuadas, de estas serem de rotina ou de carácter pontual, do grau de conhecimento das amostras, da complexidade das técnicas e do grau de confiança exigido para o resultado.

2.4.2 ENSAIOS INTERLABORATORIAIS

Existem diversos tipos de ensaios interlaboratoriais, consoante os objectivos a que se destinam. Refira-se, entre outros :

- Ensaio Interlaboratorial de Aptidão : destina-se a avaliar o desempenho dos laboratórios participantes (Guia ISO 43), funcionando nalguns países como uma condição para a acreditação do laboratório. Se possível, deve estar rastreado a um MRC, podendo geralmente os participantes usar os métodos que entenderem;

- Ensaio Interlaboratorial de Normalização : destina-se a estudar as características de um método de análise, nomeadamente a sua reprodutibilidade e repetibilidade. Neste caso, é condição de acesso a utilização exclusiva do método em causa.

Quando o Laboratório pretenda avaliar a repetibilidade e a reprodutibilidade (parâmetros característicos) de um método, demonstrando em simultâneo que tem uma precisão compatível com a de outros laboratórios, pode recorrer a um ensaio do tipo de normalização. Quando tem por objectivo evidenciar a exactidão dos seus resultados, então pode participar em ensaios do tipo de aptidão.

Os resultados obtidos pelo laboratório nos ensaios interlaboratoriais em que participa devem ser objecto de uma análise cuidada, de que resulta um plano de acções correctivas.

Avaliação do Desempenho

A avaliação do desempenho do Laboratório participante é feita pela entidade organizadora. Em geral é usada a seguinte fórmula (“Z-score”):

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

em que:

X_{lab} - valor obtido pelo Laboratório;

X_v - valor aceite como verdadeiro, isto é, o estabelecido no ensaio interlaboratorial;

S - unidade de desvio, que pode ser o desvio padrão da média dos laboratórios no ensaio interlaboratorial, a incerteza de X_v , ou outro desvio que assente em critérios de exigência da entidade organizadora.

A avaliação pode ser feita segundo a seguinte escala de pontuação:

$$\begin{aligned} |Z| \leq 2 & : \text{Satisfatório} \\ 2 < |Z| \leq 3 & : \text{Questionável} \\ |Z| > 3 & : \text{Incorrecto} \end{aligned}$$

Nesta escala o laboratório deverá ter “Z-scores” inferiores a 2, embora na prática nem sempre tal suceda. Nestes casos, à semelhança do que foi dito para a análise de um MRC, o que se deve fazer é elaborar um plano de acções correctivas.

O factor de desempenho **Z** é função da unidade de desvio adoptada, isto é, poder-se-à utilizar outra escala de pontuação que não a citada anteriormente.

Erro Normalizado

Caso o laboratório calcule a incerteza do seu resultado (U_{lab}), o valor de **X_v** deve estar dentro do intervalo de incerteza de **X_{lab}**. Quando tal não acontece, este intervalo poderá estar subestimado. Nestes casos, e tal como acontece na análise de um MRC, é geralmente empregue o conceito de erro normalizado (**En**) para efectuar a avaliação do desempenho (Ver “Erro normalizado” 2.4.1).

Para um conhecimento mais alargado sobre ensaios interlaboratoriais, recomenda-se a consulta do Guia RELACRE n° 7.

2.4.3 TESTES COMPARATIVOS

Um outro contributo importante na validação de um método interno de ensaio consiste na comparação dos resultados obtidos a partir desse método com os resultados conseguidos através de um método tomado como referência. O objectivo principal deste tipo de ensaio comparativo é o de estudar a proximidade dos resultados obtidos pelos dois métodos de ensaio, isto é, de avaliar a exactidão do método interno relativamente ao de referência. Na prática, efectua-se análises em replicado, utilizando os dois métodos de ensaio em separado sobre as mesmas amostras. Este estudo poderá ser realizado numa gama restrita de concentrações ou em toda a gama de concentrações em que se pretende validar o método.

Existem várias técnicas para comparar os resultados obtidos por dois métodos de ensaio, nomeadamente :

- Teste de hipótese : teste t das médias;
- Teste de hipótese : teste t das diferenças (amostras emparelhadas);
- Teste da regressão linear entre dois métodos de ensaio.

Nota prática : a utilização de software, como a folha de cálculo “Microsoft Excel”, através de algumas ferramentas disponíveis (“Ferramentas - Analisar Dados – procurar testes respectivos), permite aceder facilmente aos testes estatísticos aqui citados.

Testes de hipótese:

Erros do Tipo I e Tipo II

Se rejeitarmos uma hipótese quando ela deveria ser aceite, dizemos que foi cometido um erro do tipo I. Se aceitarmos uma hipótese quando ela deveria ser rejeitada, cometemos um erro do tipo II.

A validade dos testes de hipótese exige que estes sejam delineados, de modo a minimizar estes dois tipos de erros. Uma tentativa de reduzir o erro de um tipo é geralmente acompanhada por um erro de outro tipo. Um dos únicos meios de reduzir ambos os erros é aumentar o tamanho da amostra (dos ensaios efectuados), o que nem sempre é possível.

Teste t das médias

Este teste aplica-se quando se pretende comparar dois métodos sobre a mesma amostra. Não é exigido que o número de amostras ensaiadas seja igual para ambos os métodos, dado que o estudo da proximidade dos resultados obtidos pelas duas metodologias é feito em torno da média de valores.

Este teste pressupõe a comparação entre dois valores de **t**, o **t** experimental designado por **t_{exp}** (em valor absoluto), e o **t** tabelado designado por **t_{tab}**, sendo tomado como critério de aceitação :

$$| t_{\text{exp}} | \leq t_{\text{tab}}$$

isto é, conclui-se, estatisticamente, que os resultados provenientes dos dois métodos não apresentam desvios significativos se o t_{exp} (em valor absoluto) for inferior ou igual ao t_{tab} .

Na prática procede-se do seguinte modo:

- a) Recolhem-se n_1 resultados utilizando o método 1 e n_2 resultados aplicando o método 2 sobre uma mesma amostra (situação recomendada);
- b) Calcula-se a média dos resultados das réplicas (\bar{X}_{m1} e \bar{X}_{m2}) e respectivos desvios padrão associados (S_1 e S_2) para cada método;
- c) Calcula-se o t_{exp} do seguinte modo:
 - c.1) Faz-se uma análise de variâncias afim de verificar se existem ou não diferenças significativas entre as variâncias obtidas pelos dois métodos (S_1^2 e S_2^2)

$$C.1.1) F_{\text{exp}} = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

$$C.1.2) F_{\text{exp}} = \frac{S_2^2}{S_1^2}$$

optando pela situação C.1.1) quando $S_1^2 > S_2^2$

optando pela situação C.1.2) quando $S_2^2 > S_1^2$

Comparam-se os valores de F_{exp} com os valores tabelados da distribuição **F** de Snedecor / Fisher, para $(n-1)$ graus de liberdade.

- c.2) Quando $F_{\text{exp}} < F$ de Snedecor/Fisher, calcula-se o t_{exp} do seguinte modo :

$$t_{\text{exp}} = \frac{\{X_{m1} - X_{m2}\}}{S \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}}$$

sendo,

$$S^2 = \frac{\{(n_1 - 1) \cdot S_1^2 + (n_2 - 1) \cdot S_2^2\}}{\{n_1 + n_2 - 2\}}$$

Compara-se o t_{exp} (em valor absoluto) com o t_{tab} (para um determinado grau de confiança e n_1+n_2-2 graus de liberdade).

Conclusão : os resultados provenientes dos dois métodos, estatisticamente não apresentam desvios significativos se o t_{exp} (em valor absoluto) for inferior ou igual ao t_{tab} .

c.3) Quando $F_{\text{exp}} > F$ de Snedecor/Fisher, calcula-se o t_{exp} do seguinte modo :

$$t_{\text{exp}} = \frac{\{X_{m1} - X_{m2}\}}{\sqrt{\left(\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}\right)}}$$

Compara-se t_{exp} (em valor absoluto) com o t_{tab} , para um determinado grau de confiança e um número de graus de liberdade (GL), dado por :

$$GL = \left\{ \frac{\left[\left(\frac{S_1^2}{n_1} \right) + \left(\frac{S_2^2}{n_2} \right) \right]^2}{\left[\frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1} \right)^2}{n_1 + 1} + \frac{\left(\frac{S_2^2}{n_2} \right)^2}{n_2 + 1} \right]} \right\} - 2.$$

Conclusão : os resultados provenientes dos dois métodos, estatisticamente não apresentam desvios significativos se o t_{exp} (em valor absoluto) for inferior ou igual ao t_{tab} .

Na folha de cálculo “Microsoft Excel”, escolher “t Test : two sample assuming equal variances” ou “t Test : two sample assuming unequal variances”, dependendo da situação atrás descrita.

Teste t das diferenças (amostras emparelhadas)

Na folha de cálculo “Microsoft Excel”, escolher “t Test : paired two sample for means”.

Este teste aplica-se quando se pretende comparar dois métodos sobre amostras iguais ou similares, na mesma gama de concentração, pois assenta no pressuposto que quaisquer erros aleatórios e/ou sistemáticos são independentes da concentração.

Este teste exige que o número de ensaios seja igual para ambos os métodos, pois no presente caso o estudo é feito em torno das diferenças entre os resultados obtidos pelos dois métodos para cada amostra analisada. Tal como no teste anteriormente referido, este pressupõe também a comparação entre dois valores de t, o t experimental designado por t_{exp} , e o t tabelado designado por t_{tab} , sendo tomado como critério de aceitação:

$$t_{exp} \leq t_{tab}$$

isto é, conclui-se que os resultados provenientes dos dois métodos não apresentam desvios significativos se o t_{exp} (em valor absoluto) for inferior ou igual ao t_{tab} .

Na prática o t_{exp} é obtido do seguinte modo:

- a) Recolhem-se os resultados dos ensaios obtidos pelos dois métodos (1 e 2) para cada amostra ensaiada;
- b) Calcula-se as diferenças (D_j) entre os resultados emparelhados obtidos pelos dois métodos para cada amostra. Calcula-se em seguida a média aritmética (D_m) destas diferenças;
- c) Calcula-se o t_{exp} pela equação seguinte :

$$t_{\text{exp}} = \frac{D_m}{S_m} \cdot \sqrt{N}$$

em que :

N = o nº de amostras ensaiadas pelos dois métodos;

D_m = Média aritmética das diferenças (D_i);

D_i = Diferença entre os valores obtidos pelos dois métodos para a mesma amostra;

S_m = Desvio padrão associado à média das diferenças (D_i).

d) Compara-se t_{exp} (em valor absoluto) com o t_{tab} , para um determinado grau de confiança e ($N-1$) graus de liberdade).

Conclusão: os resultados provenientes dos dois métodos, estatisticamente, não apresentam desvios significativos se o t_{exp} (em valor absoluto) for inferior ou igual ao t_{tab} .

Na prática grande parte dos métodos têm de ser aplicados em gamas alargadas de concentrações, e neste caso, o pressuposto atrás referido nem sempre é válido, pelo que se recomenda a utilização do método da regressão linear quando se estão a comparar dois métodos numa gama alargada de concentrações.

Teste de regressão linear entre dois métodos de ensaio

Recomenda-se a utilização deste teste quando se pretende comparar dois métodos em gamas mais alargadas de concentração do que no caso anterior, ou quando se deseja validar um método em toda a sua gama de trabalho. Isto é, neste caso analisam-se pelos dois métodos uma série de amostras (no mínimo dez), de modo a cobrir toda a gama de trabalho que se pretende validar

A concordância entre resultados obtidos por dois métodos diferentes é avaliada através da equação do tipo $y = \mathbf{b} \cdot \mathbf{x} + \mathbf{a}$. Designando y por Método 1 e x por Método 2, teremos a equação:

$$\text{Método 1} = b \cdot \text{Método 2} + a$$

Sendo:

b – declive;

a – ordenada na origem.

que representa a equação de regressão linear entre os dois métodos de ensaio.

Pode-se considerar que os dois métodos não apresentam desvios sistemáticos se a equação anterior não for significativamente diferente da equação:

$$\text{Método 1} = \text{Método 2}$$

isto é :

- O intervalo de confiança associado à ordenada na origem, $a \pm S_a \cdot t$, deve conter o valor zero.

S_a representa o desvio padrão da ordenada na origem, t o valor de t tabelado para um determinado grau de confiança e $(N-2)$ graus de liberdade (sendo N o número de amostras ensaiadas).

- O intervalo de confiança associado ao declive, $b \pm S_b \cdot t$, deve conter o valor 1 (um).

S_b representa o desvio padrão do declive, t o valor de t tabelado para um determinado grau de confiança, e $(N-2)$ graus de liberdade (sendo N o número de amostras ensaiadas).

Caso não se verifiquem estas duas condições **simultaneamente**, pode-se concluir que os métodos não são estatisticamente concordantes na gama de trabalho em estudo, para um determinado nível de confiança.

Quando se utilizar o método da regressão linear para avaliar a concordância dos resultados obtidos por dois métodos de ensaio, e caso se utilize o método dos mínimos quadrados, o método de maior precisão deverá ser colocado no eixo das abcissas (eixo x), sendo o outro colocado no eixo das

ordenadas (eixo y), pelo facto de se considerar que os erros relativos ao eixo das abcissas são desprezáveis face aos associados ao eixo das ordenadas. Assim, terá que ser conhecida a precisão de cada um dos métodos, antes de iniciar o estudo comparativo. A comparação das precisões pode ser realizada utilizando o teste F (análise de variâncias **F - test**).

3. BIBLIOGRAFIA

- AOAC & ISO & IUPAC (1992). “The International Harmonised Protocol for the proficiency testing of (chemical) analytical laboratories”, ISO/REMCO N.263, Genève.
- ASTM D 3835 (1986). “Standard Guide for Good Laboratory Practices in laboratories engaged in sampling and analysis of water”, American Society for Testing and Materials.
- ASTM D 4127 (1992). “Standard Terminology used with Ion-Selective Electrodes”, American Society for Testing and Materials.
- ASTM E 178 (94) – “Standard Practice for Dealing with Outlying Observations”
- COMAR (1991). “International data bank on Reference Materials”, COMAR Central Secretariat
- Directiva CNQ 8 (1991). “Acreditação de laboratórios. Metodologias e regras gerais”
- EAL-P11 (1997). “Validation of test Methods” General Principles and concepts
- Guia ISO/CEI 25 (1990). “General requirements for the competence of calibration and testing laboratories”, International Organization for Standardization, Genève
- Guia ISO/CEI 30 (1981). “Terms and definitions used in connection with reference materials”, International Organization for Standardization, Genève.
- Guia ISO/CEI 31 (1981). “Contents of certificates of reference materials”, International Organization for Standardization, Genève.
- Guia ISO/CEI 33 (1989). “Uses of certified reference materials”, International Organization for Standardization, Genève.
- Guia ISO/CEI 35 (1989). “Certification of reference materials - General and statistical principles”, International Organization for Standardization, Genève.
- Guia ISO/CEI 43 (1984). “Development and operation of laboratory proficiency testing”, International Organization for Standardization, Genève.
- Guia LAB/G00 (1995) – (Projecto 3). “Guia geral interpretativo da Norma NPEN45001”, Instituto Português da Qualidade, Lisboa.
- Guia LAB/G03 (1995). “Guia para a aceitação de métodos de ensaio internos em laboratórios de ensaio”, Instituto Português da Qualidade, Lisboa.
- Guia LAB/G05 (1995). “Guia para a aceitação de incertezas em laboratórios de ensaio”, Instituto Português da Qualidade, Lisboa.
- Guia LAB/G06 (1995). “Guia para a aceitação de incertezas em laboratórios de calibração”, Instituto Português da Qualidade, Lisboa.

- Guia RELACRE 3 (1996). “Validação de Resultados em Laboratórios Químicos”, Relacre, Lisboa.
- Guia RELACRE 1 (1995). “Calibração de Material Volumétrico”, Relacre, Lisboa.
- Guia RELACRE 7 (1996). “Ensaaios Interlaboratoriais em Química”, Relacre, Lisboa.
- ISO 2602 (1980). “Interprétation statistique de résultats d’essais – Estimation de la moyenne – Intervalle de confiance”.
- ISO 2854 (1976). “Interprétation statistique des données – Techniques d’estimation et tests portant sur des moyennes et des variances”.
- ISO 3534–1 (1993). “Statistique – Vocabulaire et symboles – Partie 1: Probabilité et termes statistiques généraux”.
- ISO 3534–2 (1993). “Statistique – Vocabulaire et symboles – Partie 2: Maîtrise statistique de la qualité”.
- ISO 3534–3 (1985). “Statistique – Vocabulaire et symboles – Partie 3: Plans d’expérience”
- ISO 5725–1 (1994). “Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure – Partie 1: Principes généraux et définitions”.
- ISO 5725–2 (1994) “ Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure – Partie 2: Méthode de base pour la détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d’une méthode de mesure normalisée”.
- ISO 5725–3 (1994). “Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure – Partie 3: Mesures intermédiaires de la fidélité d’une méthode de mesure normalisée”
- ISO 5725–4 (1994). “Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure – Partie 4: Méthodes de base pour la détermination de la justesse d’une méthode de mesure normalisée”.
- ISO 5725–6 (1994). “Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure – Partie 6: Utilisation dans la pratique des valeurs d’exactitude”.
- ISO 7870 (1993). “Cartes de contrôle – Principes généraux et introduction à l’emploi”.
- ISO 7873 (1993). “Cartes de contrôle de la moyenne arithmétique à limites de surveillance”
- ISO 8258 (1991). “Shewhart control charts” & Technical Corrigendum 1 (1993), International Organization for Standardization, Genève.
- ISO 8402 (1994). “Quality management and quality assurance – Vocabulary”, International Organization for Standardization, Genève
- ISO 8466-1 (1990). “Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function”, International Organization for Standardization, Genève.

- ISO 8466-2 (1993). “Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. Part 2: Calibration strategy for non-linear second order calibration functions”, International Organization for Standardization, Genève.
- J. Miller, J. Miller (1989). “Statistics for analytical chemistry”, Ellis&Horwood, 2nd Ed., Chichester.
- NP EN 45001 (1990). “ Critérios gerais para o funcionamento de laboratórios de ensaio”, Instituto Português da Qualidade, Lisboa.
- NP EN 45020 (1993). “Termos gerais e suas definições respeitantes à normalização e actividades correlacionadas”, Instituto Português da Qualidade, Lisboa.
- Standard Methods for Water and Wastewater 20th Ed. Lenore S. Clesceri, Arnold E. Greenberg, Andrew D. Eaton.
- Youden, W. J. , and Steiner, E. H. “Statistical Manual of the AOAC” Association of Official Analytical Chemist’
- WECC (1992). “WECC International measurement audits”, WECC Document 15.
- WELAC & EURACHEM (1993). “Accreditation for Chemical Laboratories: Guidance on the interpretation of the EN 45000 series of standards and ISO Guide 25”, WELAC Guidance Document n. 2 & EURACHEM Guidance Document n. 1, Teddington.

Últimos guias publicados

- 1** CALIBRAÇÃO DE MATERIAL VOLUMÉTRICO
1995; ISBN 972 - 96727 - 0 - 9
- 2** AUDITORIAS INTERNAS DE LABORATÓRIOS QUÍMICOS
1995; ISBN 972 - 96727 - 1 - 7
- 3** VALIDAÇÃO DE RESULTADOS EM LABORATÓRIOS QUÍMICOS
1996; ISBN 972 - 96727 - 2 - 5
- 4** DETERMINAÇÃO DA MELHOR INCERTEZA DE MEDIÇÃO DE UM LABORATÓRIO DE CALIBRAÇÃO DE FORÇAS
1996; ISBN 972 - 96727 - 3 - 3
- 5** DETERMINAÇÃO DA INCERTEZA DOS RESULTADOS DA CALIBRAÇÃO DE INSTRUMENTOS DE MEDIÇÃO DE FORÇAS
1996; ISBN 972 - 96727 - 4 - 1
- 6** ACREDITAÇÃO DE LABORATÓRIOS DE ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS
1996; ISBN 972 - 96727 - 5 - x
- 7** ENSAIOS INTERLABORATORIAIS EM QUÍMICA
1996; ISBN 972 - 96727 - 6 - 8
- 8** DETERMINAÇÃO DA INCERTEZA DA CALIBRAÇÃO DE MASSAS
1997; ISBN 972 - 96727 - 7 - 6
- 9** ALGUNS EXEMPLOS DE CARTAS DE CONTROLO EM LABORATÓRIOS DE ANÁLISE QUÍMICA
1998; ISBN 972 - 96727 - 8 - 4
- 10** DETERMINAÇÃO DA INCERTEZA DOS RESULTADOS DE MEDIÇÃO NA CALIBRAÇÃO DE INSTRUMENTOS DE MEDIÇÃO NA ÁREA ELÉCTRICA
VOLUME II
1999; ISBN 972 - 96727 - 9 - 2
- 11** ELABORAÇÃO DO MANUAL DA QUALIDADE DE LABORATÓRIOS
1999; ISBN 972 - 8574 - 00 - 2
- 12** DETERMINAÇÃO DA INCERTEZA DOS RESULTADOS DE VERIFICAÇÃO DE MÁQUINAS DE ENSAIO DE TRACÇÃO OU COMPRESSÃO
1999; ISBN 972 - 8574 - 01 - 0
- 13** VALIDAÇÃO DE MÉTODOS INTERNOS DE ENSAIO EM ANÁLISE QUÍMICA
2000; ISBN 972 - 8574 - 02 - 9



Rua Filipe Folque, 2, 6º Dto
1050-113 LISBOA
Telef. 21 313 98 40
Fax 21 313 98 41
relacre@mail.telepac.pt
www.relacre.pt