

Espectroscopia no Infravermelho Próximo para Avaliar Indicadores de Qualidade Tecnológica e Contaminantes em Grãos

Casiane Salete Tibola
Everaldo Paulo de Medeiros
Maria Lúcia Ferreira Simeone
Marcelo Alvares de Oliveira
Editores Técnicos



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Trigo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Espectroscopia no Infravermelho Próximo para Avaliar Indicadores de Qualidade Tecnológica e Contaminantes em Grãos

Casiane Salete Tibola
Everaldo Paulo de Medeiros
Maria Lúcia Ferreira Simeone
Marcelo Alvares de Oliveira
Editores Técnicos

Embrapa
Brasília, DF
2018

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Trigo
Rodovia BR 285, Km 294
Caixa Postal 3081
Telefone: (54) 3316-5800
Fax: (54) 3316-5802
99050-970 Passo Fundo, RS
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações da Embrapa Trigo
Presidente
Leila Maria Costamilan

Membros
Alberto Luiz Marsaro Júnior
Alfredo do Nascimento Junior
Anderson Santi
Genei Antonio Dalmago
Sandra Maria Mansur Scagliusi
Tammy Aparecida Manabe Kiihl
Vladirene Macedo Vieira

Normalização bibliográfica
Maria Regina Martins

Projeto gráfico, editoração eletrônica e tratamento das ilustrações
Fátima Maria De Marchi

Revisão ortográfica
Antônio Cláudio da Silva Barros

Fotos da capa
Renata Silva (espigas e grãos de milho), Vladimir Moreira (vagem de soja), Danilo Estevão (grãos de soja), Pedro Scheeren (espigas de trigo) e Paulo Odilon Kurtz (grãos de trigo)

1ª edição
1ª impressão (2018): 500 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Trigo

Espectroscopia no Infravermelho próximo para avaliar indicadores de qualidade tecnológica e contaminantes em grãos / Casiane Salete Tibola... [et al.], editores técnicos. – Brasília, DF : Embrapa, 2018.
200 p.

ISBN: 978-85-7035-839-4

1. Grãos - Qualidade. 2. Grãos - Contaminação. 3. Trigo - Controle de qualidade. 4. Soja - Controle de qualidade. 5. Milho - Controle de qualidade. 6. Espectroscopia. 7. Infravermelho próximo. 8. NIRS. I. Tibola, Casiane Salete. II. Medeiros, Everaldo Paulo de. III. Simeone, Maria Lúcia Ferreira. IV. Oliveira, Marcelo Alvares de.

CRB 10/609

CDD: 631.56
© Embrapa, 2018

Capítulo 6

Controle de Qualidade para Espectroscopia no Infravermelho Próximo

Gilberto Batista de Souza
Ana Rita de Araujo Nogueira
Igor Renato Bertoni Olivares

Introdução

O conhecimento da composição química de uma matriz, para o estabelecimento de suas condições de estocagem ou para sua utilização nos mais variados sistemas de produção, está diretamente relacionado com suas características físico-químicas. Neste contexto, é importante que a caracterização química, tanto a qualitativa quanto a quantitativa, seja realizada com alta velocidade analítica e produza resultados confiáveis e com rastreabilidade metrológica. Para atender aos requisitos descritos, a técnica analítica de espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS) tem se mostrado altamente eficiente, principalmente em termos de precisão e frequência analítica, em substituição aos métodos clássicos de análises laboratoriais, nos diversos setores, como em análises de alimentos e produtos agropecuários, dentre outros, viabilizando a avaliação de vários parâmetros de forma simultânea, em diversos tipos de matrizes (Pasquini, 2018).

Para que a técnica analítica de NIRS seja implantada em um laboratório, é necessário o desenvolvimento de modelos de calibração multivariada, os quais requerem procedimentos iniciais que envolvem estratégias de preparo de amostras, em que sejam previstos cuidados nas etapas de secagem e moagem, prevendo a temperatura de secagem adequada para cada tipo de matriz e o perfil do tamanho de partículas. Na seleção das amostras do conjunto de calibração também deve estar prevista a inclusão de amostras que abranjam a maior variabilidade possível na composição físico-química, considerando a similaridade dentro de uma determinada espécie ou família botânica.

O número de amostras utilizadas para a calibração é considerado de grande importância e, talvez, ainda mais importante do que a própria técnica quimiométrica empregada para o desenvolvimento do modelo. As normas ASTM E1655-05 para o desenvolvimento de análises quantitativas, usando espectrometria NIR e análise multivariada, tratam de recomendações relativas à elaboração das amostras dos conjun-

tos de calibração e validação e a definição dos parâmetros estatísticos para avaliar, otimizar e recalibrar modelos de calibração, entre outras (ASTM Standards, 2000).

Na ASTM E1655-05 é citado que, se o modelo multivariado é desenvolvido usando três ou menos variáveis (k), então o conjunto de calibração deve conter um mínimo de 24 amostras, depois da eliminação das amostras *outliers*. No caso de o modelo multivariado ter sido desenvolvido usando $k(>3)$ variáveis, então o conjunto de calibração deve conter um mínimo de $6k$ espectros depois da eliminação das amostras *outliers*. Por fim, se o modelo é centrado na média, um mínimo de $6(k + 1)$ espectros deve restar após a eliminação das amostras *outliers* (ASTM Standards, 2000).

No entanto, esse ponto é relativo, pois a quantidade de amostras a ser analisada para que o método seja validado depende da complexidade das amostras e das propriedades que estão sendo utilizadas. A recomendação do número de amostras para a construção dos modelos de calibração, para amostras naturais com muitos atributos, geralmente está na faixa de 50 a 100 amostras, dependendo da complexidade e variabilidade da matriz que acompanha as amostras reais. Por exemplo, na construção de um modelo para avaliar o teor de proteína de grãos de trigo em geral, todas as cultivares de trigo devem estar representadas no conjunto de calibração, sendo que, para cada classe de trigo, a concentração de proteínas deve abranger os valores esperados (Pasquini, 2003).

Após os procedimentos iniciais, os quais estão relacionados às etapas de preparo e seleção de amostras, é dado seguimento à construção dos modelos de calibração. Essa próxima etapa é conhecida como validação analítica do modelo e prevê avaliar algumas figuras de mérito multivariadas. As figuras de méritos previstas na validação de métodos analíticos baseadas em espectrometria NIR estão previstas na ASTM E1655-05 (ASTM Standards, 2000), sendo que, além das figuras de mérito, da linearidade e da faixa de trabalho, outras também devem ser avaliadas, considerando-se como as principais:

- **exatidão**, que é avaliada por meio da raiz quadrada do erro médio de predição (RMSEP – *Root Mean Square Error of Calibration*) (Equação 6) (Valderrama et al., 2009);
- **precisão**, que é a medida do erro aleatório associado ao método, em termos do desvio padrão absoluto ou relativo (são avaliados três níveis de precisão: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade) (Valderrama et al., 2009);
- **robustez**, que avalia a sensibilidade do método às variações nas condições analíticas;

- **viés** (*bias*), indica a presença de erros sistemáticos, que são calculados pela diferença entre a média da população e o valor verdadeiro. Seus componentes são procedentes de efeitos não aleatórios. Para verificar efeitos significativos no valor do viés, a ASTM E1655-05 preconiza que seja aplicado um teste t Student ($t_{viés}$) e, caso o valor de $t_{viés}$ apresentar valor inferior ao valor de t tabelado (crítico), para $P-1$ graus de liberdade com 95% de confiança, é possível afirmar a inexistência de efeito sistemático significativo no modelo de calibração (equações 1 e 2) (ASTM Standards, 2000; Valderrama et al., 2009);

$$viés = \frac{\sum_{P=1}^P (y_P - \hat{y}_P)}{P} \quad (1)$$

$$t_{viés} = \frac{|viés|\sqrt{P}}{SEP} \quad (2)$$

Onde:

P: número de amostras do conjunto teste;

y_P e \hat{y}_P : valores de referência e valores previstos pelo modelo, respectivamente;

$t_{viés}$: distribuição t Student;

SEP: Erro Padrão de Previsão (*Standard Error of Prediction or of Performance*)

- **sensibilidade**, que corresponde à fração do sinal responsável pelo acréscimo de uma unidade de concentração à propriedade de interesse, ou seja, definida como o sinal analítico líquido (NAS - *Net Analytical Signal*) gerado por uma concentração do analito igual à unidade (Valderrama et al., 2009);
- **sensibilidade analítica**, é a sensibilidade em termos da unidade de concentração que é utilizada, sendo definida como a razão entre a sensibilidade do método e o desvio padrão da resposta instrumental do branco (Valderrama et al., 2009; Ferreira, 2015);
- **seletividade**, é uma medida do quanto o sinal da espécie de interesse se encontra sobreposto ao sinal dos interferentes, fornecendo assim uma descrição da parte do sinal medido que é útil para previsão;
- **limite de detecção (LD)**, é a menor quantidade do analito que pode ser detectada quantitativamente, sendo que, para dados centrados na média, pode ser calculado considerando o desvio padrão do sinal do branco (σ_{br}) e o módulo dos vetores de regressão ($\|b\|$) (equação 3) (Ferreira, 2015);

$$LD = 3,29 \times \sigma_{br} \times \|b\| \quad (3)$$

- **limite de quantificação (LQ)**, é usado para definir o limite inferior de uma medida quantitativa precisa e para métodos multivariados, centrados na média; pode ser obtido por meio da razão entre o desvio padrão do sinal do branco (σ_{br}) e o módulo dos vetores de regressão ($\|b\|$) (equação 4) (Ferreira, 2015).

$$LQ = \frac{10 \times \sigma_{br}}{\|b\|} \quad (4)$$

Outras figuras de mérito também devem ser utilizadas para avaliar a qualidade e a confiabilidade dos modelos de regressão multivariada, os quais são parâmetros estatísticos. Dessa forma, são estimados com base na análise dos resíduos entre o valor previsto (y_p) e o valor referência (\hat{y}_p), sendo sintetizados através da soma quadrática desses resíduos (PRESS - *Predicted Residual Error Sum of Square*) (equação 5). A partir da raiz quadrática do PRESS dividida pelo número de amostras do conjunto de calibração (P), obtém-se o erro médio de previsão (RMSEP - *Root Mean Square Error of Prediction*) (equação 6).

$$PRESS = \sum_{P=1}^P (y_p - \hat{y}_p)^2 \quad (5)$$

$$RMSEP = \sqrt{\frac{PRESS}{P}} \quad (6)$$

Considerando-se o erro padrão de previsão (SEP), este pode ser estimado a partir da raiz quadrática da soma quadrática dos resíduos de previsão menos o viés, dividido pelo número de amostras do conjunto de calibração menos um ($P-1$) (equação 7). A partir dos resíduos do conjunto de amostras de calibração, para dados centrados na média, estima-se o erro padrão de calibração (SEC - *Standard Error of Calibration*), o qual é calculado por meio da raiz quadrática da somatória quadrática dos resíduos do conjunto de amostras de calibração ($y_i - \hat{y}_i$), onde o número de graus de liberdade no denominador é o número de amostras (I) subtraído do número de parâmetros no modelo (A), menos 1 (equação 8).

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum_{P=1}^P (y_P - \hat{y}_P - viés)^2}{P - 1}} \quad (7)$$

$$SEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I (y_i - \hat{y}_i)^2}{I - A - 1}} \quad (8)$$

No modelo de regressão, cuja opção foi por meio da validação interna cruzada, são consideradas a soma quadrática dos resíduos ($PRESS_{val}$) (equação 9), raiz quadrada do erro médio quadrático de validação cruzada (RMSECV) calculada a partir da raiz quadrada do $PRESS_{val}$ dividido pelo número de amostras usadas na validação interna cruzada (I) (equação 10).

$$PRESS_{val} = \sum_{i=1}^I (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (9)$$

$$RMSECV = \sqrt{\frac{PRESS_{val}}{I}} \quad (10)$$

Para que a técnica de NIRS seja implantada em laboratórios de rotina, se faz necessário o monitoramento contínuo, para verificar a estabilidade da calibração por meio de métodos de avaliação da precisão quanto à repetibilidade, à precisão intermediária e à verificação da presença de efeitos sistemáticos significativos, os quais prejudicam a exatidão dos resultados.

Conforme previsto na ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017, item 7.7 – garantia da validade dos resultados, é mandatório que o laboratório tenha um procedimento para monitorar a validade dos resultados (item 7.7.1) e deve também monitorar o seu desempenho por meio de comparação com resultados de outros laboratórios (item 7.7.2). Dessa forma, para atender aos requisitos citados, o laboratório deve participar em rodadas de programas de ensaios de proficiência por comparação interlaboratorial, utilizar materiais de referência ou materiais para controle de qualidade (amostras padrão) e monitorar a rotina com o uso de cartas de controle do processo analítico, sendo fundamental ter ações preventivas e corretivas para garantir a qualidade dos resultados

gerados no laboratório (Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2017a). Dessa forma, esse capítulo abordará algumas ferramentas aplicadas na garantia dos resultados para que os usuários da técnica de NIRS possam utilizá-las em suas rotinas analíticas.

Controle de qualidade por meio de comparação intralaboratorial

A inerente reprodutibilidade ou imprecisão de um método deve ser determinada como parte de um procedimento de validação. Esta informação pode, então, ser aplicada em um programa de controle de qualidade intralaboratorial (IQC – *Internal Quality Control*), que é projetado para verificação de variação ou viés (*bias*) e/ou na alteração da reprodutibilidade de um método. O IQC garante que fatores determinados pela incerteza permaneçam constantes durante o uso em rotina de um método analítico durante longos períodos de tempo. Junto com a validação, o IQC forma a base da prática de qualidade em uma análise química. A validação compreende a estimativa de incerteza de um resultado a partir do emprego do método analítico em uma dada condição. Os analistas são os responsáveis pela avaliação a respeito da adequação do método, em razão do conhecimento da incerteza, se esta é adequada ao propósito pretendido. O IQC constitui o procedimento que avalia se a incerteza obtida a partir da validação mantém-se constante durante o uso em rotina (Thompson, 2010).

Um programa de controle de qualidade intralaboratorial pode envolver vários elementos, mas o mais comum é o uso de um analito (ou analitos) com concentração conhecida em cada lote de amostra. Os materiais controle são tratados da mesma forma que as amostras e os resultados são colocados em cartas de controle.

Importância/razão da necessidade da rastreabilidade metrológica: desde que a primeira versão da ISO/IEC 17025 foi introduzida em 1999, houve aumento na atenção dada a medidas de incerteza e rastreabilidade a uma referência padrão, tanto em métodos químicos quanto microbiológicos. É cada vez maior o número de laboratórios acreditados. Dentre os requisitos de acreditação está a documentação dos procedimentos, sendo o IQC parte importante desta documentação. Quando os laboratórios estimam as medidas de incerteza, os resultados do IQC são essenciais e a rastreabilidade e a determinação de incertezas são parte integrante da validação dos métodos (Christensen, 1996).

A validação dos métodos é obrigatória, de acordo com a ISO/IEC 17025:2017 (Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2017). Apesar de esta validação ser aplica-

da para métodos não normalizados, a verificação/confirmação de desempenho dos métodos normalizados também é obrigatória, pois, conforme descrito pela norma de acreditação, é necessária a confirmação de que o laboratório tem condição de operar adequadamente métodos normalizados antes de implantar os ensaios ou as calibrações (Manual, 2014). Para validação de métodos, existem protocolos, para diferentes áreas de aplicação e tipos de análises. Dentre esses protocolos podem ser citados o ICH (International Conference on Harmonization of Technical Requirements, 2005) e a European Union (2007), além de documento orientativo elaborado pelo Instituto Nacional de Metrologia-Inmetro (Inmetro, 2016a). Para a estimativa de incerteza de medição, dois guias podem ser destacados, o EURACHEM/CITAC (Ellison; Williams, 2012) e a ISO GUM (International Organization for Standardization, 2008), de grande aplicação nos laboratórios de ensaio e calibração.

Uso de materiais de referência: é importante que as figuras de mérito de um procedimento sejam sistematicamente determinadas, o que implica que o usuário tenha confiança em relação a qualquer resultado obtido a partir do método utilizado. De uma maneira geral, a verificação do trabalho em laboratório e a avaliação das necessidades do cliente são essenciais, assim como é claro o papel da documentação baseada nos resultados obtidos com materiais de referência e a qualidade analítica (International Organization for Standardization, 2015a).

Quando se realiza uma medição química de uma amostra real, deve-se comparar o resultado obtido com um valor designado de um material conhecido, ou seja, de um material de referência certificado (CRM – *Certified Reference Material*). Os valores das propriedades (geralmente a concentração do analito de interesse) nos CRMs são suficientemente homogêneos e bem estabelecidos. Desta forma, torna-se possível a identificação e a quantificação da substância de interesse. Os CRMs também são utilizados na etapa de validação dos métodos e em outras etapas dos processos necessárias para garantir o IQC, tais como a estimativa da incerteza de medição, treinamento de pessoal e no controle estatístico de processo, com o emprego de cartas de controle (International Organization for Standardization, 2017).

Um material de referência (RM – *Reference Material*) é um material, suficientemente homogêneo e estável em relação a uma ou mais propriedades específicas, que é estabelecido como apto para o seu uso em um processo de medição. Quando os valores das propriedades do RM são rastreáveis a um valor exato da unidade pelo Sistema Internacional de Unidades (SI), têm valores de incerteza para um nível de confiança estabelecido e estão acompanhados por documentação emitida por uma entidade reconhecida, o RM é denominado “material de referência certificado”, CRM (Joint Committee for Guides in Metrology, 2012).

Segundo descrição do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-Mapa (Manual, 2014), na validação de métodos analíticos devem ser utilizados materiais/padrões de referência certificados, produzidos por produtores acreditados na ABNT NBR ISO 17034:2017 (Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2017b). Caso os materiais/padrões certificados não estejam disponíveis, podem ser empregados materiais de referência internos, amostras fortificadas ou ainda amostras com valores conhecidos. A utilização de material/padrão de trabalho é permitida, desde que o material/padrão de trabalho seja, devidamente, rastreável a um material/padrão de referência, que por sua vez tenha sido calibrado com um CRM. O RM deve ser o ponto final da cadeia de rastreabilidade nos laboratórios usuários. Todo RM deve ser rastreável a uma referência estabelecida, independentemente do uso pretendido do material, mas é o usuário quem define qual é o nível de incerteza apropriado para cada processo analítico em particular e, portanto, qual é o material adequado para o seu processo de medição (Zschunke, 2000).

Os CRMs são utilizados para fornecer resposta imediata a respeito de um resultado que está sendo apresentado após uma corrida analítica ou um ensaio intralaboratorial. Em termos objetivos, possibilitam o acesso à qualidade dos resultados. Dentro deste contexto de garantia da qualidade, os materiais de referência são utilizados para a caracterização dos métodos, do controle intralaboratorial e do controle interlaboratorial. A seguir, serão apresentados os detalhes referentes ao controle de qualidade intralaboratorial (IQC), que envolve a caracterização dos métodos e o controle de qualidade interno.

Caracterização dos Métodos: o desenvolvimento de um novo método analítico deve representar avanço em relação aos métodos existentes e ser efetivo para o propósito pretendido, com a análise de espécies com concentrações conhecidas, isto é, materiais de referência certificados (CRMs), cujos resultados são apresentados para o escrutínio da comunidade científica. Fica então demonstrado, para aqueles que tenham outros interesses, a possibilidade de utilizar este novo procedimento para suas próprias aplicações. Este tipo de trabalho representa um dos mais visíveis usos para os CRMs (Cave et al. 1999; Olivares et al., 2018).

Outra aplicação na qual os CRMs são essenciais refere-se à introdução no laboratório de um novo método ou a transferência de um método pré-estabelecido ou, ainda, de uma nova instrumentação. Mesmo quando as condições analíticas são padronizadas, como no caso específico da espectrometria de infravermelho próximo (NIRS), que muitas vezes possui curvas de calibração fornecidas pelo fabricante, é essencial a validação das curvas com amostras semelhantes às que estão sendo analisadas, as quais devem ter resultados conhecidos dos analitos que estão sendo analisados. O

trabalho de validação é necessário, pois os dados devem ser documentados para o propósito de garantia de qualidade, por exemplo, acreditação com base no IQC. Isso é importante como referência futura, caso sejam necessárias investigações relacionadas a problemas com equipamento, reagentes ou mão de obra.

O trabalho de validação inclui a determinação dentro do lote e entre diferentes lotes de amostra, os desvios padrão, a linearidade, a sensibilidade e os limites de detecção e quantificação. Para demonstrar a exatidão do método, para investigar possíveis interferências e estabelecer faixas de trabalho, é necessário analisar-se um CRM com concentrações conhecidas, sendo ideal de matriz o mais próximo possível da amostra que se pretende analisar.

A resposta se um método está adequado para uso na rotina do laboratório no ensaio de CRM pode ser realizada considerando o resultado obtido mais o seu limite de confiança ou incerteza de medição, comparando com os valores declarados no certificado do CRM (devendo haver uma intersecção entre as faixas de resultados), conforme descrito na Equação 11:

$$\bar{x} \pm \frac{t_{n-1} \times s}{\sqrt{n}} \quad (11)$$

Avaliação do valor do CRM (Miller; Miller, 2005)

Onde:

\bar{x} : média das repetições referentes à análise do CRM;

t : t de Student para n números de repetições;

n : número de repetições (no mínimo 5);

s : desvio padrão para número n de repetições.

Face ao exposto, fica evidente a enorme importância dos CRMs na garantia da qualidade dos resultados analíticos, porém seu uso ainda está longe de ser difundido nos laboratórios de ensaios rotineiros, visto que muitas vezes não é possível dispor de um RM de matriz semelhante à das amostras em estudo ou com níveis de concentração similares.

Para a execução de um controle de qualidade intralaboratorial, os laboratórios podem preparar seu próprio material de referência. Com planejamento cuidadoso e atenção a detalhes, materiais de referência extremamente úteis podem ser preparados como descrito pela norma ISO 80 (International Organization for Standardization, 2014). A introdução de práticas referentes ao preparo de RMs apropriados para o uso

pretendido seguindo os protocolos estabelecidos pela ISO 80 representa um ganho de qualidade nos resultados. De acordo com esta norma, o material de referência preparado para o controle de qualidade intralaboratorial é denominado “Material para Controle de Qualidade” (QCM – *Quality Control Material*). O preparo do QCM segue todo o protocolo descrito para o preparo de um CRM, que está detalhado e pode ser consultado nas normas ABNT NBR ISO 17034:2017 (Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2017b) e ISO GUIDE 35:2017 (International Organization for Standardization, 2017). Muitos laboratórios utilizam amostras reais, semelhantes às utilizadas nas análises de rotina. Exemplos de como o material e os dados são processados são apresentados no anexo da ISO Guia 80:2014 (International Organization for Standardization, 2014).

Na hora da escolha de um material de referência, há vários aspectos a ser levados em conta. Deve ser o mais semelhante possível (tipo de matriz e nível de concentração) à amostra a ser analisada, para que abarque todos os problemas analíticos que possam causar erros nas medições. Também deve-se considerar a homogeneidade, a estabilidade e a incerteza dos valores das propriedades de interesse. A utilidade de um RM vai depender de cada processo analítico em particular e o usuário deve decidir que aspectos são os mais importantes a levar em conta. Por exemplo, para alguns casos em que o efeito matriz seja muito significativo, pode ser mais importante utilizar um material da mesma matriz que as amostras, mas com uma incerteza mais alta nos valores das propriedades. Como o material será utilizado no próprio laboratório, requisitos exigidos para o preparo de CRMs não são tão necessários, como a avaliação da estabilidade referente ao transporte do material.

O emprego do QCM inclui, dentre outras aplicações:

- elaboração de cartas de controle: para demonstrar o comportamento de uma medição interna realizada pelo laboratório ou para confirmar a efetividade do IQC, ou para demonstrar a variação de uma medida em certo período de tempo;
- comparação dos resultados: por exemplo, de uma ou duas séries de amostras relacionadas tanto em períodos curtos quanto mais longos, quando é sabido que os resultados podem variar;
- desenvolvimento de métodos: para o estabelecimento da consistência das medidas (para validar um material certificado de referência que deve ser utilizado);
- para checar o desempenho de um instrumento;

- em estudos de repetibilidade e reprodutibilidade: que devem ser repetidos a cada período de tempo, para verificar a reprodutibilidade das medidas, a robustez das medidas e o desempenho dos instrumentos e analistas, etc.

A consequência do sucesso de um programa de Controle de Qualidade Intralaboratorial (IQC) é uma variação mínima entre uma medida e outra. Com a estabilidade analítica, variações temporais como período do dia ou sazonais, podem ser facilmente identificadas. Da mesma forma, o controle ou a faixa de variação pode ser confirmado. Assim, mesmo pequenas variações de concentração serão identificadas e mudanças cruciais, a exemplo de falha de algum processo ou efeito de uma doença em uma cultura ou em um paciente, serão diagnosticadas (Cotlove et al. 1970; Thompson; Wood, 1995).

Quando confirmado que um procedimento de medida está estatisticamente controlado (International Organization for Standardization, 1993, 2012, 2013, 2014), o desempenho do laboratório é conhecido e pode ser obtido comparando tanto o desvio padrão quanto a faixa aceitável dos resultados individuais obtidos pelo MQC em relação a um critério pré-estabelecido. Se uma variação fora de controle for identificada, o laboratório deve tomar ação para a correção. Nos casos mais simples, pode haver a necessidade de repetição da medida “suspeita”, talvez seguida de uma recalibração dos instrumentos.

A reprodutibilidade de um método ou o intervalo de confiança atribuído a um QCM permite ao analista conhecer a faixa aceitável de trabalho. Uma faixa aceitável de ± 2 desvios padrão é normalmente aplicada e um procedimento prático é o uso de cartas de controle, inicialmente propostas por Walter Andrew Shewhart (1891 - 1967). Uma série de regras de utilização para o uso das cartas de controle de Shewhart foi desenvolvido por Westgard e colaboradores (Westgard et al., 1981). Nessas regras estão compreendidos o número e a concentração dos materiais de referência a serem incluídos, a frequência com que deverão ser incluídos em uma corrida e como os resultados deverão ser aplicados para a tomada de decisão, ou seja, se uma corrida deverá ser aceita ou rejeitada. No entanto, apesar de formalmente adotar as regras de Westgard, muitos laboratórios desenvolvem seus próprios critérios, principalmente quando não têm acesso a um razoável número de materiais certificados.

De maneira resumida, o IQC envolve práticas que certifiquem que os erros nos dados analíticos gerados estejam dentro de uma variação aceitável. Na prática, o IQC depende do uso de duas estratégias, a análise do QCM ou CRM para monitorar a veracidade dos resultados com o controle estatístico e o número de repetições independentes, como forma de se conhecer a precisão das medidas (Thompson; Wood, 1995).

Para mais detalhes a respeito dos procedimentos, pode ser consultado o documento produzido pelo Mapa - Manual de Garantia da Qualidade Analítica - Áreas de Identidade e Qualidade de Alimentos e de Insumos (Manual, 2015), que apresenta detalhadamente as definições e os cálculos empregados em um programa de controle de qualidade intralaboratorial.

Controle estatístico de processo analítico – Cartas de controle

Uma carta de controle é definida como um gráfico com limites de controle em que uma medida estatística de uma série de amostras é representada em uma ordem particular para orientar o processo em relação a essa medida (International Organization for Standardization, 2014). Também pode ser definida como Carta de Controle de Shewhart: gráfico de controle com limites de controle Shewhart destinados principalmente a distinguir entre a variação na medida plotada em razão de causas aleatórias e aquelas por causas especiais (International Organization for Standardization, 2013).

As cartas de controle atuam no controle de qualquer tipo de processo, sendo incorporadas à realidade dos laboratórios principalmente após a publicação da norma ISO/IEC 17025 em 1999. Entre os requisitos desta norma, o item 5.9 estabelece que controles de qualidade devem ser aplicados pelo laboratório, sendo os resultados destes controles apresentados de maneira que as tendências sejam detectadas, desta maneira, as cartas de controle sempre foram uma das melhores opções para avaliação desta tendência. No ano de 2017, a norma ISO/IEC 17025, em sua 3ª edição, incorporou o termo carta de controle no texto da própria norma, indicando, no requisito 7.7.1 d), quanto ao uso de “padrões de checagem ou padrões de trabalho com cartas de controle, quando aplicável” (Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2017).

A aplicação das cartas de controle alinha-se diretamente com a ideologia do Ciclo de Qualidade Analítica (Olivares; Lopes, 2012), conforme apresentado na Figura 1.

Neste ciclo, destaca-se inicialmente que um método de ensaio deve ser avaliado para verificar se ele é adequado ao uso e fornece resultados confiáveis, sendo aplicado à validação do método (aplicado a métodos novos ou normalizados utilizados fora de seu escopo), ou à verificação de desempenho de um método normalizado, para verificar se o método normalizado fornece resultados confiáveis nas condições operacionais do laboratório (a verificação de desempenho pode ser entendida como uma validação simplificada). Em seguida, com base nos resultados da validação ou da verificação de desempenho, é necessário estimar a incerteza de medição, visando

a avaliar os limites de confiança dos resultados analíticos. Finalmente, na rotina de ensaios do laboratório, é necessário avaliar se o método continua produzindo resultados adequados e se a incerteza estimada é pertinente. Desta maneira, amostras de controle (que apresentam características conhecidas como a concentração de um determinado analito) são analisadas durante a rotina de ensaios, e os resultados são representados nas cartas de controle visando a avaliar as tendências dos resultados.

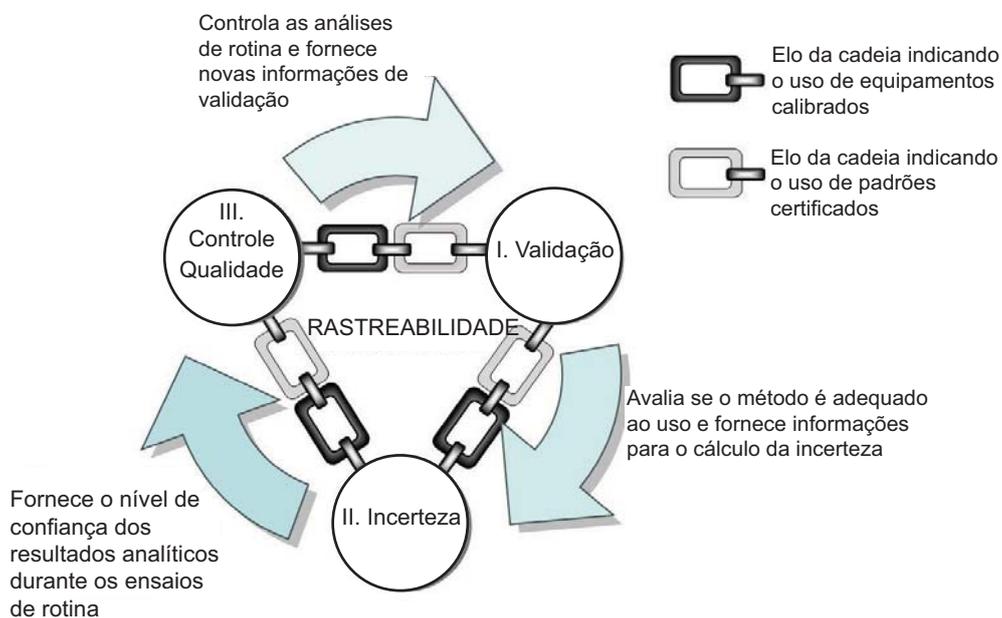


Figura 1. Ciclo de Qualidade Analítica.

Fonte: Olivares e Lopes (2012).

De acordo com a ISO 7870-1:2014 (International Organization for Standardization, 2014), as cartas de controle são um instrumento fundamental de controle estatístico de processo (CEP) que fornecem um método gráfico simples que pode ser usado para:

- a) indicar se o processo é estável, operando dentro de um sistema estável de causas aleatórias;
- b) estimar a magnitude da variabilidade inerente do processo;

- c) comparar a informação a partir de amostras que representam o estado atual de um processo em relação aos limites de controle que refletem essa variabilidade, com o objetivo de determinar se a variabilidade do processo manteve-se estável ou se está reduzindo ou aumentado;
- d) identificar, investigar e, possivelmente, reduzir/eliminar o efeito de causas especiais de variação, que podem levar o processo a um nível inaceitável de desempenho;
- e) ajudar na regulação de um processo através da identificação de padrões de variabilidade, como tendências, ciclos, etc.

Uma grande vantagem das cartas de controle é a sua facilidade de construção e utilização. No entanto, para que uma carta de controle possa ser um indicador confiável e eficiente, deve-se ter atenção especial na fase de planejamento quanto às questões de como selecionar o tipo adequado de carta para o processo em estudo e como determinar esquema de amostragem adequada, bem como a escolha da amostra controle (Turuta, 2015).

Existem diferentes tipos de cartas de controle aplicáveis na garantia da qualidade analítica para monitoramento de alguns dos parâmetros, como valor único, valor médio, taxa de recuperação, desvio padrão e alcance. Essas ferramentas são utilizadas em concordância com a amostra controle pré-estabelecida para uma metodologia específica (Figura 2).

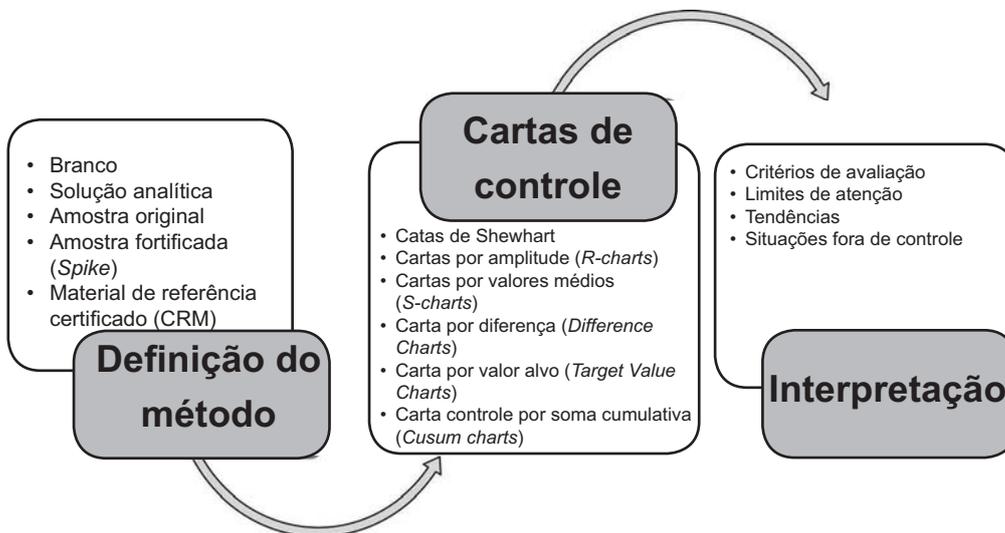


Figura 2. Tipos de amostras de controle, cartas de controle e interpretação.
Fonte: Funk et al., (2007)

Considerando que as cartas de controle de Shewhart são as mais aplicadas em laboratórios de ensaio, um guia prático para sua aplicação pode ser encontrado no Manual de Garantia da Qualidade Analítica (Manual, 2015), conforme apresentado a seguir.

Elaboração de Cartas de Controle de Shewhart:

- analisar entre 10 e 20 amostras (homogêneas e de características similares às comumente ensaiadas pelo laboratório);
- eliminar os *outliers* por testes estatísticos apropriados (por exemplo, teste de Grubbs);
- calcular a média e o desvio padrão dos resultados;
- realizar um teste de hipótese sobre a diferença estatística insignificante entre o valor obtido e o esperado utilizando um teste *t* (equação 12);

$$t = \frac{|x_m - \mu|}{sd} \sqrt{n} \quad (12)$$

Onde:

x_m : média dos resultados

μ : valor predito

sd : desvio padrão

n : número de repetições

t : resultado a ser comparado com valor crítico tabelado

- caso t calculado seja menor que o tabelado, elaborar a carta;
- marcar o número consecutivo de resultados no eixo x da carta e os valores das características observadas no eixo y ;
- marcar uma linha central correspondendo ao valor de referência (CL – *Central Line*);
- traçar duas linhas paralelas, sendo uma e outra abaixo da linha central, correspondendo a ± 2 x desvios padrão para estabelecer o Limite Superior de Alerta (UWL - *Upper Warning Limit*) e o Limite Inferior de Alerta (LWL - *Lower Warning Limit*);
- traçar duas linhas paralelas, sendo uma e outra abaixo da linha central, correspondendo a ± 3 x desvios padrão para estabelecer o Limite Superior de Ação (UAL - *Upper Action Limit*) e o Limite Inferior de Ação (LAL - *Lower Action Limit*);

- com a carta preparada, continuar a inserir os dados de controle e avaliar conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Condições para avaliação da carta de Shewhart.

Condição	Avaliação
1	Caso um resultado esteja dentro da faixa WL este valor é considerado aprovado;
2	Valores obtidos entre as faixas são aceitos; no entanto não podem ser mais que 2 em 20 determinações;
3	Caso um resultado seja encontrado fora do limite de AL, ou caso existam 7 valores consecutivos criando uma tendência (acima ou abaixo), deve ser realizada uma avaliação do método;
4	3 valores consecutivos entre AL e WL podem indicar problemas no ensaio;
5	2 valores consecutivos entre AL e WL, do mesmo lado da média podem indicar problemas no ensaio;
6	10 valores consecutivos do mesmo lado da média indicam erros sistemáticos.

AL – limite de atenção (*Attention Limit*); WL – limite de alerta (*Warning Limit*).

Controle de processo estatístico multivariado

Apesar de um grande número de engenheiros e químicos ainda utilizar medidas univariadas, o Controle de Processo Estatístico Multivariado (MSPC – *Multivariate Statistical Process Control*) tem se tornado cada vez mais presente. Um problema que surge com o emprego da análise univariada convencional é a quantidade de parâmetros que deve ser medida no tempo, em intervalos regulares. Desta forma, em um dia centenas ou mesmo milhares de dados e informações são disponibilizados para serem processados. Como muitas dessas medidas são relacionadas, faz mais sentido o emprego de um modelo multivariado do que de diversos modelos univariados. Além disso, alguns instrumentos, que são cada vez mais utilizados nas indústrias, utilizam monitoramento espectroscópico, tais como o NIR, o qual sozinho é capaz de gerar um novo espectro em poucos segundos. Incluir essa informação na base de dados torna-se inimaginável, podendo gerar centenas de possibilidades de cartas de controle (Brereton, 2007).

Neste enfoque, métodos tais como Análise de Componentes Principais (PCA – *Principal Components Analysis*) e a Regressão Parcial por Mínimos Quadrados (PLS – *Partial Least Square*) são alternativas bastante úteis, pois possibilitam o registro dos Componentes Principais de diversos parâmetros, em vez do registro de um único parâmetro. Em lugar de se utilizar uma única medida física, deve-se obter a concentração em tempo real por meio de uma calibração multivariada de um ou mais componentes do produto.

Existem diferentes medidas multivariadas que possibilitam o controle dos resultados espectroscópicos. Os objetivos do MSPC são observar amostras cuja característica (normalmente espectroscópica) apresenta desvio significativo das características previamente estabelecidas como normais e calcular estatisticamente este desvio. Se a amostra estiver fora desses limites, indica que provavelmente há dificuldade no processo. Especialmente em termos de aplicação para o controle dos resultados e processos, essa é a área que se apresenta com maior potencial de crescimento, sendo o controle multivariado a principal tendência na área de quimiometria (Brereton, 2007).

Controle de qualidade por meio de comparação interlaboratorial

Os métodos empregados pelos diferentes programas de ensaio de proficiência (PT – *Proficiency Test*) variam dependendo da natureza dos itens ensaiados (amostras), do método de ensaio utilizado e do número de laboratórios participantes. As normas ABNT NBR ISO/IEC 17043:2011 descrevem as características comuns dos programas de ensaio de proficiência que abrangem os três tipos básicos de ensaios de laboratório (quantitativos, qualitativos e interpretativos): programa de participação sequencial; programas de participação simultâneos (programas de ensaio de amostras divididas e programas de processos parciais) e programas de avaliação externa de qualidade (Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2011).

Geralmente, independentemente do tipo, são atribuições do provedor do PT: a) produzir os itens de ensaio; b) estabelecer o protocolo de funcionamento do programa; c) definir o modelo estatístico para a avaliação do desempenho; d) determinar os valores designados e as incertezas; e) distribuir os itens de ensaio aos laboratórios participantes; f) receber os resultados dos participantes e as informações sobre os métodos; g) comparar os resultados dos participantes com a faixa aceitável; e h) elaborar relatórios com comentários orientadores e educativos.

Para selecionar um provedor de ensaio de proficiência adequado ao escopo de análises do laboratório, sugere-se pesquisar na base de dados EPTIS (*European Proficiency Testing Information System*), que contém cerca de 4.000 PTs cadastrados, procedentes de aproximadamente 40 países (European Proficiency Testing Information System, 2018).

Em um contexto geral, a participação em programas de ensaios de proficiência traz como benefícios aos participantes: a) avaliação do desempenho e monitoramento contínua; b) evidência de obtenção de resultados confiáveis; c) identificação de problemas relacionados com a sistemática de ensaios ou o sistema analítico; d) possibilidade de tomada de ações corretivas e/ou preventivas; e) avaliação da eficiência de controles internos de qualidade; f) determinação das características de desempenho e validação de métodos e tecnologias; e g) padronização das atividades frente ao mercado, sendo um dos requisitos da norma ISO/IEC 17025:2017 para a acreditação ou habilitação do laboratório de ensaio (International Organization for Standardization, 2017).

Os benefícios citados, na prática, minimizam os riscos da ocorrência de inexatidão e imprecisão significativas no conceito estatístico, o que pode gerar resultados analíticos contaminados com erros sistemáticos ou aleatórios, tendências ou diferenças significativas quando comparados a laboratórios similares, tornando imprescindível e imperativo que os laboratórios participem de ao menos uma rodada de ensaios de proficiência por ano.

De acordo com orientação descrita na norma nº NIT-DICLA-026 do Inmetro, cabe ao laboratório definir o intervalo do seu plano de participação em rodadas de PT (por exemplo: anual, bienal, quadrienal, etc.). Os resultados dessa participação fornecem aos gestores do laboratório uma confirmação de que o desempenho do laboratório é satisfatório ou alerta para a necessidade de investigação de potenciais problemas (Inmetro, 2016b).

O objetivo maior dos ensaios de proficiência (PT) é estimular o bom desempenho dos participantes, disponibilizando meios objetivos para que o responsável pelo laboratório possa avaliar e demonstrar a confiabilidade dos dados que produz.

O projeto estatístico a ser empregado em programas de ensaios de proficiência deve fornecer resultados simples e transparentes, para que os participantes e outros interessados, por exemplo, os clientes do laboratório, possam avaliar facilmente as informações contidas nos relatórios fornecidos pelo provedor do PT.

Dessa forma, a hipótese estatística fundamental para o escopo do PT deve ser formulada da seguinte maneira: a hipótese nula (H_0) é que não haja diferença estatística significativa do resultado do laboratório participante em relação aos resultados do grupo de participantes, ou seja, que o laboratório atenda aos requisitos de qualidade. Por outro lado, se a hipótese nula H_0 for rejeitada, a hipótese alternativa (H_1) torna-se válida, isto é, o resultado do laboratório participante apresenta diferença estatística significativa em um determinado nível de confiança (por exemplo: 95%), quando comparado com os resultados do grupo e, portanto, não atende aos requisitos de qualidade (Uhlig; Lischer, 1998).

Um dos pontos críticos para todos os provedores de PT consiste na interpretação dos resultados do programa e, conseqüentemente, a avaliação do desempenho dos participantes. Na literatura, são citadas diversas técnicas estatísticas empregadas para avaliar os resultados de programas de comparação interlaboratorial. No entanto, essas técnicas devem ser apropriadas para cada situação, sendo que na ISO 13528 são apresentadas orientações sobre delineamentos estatísticos e análises visuais de dados (Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2011; International Organization for Standardization, 2015b).

Geralmente, duas etapas são comuns para todos os PTs: 1) estimar o valor designado da concentração do analito e a incerteza associada; e 2) efetuar a análise estatística para avaliar o desempenho do laboratório e determinar a homogeneidade e a estabilidade do item do ensaio de proficiência. Não existe um procedimento padronizado que descreva em detalhes as estratégias a ser utilizadas. Dessa forma, dependendo do propósito, diferentes critérios estatísticos empregados podem afetar a determinação do valor designado e o intervalo de aceitação, e conseqüentemente comprometer a avaliação do desempenho do laboratório (Maio et al., 2006; Visser, 2006).

Como calcular o valor designado

Por definição, o valor designado é a melhor estimativa do valor verdadeiro, sendo este utilizado com o propósito de calcular os índices de desempenho dos participantes dos PTs. Esse valor deve ser definido de forma criteriosa para avaliar de maneira justa os participantes e incentivar a concordância entre métodos e laboratórios (Inmetro, 2016b; Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2011).

Na literatura, são sugeridos diferentes métodos para determinar o valor designado, sendo os mais comuns listados a seguir: valor designado fornecido por um laboratório referência; valor certificado por um material de referência certificado (CRM) utili-

zado como material de ensaio; valor designado fornecido por laboratório especialista; valor designado obtido através de materiais formulados; valores de consenso que são derivados diretamente dos resultados relatados pelos participantes.

Valores de consenso que são derivados diretamente dos resultados relatados pelos participantes

Este é o procedimento mais utilizado para determinar o valor designado em ensaios de proficiência, sendo utilizada normalmente a média dos resultados após a exclusão de valores dispersos (estatística clássica) ou a mediana dos resultados de todos os participantes na rodada do ensaio (estatística robusta).

Dentre as principais vantagens do uso deste método, estão a facilidade de aplicação e o baixo custo. A principal desvantagem é a existência de subpopulações, ou seja, em PT onde os participantes utilizam métodos distintos, o valor alvo poderá sofrer tendência no valor proveniente dos resultados de um grupo majoritário de laboratórios.

Procedimentos para a determinação do desvio padrão alvo

Esse parâmetro é definido como sendo a incerteza associada ao valor designado que caracteriza a dispersão ou a variabilidade dos valores atribuídos ao mensurando, ou seja, determina com alta probabilidade o intervalo no qual o valor verdadeiro provavelmente está contido (Ellison; Willians, 2012).

Vários testes estatísticos são empregados para estimar o intervalo de confiança em PTs. Na ISO/IEC 13528:2015 são descritos procedimentos que podem ser utilizados para a definição do desvio padrão alvo (International Organization for Standardization, 2015b). Geralmente, o procedimento para determinar a incerteza deve ser adequado para satisfazer o objetivo comum de todos os laboratórios e, dessa forma, precisa ser definido pelo provedor do PT e deverá ser divulgado para os participantes antes do início de cada rodada (Thompson; Ellison, 2006).

Dentre os procedimentos mais utilizados, estão: a) métodos baseados nos resultados dos participantes, como na estatística clássica que utiliza a estimativa do desvio padrão e na estatística robusta, calculados a partir do intervalo quartílico normalizado; b) métodos baseados na raiz quadrática da soma da incerteza-padrão combinada dos resultados dos participantes e a incerteza-padrão do valor designado; c) método baseado na raiz quadrática da soma da incerteza-padrão expandida do resultado do

participante; e d) incerteza expandida do valor designado do laboratório de referência ou do material de referência utilizado como item de ensaio.

Procedimentos para a avaliação do desempenho dos laboratórios participantes

Independentemente do modelo estatístico utilizado pelo provedor para a avaliação do desempenho dos participantes, é necessário verificar a presença de comportamento multimodal nos resultados, a qual poderia causar impactos significativos quanto à validade da avaliação de desempenho. Dessa forma, na verificação visual da normalidade dos dados, podem ser utilizados gráficos tipo histogramas.

Dentre os procedimentos estatísticos previstos na ABNT NBR ISO/IEC 17043:2011 (Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2011), empregados por programas interlaboratoriais para avaliar o desempenho dos laboratórios, estão:

a) **Índice z (z-escore)**: o índice z é procedimento estatístico mais comum empregado por programas interlaboratoriais para avaliar o desempenho dos laboratórios. Esse índice é recomendado pelo Protocolo Internacional Harmonizado para Ensaio de Proficiência (IUPAC, 2006) e é obtido conforme a equação 13, onde x_i é o resultado informado pelo participante, \bar{X} , o valor designado (melhor estimativa do valor verdadeiro) e $\hat{\sigma}$, o desvio padrão alvo para o propósito conveniente do PT (Thompson; Ellison, 2006).

$$z = \frac{(x_i - \bar{X})}{\hat{\sigma}} \quad (13)$$

O índice z tem, como vantagem, permitir a comparação direta dos resultados de diferentes amostras e de diferentes unidades, porque o valor desse índice não é expresso na unidade original da medida, ou seja, é normalizado e descrito como sendo a distância entre x_i e \bar{X} em unidades de desvio padrão. Dessa forma, a maioria dos PTs por comparação interlaboratorial, que utilizam o índice z para avaliar o desempenho dos ensaios, interpreta que, quanto mais próximo de 0 (zero) for o valor de z, mais exato o resultado, melhor o desempenho do laboratório na realização do ensaio (Thompson; Ellison, 2006; Analytical Methods Committee, 1989).

Para distribuição normal do conjunto de dados, a probabilidade é que aproximadamente 95% dos resultados estejam dentro do intervalo de $|z| \leq 2,0$. Desse modo, o desempenho do laboratório é considerado aceitável ou satisfatório para realizar o ensaio. Por outro lado, valores de $|z| \geq 3,0$ são atípicos e, dessa forma, devem ser considerados inaceitáveis ou insatisfatórios, uma vez que estão acima de três desvios padrão da média e fora do intervalo de confiança de 99,7%. Nesse caso, é preciso abrir uma não conformidade, investigar a causa e tomar medidas corretivas para eliminar as fontes de erros no processo analítico.

Valores entre $2,0 < |z| < 3,0$ são considerados resultados com desempenho questionável. Espera-se que os resultados dentro dessa faixa ocorram aproximadamente em 5% das vezes, caracterizando-se como um evento isolado que não requer ações corretivas, mas apenas monitoramento.

- b) **Índice zeta (ζ)**: atualmente, esse índice vem sendo amplamente utilizado para a avaliação do desempenho de laboratórios e PTs. É semelhante ao erro normalizado (E_n), no entanto, utiliza a incerteza-padrão ao invés da incerteza expandida, permitindo interpretar os intervalos de confiança da mesma maneira que o índice z (z-escore). O cálculo desse índice está descrito na Equação 14, onde u_{lab} é a incerteza-padrão combinada do resultado do participante e u_{av} é a incerteza-padrão do valor designado (International Organization for Standardization, 2015b).

$$\zeta = \frac{x_i - \bar{X}}{\sqrt{u_{lab}^2 + u_{av}^2}} \quad (14)$$

- c) **erro normalizado (E_n)**: o cálculo do erro normalizado é baseado na Equação 15, onde x_i é o resultado do laboratório participante; X_{ref} é o valor designado fornecido pelo laboratório referência; U_{lab}^2 é a incerteza-padrão expandida do resultado do participante e U_{ref}^2 é a incerteza expandida do valor designado pelo laboratório referência. Nesse caso, os participantes que apresentarem $|E_n| \leq 1,0$ obtêm desempenho satisfatório e os participantes que apresentarem $|E_n| > 1,0$ obtêm desempenho insatisfatório, havendo a necessidade de gerar uma não conformidade para dar início à ação preventiva ou corretiva (Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2011).

$$E_n = \frac{x_i - X_{ref}}{\sqrt{U_{lab}^2 + U_{ref}^2}} \quad (15)$$

Aplicação, uso e interpretação de resultados dos Programas de Ensaio de Proficiência

Para que o laboratório participante do PT possa usufruir dos vários benefícios anteriormente citados, é preciso que este avalie suas próprias conclusões sobre o seu desempenho, analise de forma criteriosa os resultados apresentados pelo provedor, por meio dos relatórios analíticos de cada rodada e, em caso de resultados insatisfatórios, seja registrada uma não conformidade para que seja tomada a ação corretiva apropriada. A seguir, estão descritas algumas aplicações que o participante de PT pode utilizar a partir da interpretação dos resultados apresentados no relatório do provedor:

a) **comparação de desvio analítico interlaboratorial:** para expressar a relação porcentual do desvio padrão com a média, utiliza-se o coeficiente de variação (CV), também conhecido como desvio padrão relativo (DPR), o qual é expresso em porcentagem e está relacionado à dispersão dos resultados entre os laboratórios.

A informação desse coeficiente proporciona uma visão geral da precisão de um método analítico em termos de reprodutibilidade, independentemente da grandeza dos valores. Quanto maior for o CV, menos uniforme é o conjunto de dados, ou seja, maior a variabilidade interlaboratorial.

Em programas de ensaio de proficiência por comparação interlaboratorial, geralmente o CV é calculado após a exclusão dos resultados de laboratórios que são considerados discrepantes (*outliers*). Para identificar esses resultados discrepantes, é preciso aplicar testes estatísticos, como teste de Grubbs, teste de Dixon ou teste de Hampel (Souza et al., 2009). Na Figura 3 são apresentados valores dos coeficientes de variação de alguns tipos de ensaios realizados em uma amostra de milho em grão. Essa amostra foi utilizada como item de ensaio no Programa de Proficiência para Laboratório de Nutrição Animal, coordenado pela Embrapa Pecuária Sudeste, no qual foram avaliados os teores de umidade (UM), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), matéria mineral (MM) e fibra bruta (FB). Todos esses ensaios foram realizados por NIRS, considerando modelos de calibração e marcas independentes, próprias de cada laboratório participante.

Por meio do PT, foi possível observar que o ensaio que apresentou maior variabilidade interlaboratorial foi a FB, com CV igual a 48,6%. Sendo assim, a orientação é que os laboratórios avaliem os seus modelos de calibração e o método referência e verifiquem possíveis problemas em relação à precisão analítica e à exatidão.

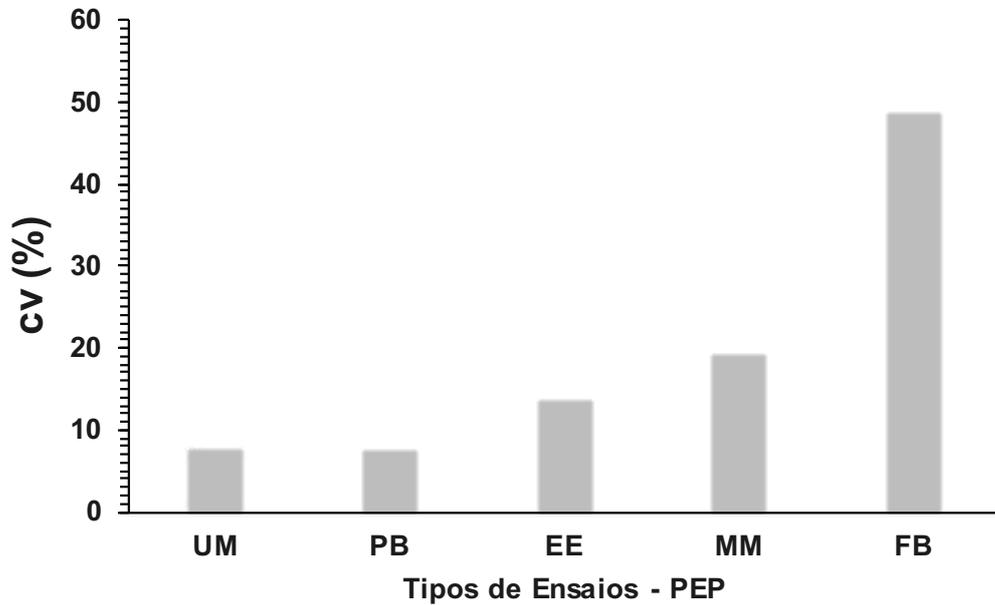


Figura 3. Valores dos coeficientes de variação (CV) para os ensaios de proficiência em amostra de milho grão moído, analisado por NIRS. UM - umidade, PB - proteína bruta, EE - extrato etéreo, MM - matéria mineral, FB - fibra bruta.

b) **comparação de métodos analíticos:** utilizando a mesma amostra de milho do item anterior, os laboratórios informaram os resultados dos ensaios obtidos pelo método referência (MR) e os resultados previstos nos modelos de calibração de NIRS. Por meio desses resultados, foram definidos, para cada tipo de ensaio, os valores designados e o desvio padrão alvo, ambos para fins de avaliação de desempenho no PT.

Por meio da Figura 4, é possível observar que os resultados obtidos através dos dois procedimentos analíticos foram comparáveis e não apresentaram diferença estatística significativa no nível de 95%.

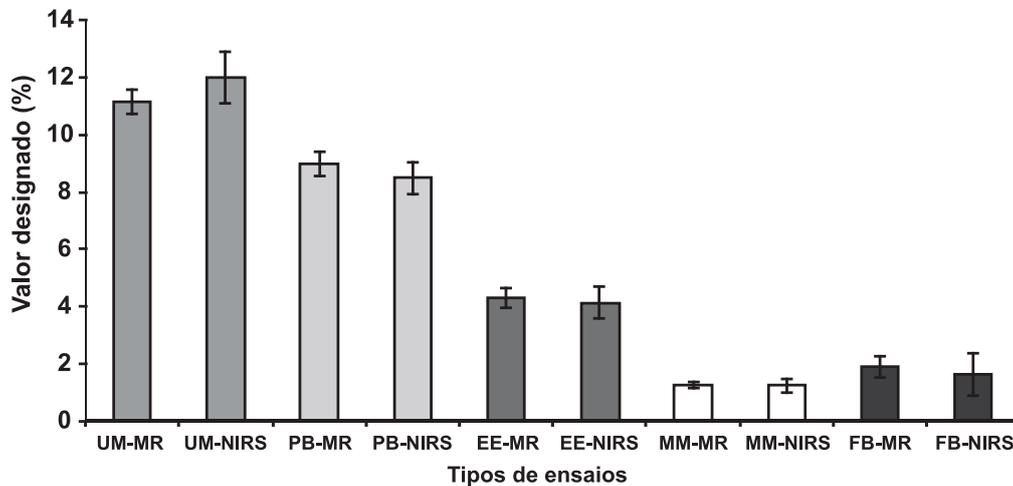


Figura 4. Valores do coeficiente de variação (CV) para os ensaios de uma rodada de ensaio de proficiência em amostra de milho grão moído analisado por NIRS e por método referência (MR). UM - umidade, PB - proteína bruta, EE - extrato etéreo, MM - matéria mineral, FB - fibra bruta.

c) **avaliação de desempenho interlaboratorial:** por meio do gráfico do índice z, os laboratórios puderam avaliar quais ensaios apresentaram desempenho satisfatório, questionável ou insatisfatório. Na Figura 5 é possível observar que o laboratório código 997 apresentou resultados com desempenho insatisfatório em dois tipos de ensaio, o que demonstra a ocorrência de problemas na realização dos ensaios UM e PB. Nesse caso, o responsável técnico deverá abrir uma não conformidade e avaliar qual é a causa raiz do problema e corrigi-la antes de continuar o processo analítico no laboratório.

Outra observação feita é a evidência de efeitos sistemáticos nos resultados; por exemplo, o laboratório código 90 apresentou todos os resultados dos ensaios com valores positivos para o índice z. Nesse caso, o responsável técnico deverá observar com atenção se esse efeito sistemático é frequente e, caso necessário o modelo deverá passar por revalidação para verificar, principalmente, a presença de viés significativo.

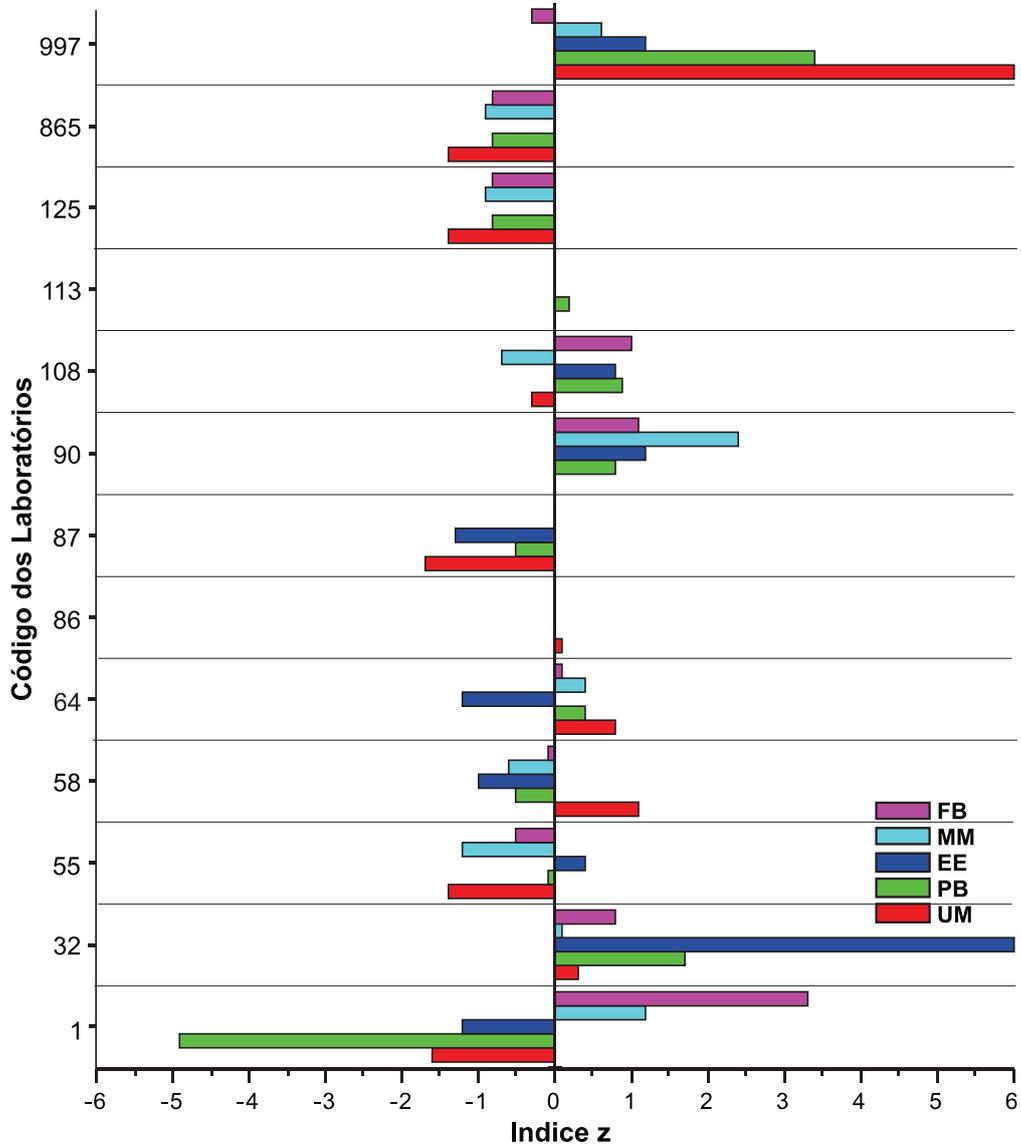


Figura 5. Avaliação do desempenho dos laboratórios com o uso do índice z. UM - umidade, PB - proteína bruta, EE - extrato etéreo, MM - matéria mineral, FB - fibra bruta.

d) **monitoramento do desempenho do laboratório ao longo do tempo:** o desempenho individual ou coletivo dos laboratórios participantes do PT também pode ser monitorado por avaliação dos índices de desempenho, índice z ou índice zeta. Por meio desses índices, os participantes podem visualizar a variabilidade tempo-

ral do seu desempenho e verificar em quais ensaios existem tendências sistemáticas aleatórias. Esse monitoramento poderá ser conduzido com o uso de cartas de controle de Shewhart, por exemplo.

Conclusões

Qualidade não é um atributo passível de ser observado apenas com uma visão superficial. Deve ser medida e avaliada para ser expressa em termos como boa-ruim ou aceitável-recusada. A qualidade pode também melhorar ou deteriorar, dependendo do esforço, entusiasmo e experiência dos analistas e do ambiente no qual o experimento é realizado.

O emprego de materiais de referência possibilita a avaliação de fatores inerentes ao laboratório (equipamentos, pessoal, etc.), sendo importante seu uso nas etapas cruciais do método analítico, desde a validação, aplicação e trabalho de rotina, para a obtenção de bons desempenhos em programas de qualidade e certificação.

O controle de qualidade intralaboratorial é um aspecto essencial para certificar que os dados gerados por um laboratório estão de acordo com o resultado esperado, ou seja, dentro dos limites aceitáveis. Quando executadas de forma apropriada, as ferramentas de controle de qualidade (ensaios intra e interlaboratoriais, cartas de controle, etc.) podem monitorar os vários aspectos relacionados à qualidade dos dados. Em rodadas nas quais o desempenho esteja fora dos limites aceitáveis, os dados produzidos devem ser rejeitados e, após a tomada de ações corretivas, as análises devem ser repetidas.

Finalmente, deve-se salientar que apenas a execução de sistemas controle de qualidade não garante a confiabilidade dos dados gerados. Os procedimentos corretos para ações de remediação e motivação dos empregados envolvidos devem ser documentados e colocados em ação. Somente a participação e a conscientização de todos os envolvidos no processo garantem o sucesso de um programa de qualidade.

Referências

ANALYTICAL METHODS COMMITTEE. Robust statistics – how not to reject outliers. Part 1. Basic concepts. **Analyst**, v. 114, n. 12, p. 1693-1697, 1989.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017**: requisitos gerais para a competência de laboratórios. Rio de Janeiro, 2017a.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR ISO 17034:2017**: requisitos gerais para a competência de produtores de materiais de referência. Rio de Janeiro, 2017b.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR ISO/IEC 17043**: avaliação de conformidade – requisitos gerais para ensaios de proficiência. Rio de Janeiro, 2011.

ASTM STANDARDS. **E1655, vol 03.06**: standards practices for infrared, multivariate, quantitative analysis, West Conshohocken: ASTM International, 2000. Annual Book.

BRERETON, R. G. **Applied chemometrics for scientists**. West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd, 2007. 379 p.

CAVE, R.; BUTLER, O.; COOK, J. M.; CRESSEM, R. S.; GARDEL, N. M.; HOLDEN, A. J.; MILES, D. L. Atomic spectrometry update: environmental analysis. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 14, n. 2, p. 279-353, 1999.

CHRISTENSEN, J. M. Correcting measurement errors using reference materials in method validation. **Mikrochimica Acta**, v. 123, n. 1/4, p. 231-240, 1996.

COTLOVE, E.; HARRIS, E. K.; WILLIAM, G. Z. Biological and analytic components of variation in long-term studies of serum constituents in normal subjects. 3. Physiological and medical implications. **Clinical Chemistry**, v. 16, n. 12, p. 1028-1032, 1970.

ELLISON, S. L. R.; WILLIAMS, A. (Ed.). **EURACHEM/CITAC guide quantifying uncertainty in analytical measurement**. 3rd ed. [S.I.]: EURACHEM; CITAC, 2012. EURACHEM/CITAC Guide CG 4. 133 p. Disponível em: <https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1.pdf>. Acesso em: 5 março 2018

EUROPEAN PROFICIENCY TESTING INFORMATION SYSTEM. EPTIS. Disponível em: <<http://www.eptis.bam.de>>. Acesso em: 12 maio 2018.

EUROPEAN UNION. Commission Regulation (EC) No 333/2007 of 28 march 2007. Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of lead, cadmium, mercury, inorganic tin, 3-MCPD and benzo(a)pyrene in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, p. L.88/29-L.88/38, 2007.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria**: conceitos, métodos e aplicações. Campinas: Ed. da Unicamp, 2015. 493 p.

FUNK, W.; DAMMANN, V.; DONNEVERT, G. **Quality assurance in analytical chemistry**. Weinheim: Wiley -VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH). **Validation of analytical procedures**: text and methodology Q2(R1): step 4 version. London: ICH, 2005.

INMETRO. **Doq-Cgcre-008-Rev.05**: orientação sobre validação de métodos analíticos. Rio de Janeiro, 2016a.

INMETRO. **NIT-DICLA-26**: requisitos para a participação de laboratórios em ensaios de proficiência. Rio de Janeiro, 2016b.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 7870-1**: control charts. Part 1: general guidelines. Geneva, 2014.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 7870-2**: control charts. Part 2: shewhart control charts. Geneva, 2013.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 7870-3**: control charts. Part 3: acceptance control charts. Geneva, 2012.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 7873**: control charts for arithmetic average with warning limits. Geneva, 1993.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO GUIDE 33**: reference materials - good practice in using reference materials. Geneva, 2015a.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO GUIDE 35**: reference materials - guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability. Geneva, 2017.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO GUIDE 80:2014(E)**: guidance for the in-house preparation of quality control materials (QCMs). Geneva, 2014.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO GUM**: avaliação de dados de medição: guia para a expressão de incerteza de medição. 1. ed. brasileira. Rio de Janeiro, 2008.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 13528**: statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison. Geneva, 2015b.

JOINT COMMITTEE FOR GUIDES IN METROLOGY. **JCGM 200:2012**: international vocabulary of metrology - basic and general concepts and associated terms (VIM). 3rd ed. Paris, 2012.

MAIO, F. D.; ZENEBON, O.; TIGLEA, P.; SAKUMA, A. M. Avaliação de critérios estatísticos utilizados em programas interlaboratoriais para pesquisa de chumbo em sangue. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 65, n. 2, p. 89-93, 2006.

MANUAL de garantia da qualidade analítica: áreas de identidade e qualidade de alimentos e de insumos. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2015. 51 p.

MANUAL de validação, verificação/confirmação de desempenho, estimativa da incerteza de medição e controle de qualidade intralaboratorial. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2014.

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

OLIVARES, I. R. B.; LOPES, F. A. L. Essential steps to providing reliable results using the analytical quality assurance cycle. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 35, p. 109-121, May 2012.

OLIVARES, I. R. B.; SOUZA, G. B.; NOGUEIRA, A. R. A.; TOLEDO, G. T. K.; MARCKI, D. C. Trends in developments of certified reference materials for chemical analysis - focus on food, water, soil, and sediment matrices. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 100, p. 53-64, Mar. 2018.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: a mature analytical technique with new perspectives – a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1026, p. 8-36, Oct. 2018.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 198-219, 2003.

SOUZA, G. B.; NOGUEIRA, A. R. A.; SANTO, V. R. D.; PICCHI, C. M. C.; GUIMARAES, E. S.; JUNIOR, W. B. Proficiency testing of animal nutrition laboratories. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 14, n. 8/9, p. 455-460, 2009.

THOMPSON, M. Internal quality control in routine analysis. **AMC Technical Briefs**, n. 46, Feb 2010. 2 p.

THOMPSON, M.; ELLISON, L. R. Fitness for purpose – the integrating theme of the revised harmonised protocol for proficiency testing in analytical chemistry laboratories. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 11, n. 8/9, p. 373-378, 2006.

THOMPSON, M.; WOOD, R. Harmonized guidelines for internal quality control in analytical chemistry laboratories (technical report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 67, n. 4, p. 649-666, 1995.

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

UHLIG, S.; LISCHER, P. Statistically-based performance characteristics in laboratory performance studies. **Analyst**, v. 123, n. 6, p. 167-172, 1998.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada, **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1278-1287, 2009.

VISSER, R. G. Interpretation of interlaboratory comparison results to evaluate laboratory proficiency. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 10, n. 10, p. 521-526, 2006.

WESTGARD, J. O.; BARRY, P. L.; HUNT, M. R.; GROTH, T. A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry. **Clinical Chemistry**, v. 27, n. 3, p. 493-501, 1981.

ZSCHUNKE, A. The role of reference materials. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 5, n. 10, p. 441-445, 2000.