

A importância da metrologia química nos resultados das análises de resíduos



Oscar Bahia Filho

TQW Consultoria em Química Analítica e Qualidade
Piracicaba (SP)
Brasil
oscarbfilho@terra.com.br

Resumo

O cumprimento do atendimento ao escopo em análise de resíduos em diversas matrizes passa, obrigatoriamente, pela comparação do resultado obtido com um valor limite estabelecido. Este artigo visou correlacionar as variáveis de recuperação do ensaio de fortificação de amostra-testemunha com a substância de referência e com a da estimativa da incerteza global do processo analítico durante a validação do método analítico, para que os resultados medidos acrescido destes valores não excedam a um critério de aceitabilidade do resultado. O método de análise de doxiciclina em tecido suíno por cromatografia de fase líquida com detector UV-Vis foi utilizado como exemplo.

Palavras-chave

Doxiciclina, Análise de resíduos, Validação de Métodos, estimativa da incerteza, metrologia química, BPL e ISO 17025.

Abstract

Compliance with the service scope in the analysis of residues in various matrices only be done by comparing the result to a value limit. This study aimed to correlate the parameters of the test recovery to fortify control sample with the reference substance with the estimate of overall uncertainty of the analytical procedure for the validation of analytical method, so that the measured results of these increased values do not exceed a criterion of acceptability of the result. The method of analysis of doxycycline, in pig tissue by liquid phase chromatography with UV-Vis detector was used as an example.

Keywords

Doxycycline, Residue Analysis, Method Validation, Measurement Uncertainty, Chemical Metrology, GLP and ISO 17025.

1. Introdução

A análise de resíduos para atendimento às exigências das agências governamentais regulamentadoras, de fiscalização ou de registro no que tange a produtos e serviços que podem causar riscos à saúde humana, animal ou ao meio ambiente é regida por portarias, legislação e decisões; sempre baseadas em valor máximo permitido (VMP) ou limite máximo de resíduo (LMR). Tais valores estão diretamente relacionados à sensibilidade e a resolução dos equipamentos de medição usados no ensaio. Com a evolução da eletrônica aliada à lógica de programação e controle, a sensibilidade e a resolução destes equipamentos estão constantemente sendo melhoradas, resultando em limites de detecção (LD) e, conseqüentemente, em limites de quantificação (LQ) cada vez melhores. Contudo, na metrologia química, tanto o LD quanto o LQ não são dependentes apenas da etapa de medição, mas também de técnicas de manipulação das amostras¹. Infelizmente, a velocidade de desenvolvimento das técnicas de manipulação de amostras não é a mesma dos equipamentos de medição.

Para estabelecer os VMP's ou LMR's, são utilizados estudos de impacto ambiental ou toxicológicos. As diretrizes das boas práticas de laboratório² (BPL) recomendam que tais estudos devam ser conduzidos em instalações apropriadas, por pessoal qualificado, utilizando equipamentos calibrados e, periodicamente verificados, seguindo procedimentos padronizados, rotineiramente inspecionados por pessoal independente e qualificados, fazendo com que os dados brutos obtidos sejam adequadamente arquivados e que o relatório final seja validado por uma auditoria dos dados brutos. Já as diretrizes da norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005³ preconizam o atendimento ao cliente com base em um sistema de gestão estruturado, onde a competência da organização associada às das instalações e equipamentos adequados como chave para a rastreabilidade e a confiabilidade da estudo/ensaio realizado. Ambas as diretrizes das normas são concordantes no que se refere ao estabelecimento da competência da organização em executar um determinado estudo/ensaio e a significância dos resultados produzidos em atender exigências dos clientes⁴ ou refazê-los de maneira mais próxima possível, quando necessário. Nesse sentido, a metrologia química assume o importante papel de promover a confiança nas relações de consumo, de justa concorrência, de conformidade de produtos e serviços disponibilizados no mercado e, sobretudo, de inibir a atuação de empresas inidôneas, esta última tem sido uma constante, pois cabem às agências governamentais o

papel fiscalizador das organizações produtoras ou de prestação de serviços em ensaios⁵.

Nos ensaios analíticos, os resultados são afetados por um grande número de fatores inerentes ao processo de medição. Estudos de robustez são utilizados para estabelecer os fatores críticos que afetam a confiabilidade dos resultados, sob pequenas variações intencionais e a implicação destas modificações no resultado do ensaio. No entanto, a etapa de robustez, geralmente, é feita durante o desenvolvimento/adaptação/otimização do método ou no início do processo de validação. Assim, outros fatores que podem ocorrer em períodos mais longos não podem ser adequadamente avaliados, dentre eles, o comportamento e a estabilidade da substância-teste no sistema-teste sendo um dos principais fatores, principalmente em sistemas orgânicos. Assim, o planejamento e a condução do processo de validação é uma dos principais mecanismos de confiabilidade em um ensaio/estudo de resíduos. Uma das formas mais utilizadas para determinar tanto o comportamento como a estabilidade da substância-teste no sistema teste no processo de validação, é a adição de substância referência em amostras-teste testemunhas e a medida da recuperação da concentração adicionada contra a concentração obtida no ensaio. Outra característica importante da análise/ensaio de resíduos é o estabelecimento dos LD e LQ do método validado. Como, na metrologia química, a quantificação é sempre indireta, isto é, utilizam-se vários níveis de concentração de soluções padrão diluídas como referência da medida e a transformação desta por estabelecimento de algoritmo matemático que estabelece relação entre a concentração conhecida com a resposta obtida do mensurando, resultado na curva analítica. Na construção desta curva, recomenda-se que o LQ seja menor ou igual ao LRM ou VMP requerido. Por tratar de um modelo matemático, via de regra de relações lineares, a análise dos resíduos do modelo ao longo da faixa linear medida torna-se crítico, além de simplesmente avaliar o coeficiente de regressão (R) e os desvios padrão (DP).

A chave para a qualidade e confiabilidade dos resultados de um ensaio é a sua comparabilidade. Para serem comparáveis os resultados analíticos devem ser acompanhados da estimativa da incerteza da medição (IM) que leva em conta a propagação de erros durante o processo analítico. Em geral, os erros de quantificação sistemática podem ser classificados em dois grupos⁶: (i) os que produzem resultados menores que a quantidade realmente presente (perdas, correções, degradações,...) e (ii) os oriundos do erro de medição no momento quantificação (efeitos de

matriz, as variações da matriz). Qualquer que seja a origem dos erros, na análise de resíduo torna-se muito crítica, pois uma determinada formulação pode receber registro por um tempo de carência que não seja real; ou na avaliação do impacto ambiental podem-se emitir resultados que possam levar a conclusões ou ações inadequadas. Nesse contexto, a estimativa da incerteza associada ao intervalo de confiança ou DPR do resultado do ensaio exibe importância ímpar no contexto de confiabilidade. Não é difícil imaginar o resultado de análise de resíduo, em que o mensurando está presente em níveis extremamente baixos (próximos do LQ), a equação de Horwitz⁷ preconiza que a recuperação possa ser na ordem de 50% do valor adicionado e prediz que o intervalo de confiança seja bastante amplo, na ordem de 20%. A coincidência dessas variáveis pode levar a resultados falso/negativo ou falso/positivo. Dessa forma, sugere-se que para estes ensaios um critério de aceitação baseado no conceito de limite de aceitabilidade, similar ao utilizado nos certificados de calibração de equipamentos, como fator importante para tomada de decisões.

No presente artigo será discutido um exemplo utilizando a etapa de estudo de recuperação em sistemas orgânicos utilizando-se adição de doxiciclina em amostras-testemunhas de músculo suíno e os mecanismos de obtenção da estimativa de incerteza associada ao processo para análise crítica do resultado.

2. Experimental

2.1. Aplicabilidade do Método

A aplicabilidade do método deve ser considerada a partir das regras do processo de validação, que preconizam que o método analítico validado seja aplicável a matriz de interesse; que cubra toda a faixa de concentração desejada e que tenha levado em conta toda a manipulação da amostra antes da medida. O atendimento ao propósito é um complemento onde a performance do método deve estar em conformidade com os requisitos do interessado.

A exatidão pode ser aplicada como conceito de limite de aceitabilidade λ . Assim, um resultado analítico Z pode diferir de um valor verdadeiro desconhecido T para uma faixa menor que o limite de aceitabilidade:

$$|Z - T| < \lambda$$

O limite de aceitabilidade depende do processo analítico, assim um processo pode ser validado se atender aos propósitos requeridos:

$$P(|Z - \mu| < \lambda) \geq \beta$$

onde β é a probabilidade que o resultado esteja dentro do limite de aceitabilidade.

Para os ensaios ou estudos onde a matriz analítica pode exercer grande influência no resultado, estudos de recuperação devem ser conduzidos para determinar a possibilidade de provável interferência. Na tentativa de aplicar o conceito de limite de aceitabilidade para ensaios que se utilizam de etapa de fortificação, levando em conta tanto a recuperação aparente como o fator de recuperação e onde também se deve atender um determinado valor, é possível reescrever da seguinte forma:

$$LMR \leq \text{valor}_{\text{medido}} + |Dif_{\text{Rec}\%} + \mu_{\text{global}}|$$

onde o $\text{valor}_{\text{medido}}$ é o valor real medido no ensaio, $Dif_{\text{Rec}\%}$ é o fator de recuperação (em concentração) e μ_{global} é a estimativa da incerteza de fatores previamente definidos.

2.2. Determinado o Fator de Recuperação ($Dif_{\text{Rec}\%}$)

Para a determinação o fator de recuperação, devem ser preparadas 7 réplicas ($n=7$) de solução-padrão diluída no nível de LMR ou VMP e outras 7 réplicas de fortificação no mesmo nível em amostras-testemunhas. Cada uma das réplicas deve ser medida em triplicata. O valor médio encontrado de cada conjunto deve ser submetido ao teste de Grubbs para avaliação de valores suspeitos e ao teste de Fischer, entre os conjuntos para avaliação das variâncias e verificação da influência do efeito matriz. Tanto os valores da recuperação percentual como os DPR obtidos devem satisfazer os critérios de Horwitz. Um trabalho interessante⁷ preconiza o uso criterioso e cuidadoso desta equação quando se trata de análise de baixas concentrações.

2.3. Estimando da $\mu_{\text{método}}$

Para a obtenção da estimativa da incerteza do método analítico foram selecionadas quatro etapas analíticas significativas, que são o preparo da solução referência diluída ($U_{\text{padrão}}$), a construção da curva analítica (U_{curva}), o ensaio da precisão intraensaio ($U_{\text{precisão}}$) e o estudo da exatidão ($U_{\text{exatidão}}$). A equação a seguir mostra a equação utilizada para o cálculo da estimativa da incerteza global:

$$U_{\text{global}} = \sqrt{U_{\text{padrão}}^2 + U_{\text{curva}}^2 + U_{\text{precisão}}^2 + U_{\text{exatidão}}^2}$$

2.3.1. Preparo a solução padrão de referência

A pureza da substância de referência, a massa pesada da substância, a calibração da balança utilizada, os frascos volumétricos utilizados para diluição, os dispositivos de medição das alíquotas, seus certificados de calibração e repetibilidade de todas as operações, constituem as etapas críticas. As equações a seguir são utilizadas para o cálculo da incerteza padrão.

$$U_1 = u_{\text{padrão}}, \text{ com}$$

$$u_{\text{padrão}} = \left[\sum \left(\frac{\Delta m_i}{m_i} \right)^2 \right]^{1/2}$$

onde Δm_i é o erro associado para a medida de um dado parâmetro, tais como peso ou alíquota; m_i é o valor medido em cada uma dessas ações.

2.3.2. Curva analítica (CA)

As medidas efetuadas para todos os níveis de concentração que compõem a faixa linear do método validado são submetidas a estimativa da incerteza, utilizando as equações a seguir:

$$U_2 = \frac{s_{x_0}}{x_0}, \text{ com}$$

$$s_{x_0} = \left(\frac{s_{y/x}}{b} \right) * \left[\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \left[\frac{(y_0 - y_{av})^2}{b^2 * \sum (x_i - x_{av})^2} \right] \right]^{1/2} \text{ e}$$

$$s_{y/x} = \left[\sum \frac{(y_i - y_{icalc})^2}{n-2} \right]^{1/2}$$

onde s_{x_0} é o DP da concentração, calculada da CA; x_0 é a concentração calculada da curva da CA; b é a inclinação da CA; m é o número de níveis de concentração da CA; y_0 é valor experimental do y calculado pela CA da concentração x_0 ; y_{av} é a média dos valores de y ; x_i a concentração dos padrões (x) usados na calibração; x_{av} é média dos valores x_i ; y_i é valores experimentais; y_{icalc} valores calculados pela CA.

2.3.3. Precisão das medidas

Do ensaio de precisão intralaboratório, onde se utilizam seis réplicas da amostra-testemunha fortificada preparada por analistas diferentes, dias diferentes ou equipamentos diferentes; é possível obter a incerteza desta etapa utilizando as seguintes equações:

$$U_3 = \frac{u_p}{x_0}, \text{ com}$$

$$u_p = \frac{s}{n^{1/2}}$$

onde s é o dp do ensaio de precisão; n o número de ensaios.

2.3.4. Exatidão das medidas

Do ensaio de recuperação, onde se utilizam seis réplicas da amostra-testemunha fortificada e o cálculo da recuperação percentual média e o desvio padrão, é possível obter a incerteza desta etapa utilizando as seguintes equações:

$$U_4 = u_{\text{exatidão}}, \text{ com}$$

$$u_{\text{exatidão}} = \frac{s_n}{n^{1/2}}$$

onde s_n é o DPR da recuperação % média; n o número de ensaios.

2.4. Exemplo: Método para a determinação de doxiciclina em músculo suíno

2.4.1. Reagentes e amostras

As amostras e as soluções padrão diluídas foram preparadas a partir de solução estoque e colocadas em frascos âmbar, vedadas e analisadas no mesmo dia, sempre que possível. Todas as soluções e extratos foram armazenados em refrigerador antes da análise. A doxiciclina foi adquirida da Sigma. Foram utilizados solventes acetonitrila G13C51, metanol G36E01 de grau pesticida J.T. Baker; água ultra pura (condutividade $\leq 18 \text{ uS cm}^{-1}$), ácido cítrico G46C43, citrato de sódio G08C57 da J.T. Baker e ácido oxálico G20D59 da Mallinckrodt.

2.4.2. Materiais e instrumentos

Sistema de cromatografia de fase líquida Shimadzu formado com bomba quaternária, amostrador automático e detector de UV/Vis; Coluna analítica CROMA NST 18 (250 x 4,6 mm, 5 μm); fase móvel com solução de Ácido oxálico 50mM (6,5:3,5 água:acetonitrila); vazão de 1,0mL/min; comprimento de onda: 351nm; injeção: 40 μL ; temperatura: 30°C.

2.4.3. Manipulação da Amostra

Cerca de 1,0 g de amostra-testemuma foi agitada com 5 mL da solução tampão hidroalcoólica (8:2 metanol) de citrato 300 mM pH 4 em vórtex seguido de ultrassom e centrifugação para separação do sobrenadante que foi submetido a extração em fase sólida em cartuchos SAX (3mL/60 mg) condicionado com 2 mL de metanol e 2 mL de água:metanol (80:20) e eluição com 2 mL de solução de ácido oxálico 50 mM (4:3:3 água:acetona:metanol). O eluato foi seco à 40°C sob corrente de N₂ e reconstituído de 1 mL da solução de ácido oxálico 50 mM (6,5:3,5 água:acetona) em vórtex. Os extratos foram acondicionados em frascos de injeção.

3. Resultados e discussão

3.1. Validação do método

A metodologia analítica usada resultou em uma boa separação cromatográfica no tempo de 5,1 minutos para o composto estudado. A linearidade foi verificada na faixa de concentração de doxiciclina; os resultados foram expressos em coeficiente de determinação (R²) denotando boa linearidade. Os valores obtidos são mostrados na Tabela 1. O LD foi calculado a partir dos parâmetros da curva analítica (a soma do valor da intersecção com 3 x S_{y/x} (DP)) conforme a equação abaixo:

$$LD = b + (3 * S_{y/x}), \text{ com}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - y_{\text{calculado}})^2}{n - 2}}$$

Tabela 1. Resultados dos parâmetros de validação para o composto doxiciclina obtidos para o método SPE – LC-UV em amostras de músculo suíno.

Parâmetros	SPE – LC_UV
	Doxiciclina
Faixa de calibração (ng mL ⁻¹)	50 a 500
LQ (ng mL ⁻¹) (N=5)	25
Precisão (DPR)	
- precisão intermediária (n=10)	1,76
- repetibilidade (n=5)	1,23
Exatidão (% recuperação ± DPR (n=5))	80,16 ± 1,01

O LQ de 25 ng mL⁻¹ confirma a adequabilidade do método com os requisitos, pois o LMR é de 100 ng g⁻¹. A precisão foi avaliada pelos ensaios de precisão intermediária (dez réplicas de uma amostra, preparadas em dois dias por diferentes colaboradores e medidas em triplicata) e repetibilidade (cinco réplicas com medidas em triplicata).

A exatidão foi expressa pelo estudo da recuperação analítica (razão entre o valor encontrado e o valor esperado multiplicado por 100) utilizando adição de material certificado de referência. Para o composto, cinco experimentos de recuperação foram conduzidos e a concentração padrão usada foi a mesma do ensaio de precisão. Os resultados foram transcritos na tabela 1 como % de recuperação e DPR, mostram a adequabilidade do método validado (70 – 120% e DPR 20%).

3.2. Estimativa da Incerteza

Para a estimativa da incerteza foi aplicado o modelo conhecido como botton-up. Neste modelo, a determinação da incerteza global associada ao resultado produzido pelo método usado é obtida levando-se em consideração as variadas contribuições individuais da incerteza.

A Tabela 2 mostra os resultados dos cálculos da estimativa da incerteza para as etapas consideradas críticas no processo.

Tabela 2. Incertezas relativas ao processo e as variáveis correspondentes.

Variável	Incerteza padrão
Preparação da Solução padrão diluída - μ ₁	0,000701
Curva Analítica - μ ₂	0,143633
Precisão - μ ₃	0,001824
Exatidão - μ ₄	0,319390
Incerteza padrão global	0,350205

A incerteza padrão global encontrada foi de 0,350205 para uma solução padrão de 5,0 ng mL⁻¹, que corresponde a 7% de variação no valor medido. Das quatro fontes de contribuição usadas, a contribuição relativa ao estudo da exatidão foi a mais crítica. A contribuição relativa destas quatro fontes é decididamente dependente das concentrações usadas na construção da curva analítica e da característica de sensibilidade do instrumento de medida.

Banerjee e colaboradores⁸ escreveram artigo sobre validação e incerteza de vários pesticidas em uvas usando a técnica de cromatografia líquida com detecção em espectrometria de massas. De forma geral, os autores encontraram incerteza global com uma ordem de grandeza menor que a encontrada para a doxiciclina. Isto talvez possa ser explicado pelo instrumento de medida ser mais sensível e que a reprodutibilidade da recuperação não ter variado tanto como no método da doxiciclina. Já Ratola e colaboradores⁹, estudando a incerteza associada a análises de pesticidas organoclorados em águas por cromatografia de fase gasosa com detector de captura de elétrons, determinaram que a construção da curva de calibração foi a variável mais crítica na contribuição da incerteza global, representando cerca de 25% para a faixa, podendo representar até 50% se a faixa se estender até próximo do LD.

Ambos os trabalhos determinaram que para um nível de concentração de cerca de 10 ng/g foi possível obter recuperações entre 70-120% com estimativa de incerteza global entre 10-20%. Ora, para um determinado composto que exibe uma recuperação de 70%, se for aplicada uma correção para que o valor represente 100% e somarem-se os 20% da provável incerteza da medida, o valor observado da amostra pode estar acima do LMR ou VPM definido pelo cliente. Em outras palavras, se somarmos o valor encontrado para a amostra ao fator de recuperação e a incerteza global associada ao método de ensaio, o λ pode estar sendo fora do limite. Desta forma, na validação do método, duas etapas devem ser exaustivamente estudadas e metrologicamente determinadas: (i) recuperação do composto e a (ii) estimativa da incerteza global do método.

Considerando o método da doxiciclina, o valor obtido de recuperação foi de 80% e a estimativa da incerteza do método de 7%. Assim, o coeficiente de variação de um resultado obtido deve ser de 27%. Portanto a análise crítica de um resultado de uma amostra de 80 ng/g pode significar que ele esteja fora do LMR específico

4. Conclusão

Na validação de um método para análise de resíduos, onde os resultados dos ensaios serão obrigatoriamente comparados a valores limites, a escolha dos solventes, processos de extração ou de isolamento que fazem parte da etapa de

recuperação devem ser exaustivamente estudados e metrologicamente determinados. O somatório dessa variável com a estimativa da incerteza global do processo da medida determina o intervalo de confiança da medida efetuada usando o método validado. Sempre que possível, deve ser determinado o limite de aceitabilidade do resultado do ensaio para verificar o atendimento ao escopo do cliente.

5. Referências Bibliográficas

1. Valcarcel, M; Lendl, B.. Analytical chemistry at the interface between metrology and problem solving. *Trends in anal. Chem.*, 23 (8): 527-34. 2004.
2. NIT-DICLA-035: *Critérios para o credenciamento de laboratórios de ensaio segundo os princípios das boas práticas de laboratório – BPL*. INMETRO, Rio de Janeiro (Brasil), 2008.
3. NBR ISO/IEC 17025: 2005(E): *Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração*. ABNT, Rio de Janeiro (Brasil), 2005
4. González, A.G.; Herrador, M. A.. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trends in Anal. Chem.* 26 (3): 227-38. 2007.
5. Bahia Filho, O. O paradigma da autogestão nos laboratórios de ensaios. *Scientia Chromatographica*, 1(3): 61-67. 2009.
6. Cuadros-Rogrigues, L.; Almansa-Lopez, E.M.; Garcia-Canpana, A.M.; Gonzalez-Casado, A.; Egea-Gonzales, F.J.; Garrido-Frenich, A.; Martinez-Vidal, J.L.. Setting up of recovery profiles: A tool to performance the compliance with recovery requirements for residue analysis. *Talanta* 66: 1063-72. 2005.
7. Lisinger, T.P.J.; Josephs, R.D.. Limitations of the application of the Horwitz equation. *Trends in Anal. Chem.*, 25(11): 1125-30. 2006.
8. Banerjee, K.; Oulkar, D.; Gasduptha, S.; Patil, S.B.; Patil, S.H.; Savant, R.; Adsule, P;G.. Validation and uncertainty analysis of a multi-residue method for pesticides in grapes using ethyl acetate extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. of Chromatography A*, 1173: 98-108. 2007.
9. Ratola, N.; Santos, L.; Herbert, P.; Alves, A.. Uncertainty associated to the analysis of organochlorine pesticides in water by solid-phase microextraction/gas chromatography-electron capture detection – Evaluation using two diferentes approaches. *Anal. Chim. Acta*, 573-574: 202-08. 2006.