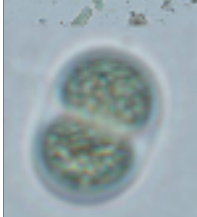
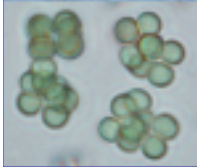
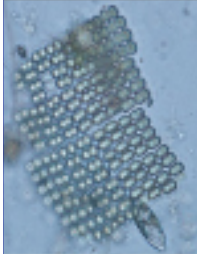
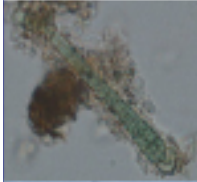




Validação da quantificação de cianobactérias

Carla Cristine Müller
Bióloga

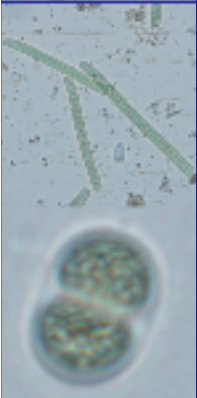
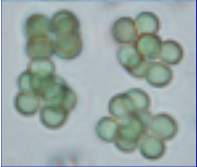
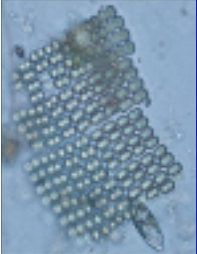
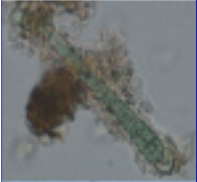
Setor de Hidrobiologia /DEAL/ CORSAN



CONSIDERAÇÕES INICIAIS



- Diferentes métodos para quantificação de cianobactérias;
- Padrões de qualidade não estão estabelecidos para esse ensaio;
- Garantir confiabilidade dos resultados;
- Poucas referências bibliográficas – normas e materiais orientativos voltados para ensaios físico-químicos.

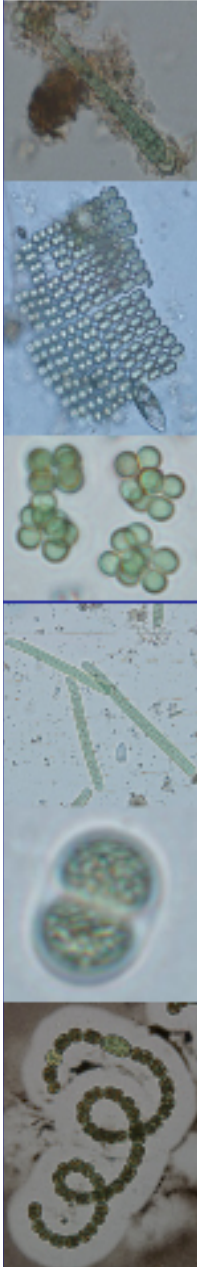




LEGISLAÇÃO

Portaria nº 518/04 Ministério da Saúde

- Padrão de potabilidade vigente;
- N° de células de cianobactérias (concentração de cianotoxinas);
- Determina:
 - Freqüência de amostragem
 - Ponto de coleta





LEGISLAÇÃO

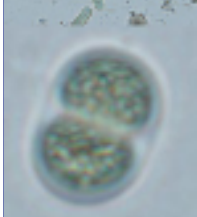
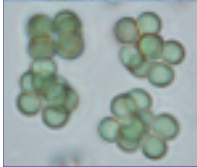
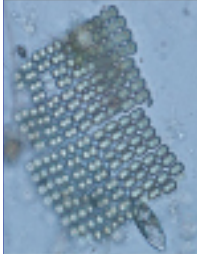
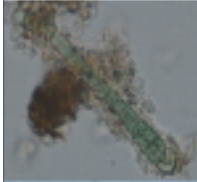
Portaria nº 518/04 Ministério da Saúde

- Artigo 17: Metodologias analíticas

§ 1º : Análise de cianobactérias e cianotoxinas:

Adotar metodologias da OMS até estabelecimento de especificações em normas nacionais:

Chorus, I. & Bartram, J. *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management.*





LEGISLAÇÃO

Portaria nº 518/04 Ministério da Saúde

→ Norma Nacional:

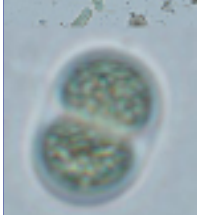
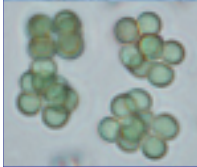
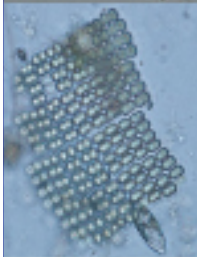
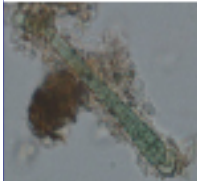
L5.303 – Fitoplâncton de Água Doce. Métodos Qualitativo e Quantitativo. CETESB. Dez. 2005.

→ Normas Internacionais:

APHA, 2005 – Standard Methods – diversos métodos

ASTM, 2004 – Método de Sedgwick-Rafter

EN 15204 – Método de Utermöhl



LEGISLAÇÃO

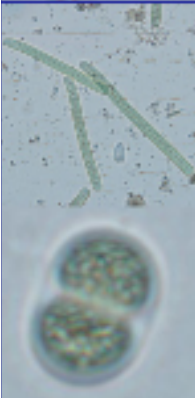
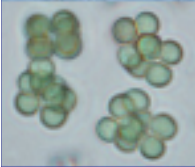
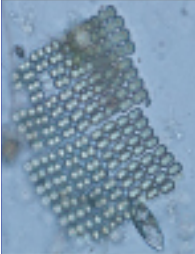
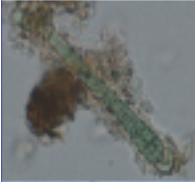


Portaria nº 518/04 Ministério da Saúde

- Artigo 17: Metodologias analíticas (continuação)

§ 3º: Análises para controle e vigilância da qualidade da água:

Laboratório com programa de qualidade interna ou externa ou acreditado ou certificado

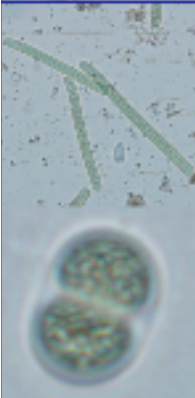
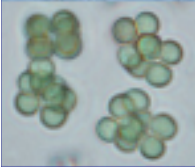
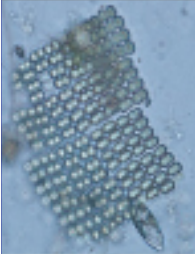
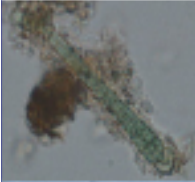




LEGISLAÇÃO

Resolução n° 357/05 CONAMA

- “(...) Classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento e (...) condições e padrões de lançamento de efluentes (...)”
- N° de células de cianobactérias (clorofila *a*)





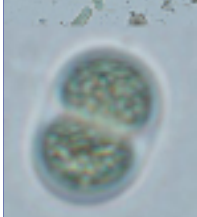
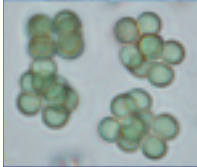
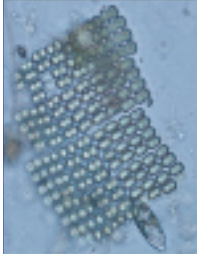
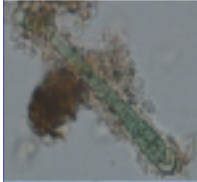
LEGISLAÇÃO

Resolução nº 357/05 CONAMA

- Artigo 8: Monitoramento periódico de conjunto de parâmetros de qualidade de água

§ 3º: resultados analisados estatisticamente e incertezas de medição consideradas.

- Artigo 9: Análise e avaliação dos parâmetros realizadas por laboratórios com procedimentos de controle de qualidade analítica.



QUALIDADE ANALÍTICA

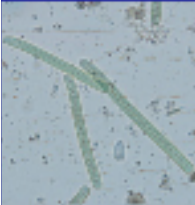
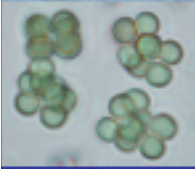
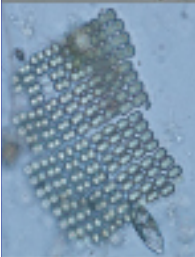
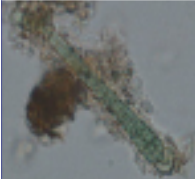


ABNT NBR ISO/IEC 17025

- Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração;

- Item 5.4.2 Seleção de métodos:

*(...) publicados em normas internacionais, regionais ou nacionais, por organizações técnicas respeitáveis
(...) métodos desenvolvidos ou adotados pelo laboratório, se forem apropriados para o uso e se estiverem validados. (...)*

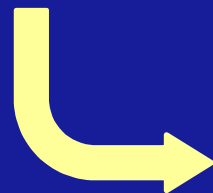




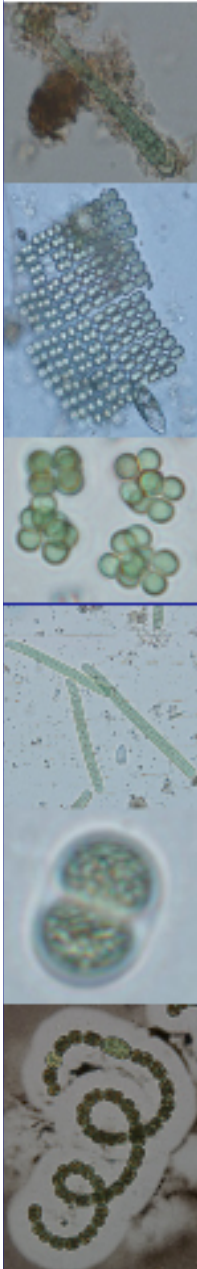
QUALIDADE ANALÍTICA

ABNT NBR ISO/IEC 17025

- Métodos normalizados: publicados em normas internacionais, regionais ou nacionais
- Métodos validados: não normalizados; desenvolvidos pelo laboratório; métodos normalizados usados fora do escopo; ampliações e modificações de métodos normalizados.



confirmar que são apropriados para uso!

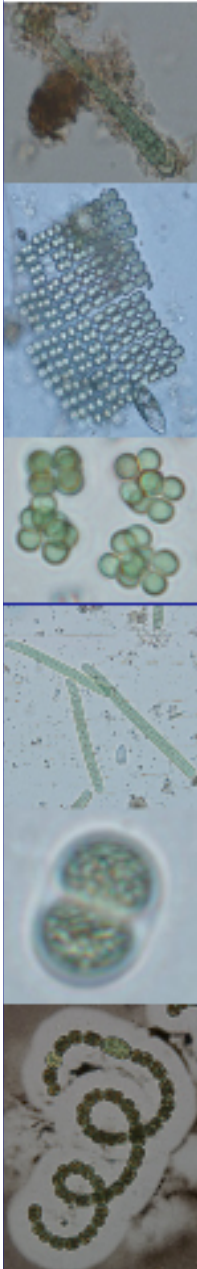


QUALIDADE ANALÍTICA



ABNT NBR ISO/IEC 17025

- Validação de métodos é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos.
- Processo de validação: garantia experimental de que o método é adequado à finalidade proposta, assegurando a confiabilidade dos resultados.





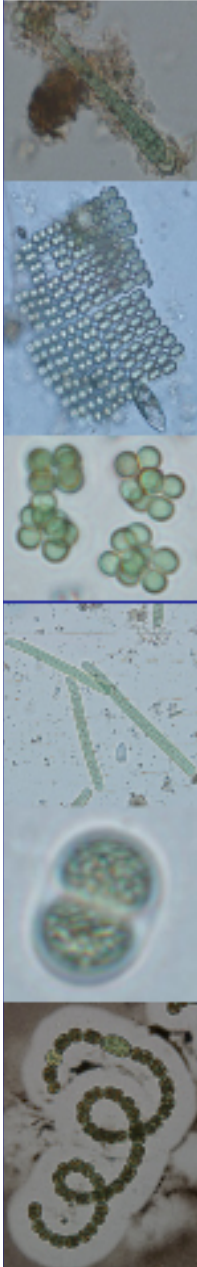
QUALIDADE ANALÍTICA

VALIDAÇÃO

Para que ?



Por quê ?



QUALIDADE ANALÍTICA

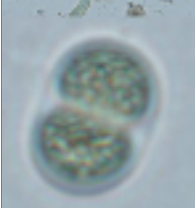
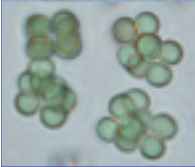
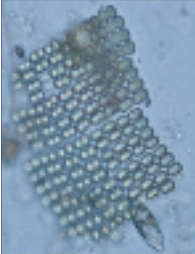
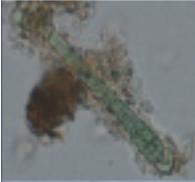


VALIDAÇÃO

Para que ?



- ✓ Assegurar que o método é adequado para a finalidade proposta;
- ✓ Garantir a confiabilidade dos resultados;
- ✓ Acreditação de acordo com os requisitos da ABNT NBR ISO/IEC 17025.



QUALIDADE ANALÍTICA

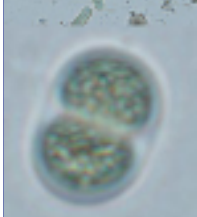
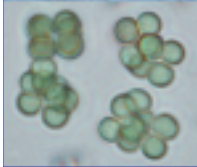
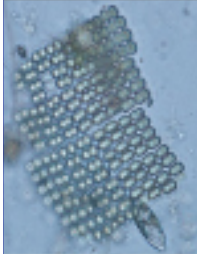
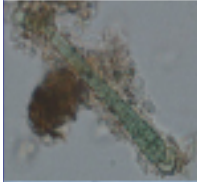


VALIDAÇÃO

Por quê ?



- ✓ Clientes buscam qualidade dos ensaios;
- ✓ Exigência da norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 (item 5.4);
- ✓ Alterações de métodos normalizados devem ser validados (item 5.4.5.2).

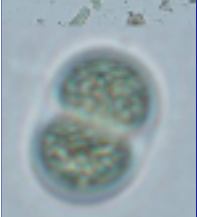
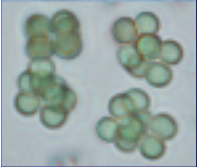
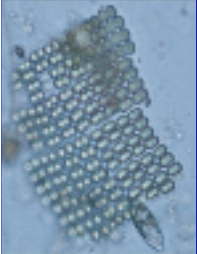
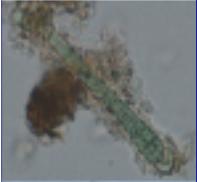




QUALIDADE ANALÍTICA

VALIDAÇÃO

- Processo trabalhoso e demorado;
- Realização de muitos testes;
- Equilíbrio entre custos, riscos e possibilidades técnicas;
- Envolve todos os integrantes do grupo de análise – pode gerar resistência!

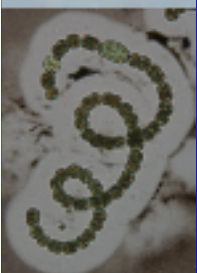
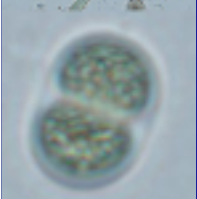
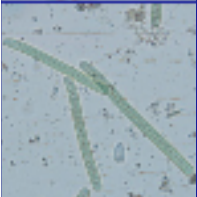
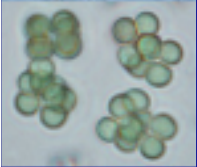
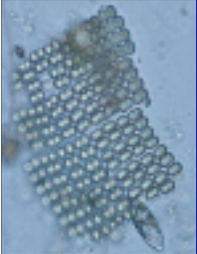
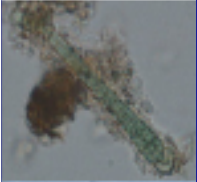




QUALIDADE ANALÍTICA

VALIDAÇÃO

- Registrar o procedimento utilizado para validação;
- Registrar os resultados obtidos;
- Redigir uma declaração de que o método é ou não adequado para o uso pretendido.

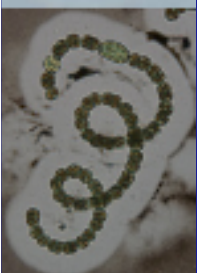
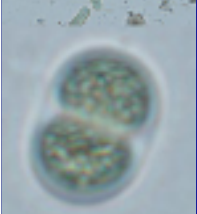
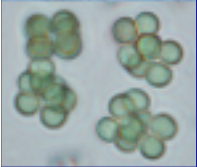
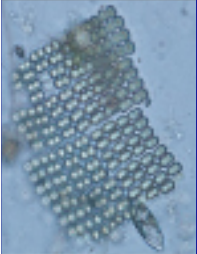
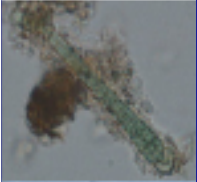




QUALIDADE ANALÍTICA

VALIDAÇÃO

- Determinação do desempenho do método através de uma técnica ou combinação destas:
 - calibração com padrões ou materiais de referência;
 - comparações com outros métodos;
 - comparações interlaboratoriais;
 - avaliação dos fatores que influenciam o resultado;
 - avaliação da incerteza dos resultados.





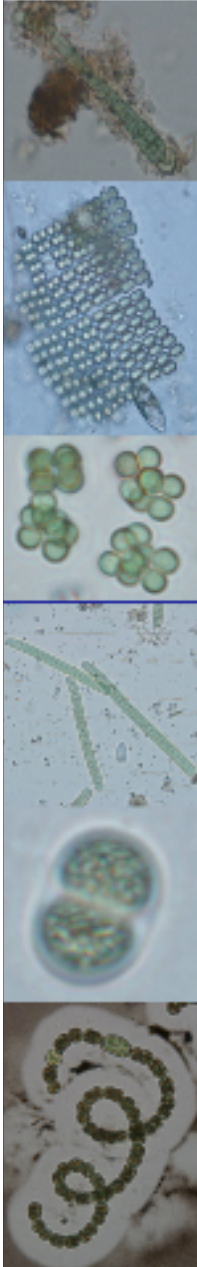
EXEMPLO DE VALIDAÇÃO

MÉTODO DE CONTAGEM DE SEDGWICK-RAFTER

- OBJETIVOS:

→ Amostra viva fornece o mesmo resultado da amostra preservada (?)

→ Remessa das amostras do interior até o Setor de Hidrobiologia sem refrigeração não afeta o resultado final do ensaio (?)



EXEMPLO DE VALIDAÇÃO



- **PROCEDIMENTO:**

→ Estabilidade

→ Exatidão

→ Limites de detecção e quantificação

→ Robustez

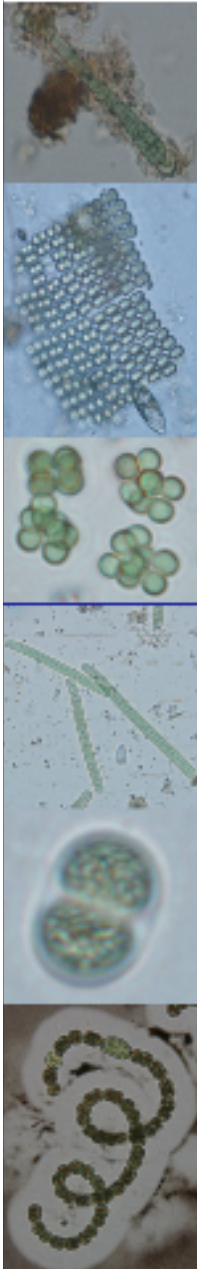
→ Z- score

→ Precisão

→ Incerteza de medição

De acordo com Guia Prático – Validação e Garantia da Qualidade de Ensaio Laboratoriais.

(Albano; Raya-Rodriguez, 2009)



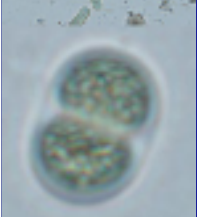
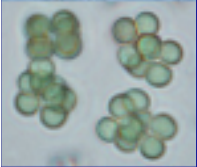
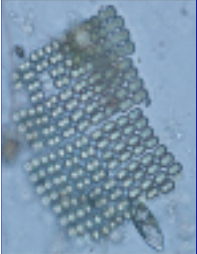
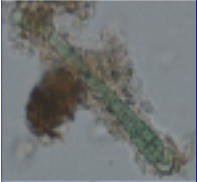
EXEMPLO DE VALIDAÇÃO



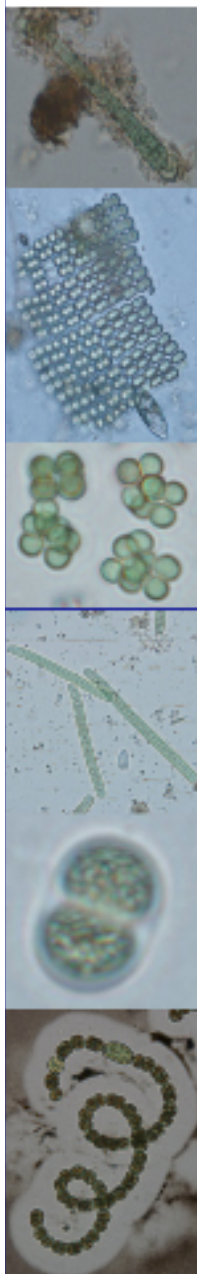
• ESTABILIDADE

Reproduzir condições de armazenamento, manuseio e análise.

- Preservação: 10 cj de amostra (Lugol/viva); análise imediata e 1, 2, 3, 4 e 7 dias após a coleta (duplicata);
- Armazenamento: 10 cj amostra viva (refrigerada/não refrigerada); análise 3, 4 e 7 dias após a coleta (duplicata);
- ANOVA (95% de significância).



EXEMPLO DE VALIDAÇÃO



Amostra	Preservação		Armazenamento	
	Viva	Preservada	Refrigerada	Não refrigerada
1	$3,0 \times 10^3$	$3,3 \times 10^3$	$3,2 \times 10^3$	$3,5 \times 10^3$
2	$8,7 \times 10^4$	$8,5 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	$9,3 \times 10^3$
3	$4,6 \times 10^4$	$4,6 \times 10^4$	$1,1 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$
4	<p>Não há diferença significativa entre contagens das amostras viva e preservada / refrigerada e não refrigerada quando analisadas até <u>3 dias</u> após a coleta.</p>			
5				
6				
7	$8,4 \times 10^3$	$8,0 \times 10^3$	$1,6 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$
8	$5,5 \times 10^3$	$5,3 \times 10^3$	$1,7 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$
9	$1,3 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	$1,1 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$
10	$6,1 \times 10^3$	$5,7 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$

EXEMPLO DE VALIDAÇÃO




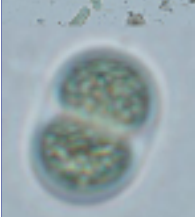
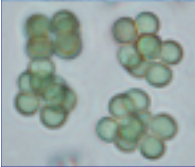
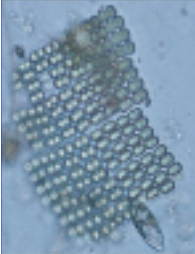
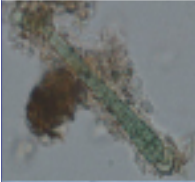
• EXATIDÃO

Concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro.

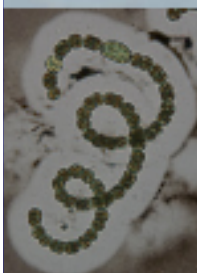
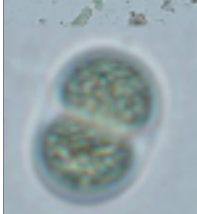
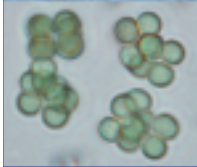
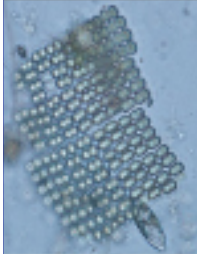
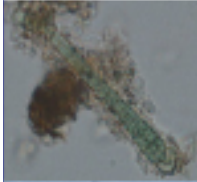
→ Análise de padrões 

→ Fortificar uma matriz branca com analito e calcular a taxa de recuperação 

→ Comparar resultados com método normalizado 
{7 réplicas; Teste-t (variâncias equivalentes)}



EXEMPLO DE VALIDAÇÃO



Réplicas	Método validado (céls.mL ⁻¹)	Método normalizado (céls.mL ⁻¹)
1	3,9 x10 ³	4,6 x10 ³
2	3,8 x10 ³	4,0 x10 ³
3	<p>Os métodos são semelhantes entre si $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$, 95% de confiança</p>	
4	3,6 x10 ³	3,4 x10 ³
5	3,8 x10 ³	4,6 x10 ³
6	3,6 x10 ³	3,7 x10 ³
7	3,0 x10 ³	3,9 x10 ³



EXEMPLO DE VALIDAÇÃO

- LIMITE DE DETECÇÃO DO MÉTODO (LDM) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO DO MÉTODO (LQM)

LDM é a concentração mínima medida maior do que zero (95% de confiança) e **LQM** é a menor concentração que pode ser determinada com nível aceitável de precisão e exatidão

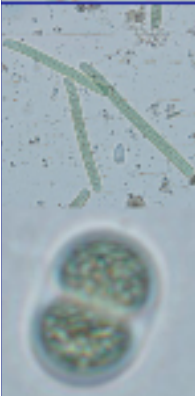
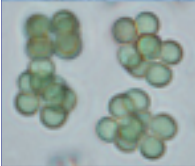
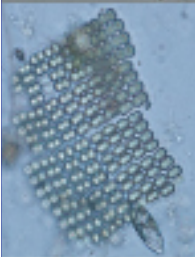
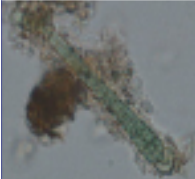
- LDM teórico – distribuição de Poisson – 3 céls.mL⁻¹;
- 7 replicatas.

$$LDM = (t \times \sigma) + \bar{x}$$

$$LQ = \bar{x} + (10 \times \sigma)$$

Sendo:

$t = t$ de *Student* para (n° replicatas – 1), 95% de confiança



EXEMPLO DE VALIDAÇÃO



→ LDM = 18 céls.mL⁻¹

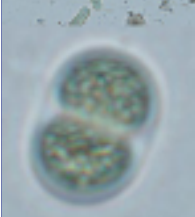
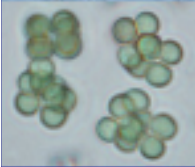
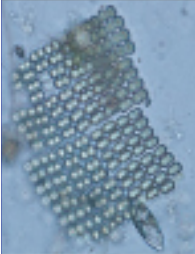
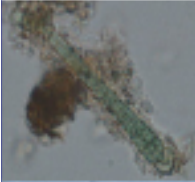
→ LQM = 58 céls.mL⁻¹

- Obtidos experimentalmente e sob as mesmas condições de análise → possuem precisão e exatidão aceitáveis.

• Recalculados em 2011:

→ LDM = 4 céls.mL⁻¹

→ LQM = 7 céls.mL⁻¹



EXEMPLO DE VALIDAÇÃO



- Z-SCORE

Comparação interlaboratorial para avaliação de desempenho.

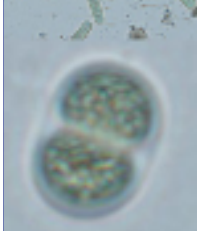
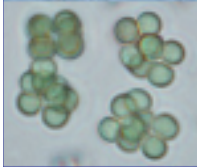
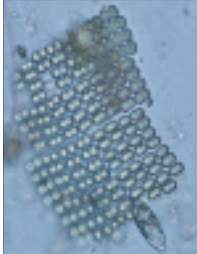
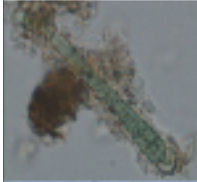
- Programas de Proficiência em Cianobactérias, por exemplo, Rede Metrológica RS

- Desempenho:

Satisfatório: $|Z| \leq 2$

Questionável: $2 < |Z| < 3$

Insatisfatório: $|Z| \geq 3$

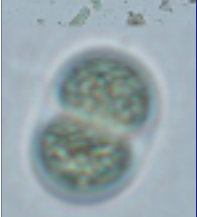
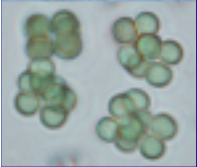
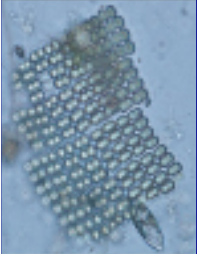
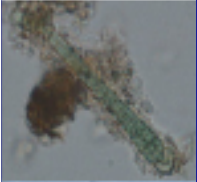


EXEMPLO DE VALIDAÇÃO



- Rodada piloto 2010: $|Z| = 0,23 < 2 =$ desempenho satisfatório
- 1ª Rodada 2011: $|Z| = 0,3 < 2 =$ desempenho satisfatório
- 2ª Rodada 2011: $|Z| = 0,2 < 2 =$ desempenho satisfatório

→ Evidencia a equivalência do método de Sedgwick-Rafter com amostras vivas aos métodos de Sedgwick-Rafter e Utermöhl normalizados.



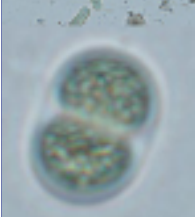
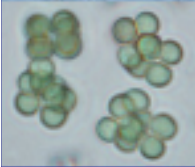
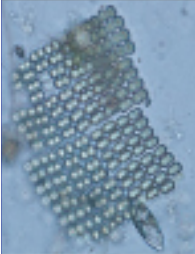
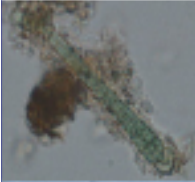
EXEMPLO DE VALIDAÇÃO



- **PRECISÃO**

Concordância entre vários valores experimentais obtidos e quanto menor for a amplitude das medidas, maior a precisão.

- Pode ser expresso pelo desvio padrão ou coeficiente de variação da série de valores de um experimento 👎
- Repetitividade (REPE) e Reprodutibilidade (REPRO) são parâmetros estatísticos relacionados com a precisão 👍



EXEMPLO DE VALIDAÇÃO



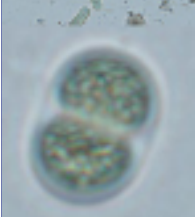
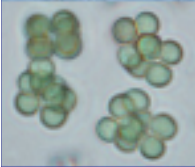
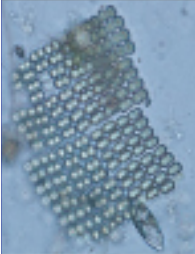
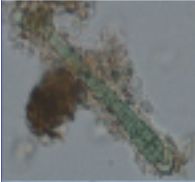
- REPE: grau de concordância entre resultados de medições sucessivas sob mesmas condições

Mesmo procedimento, analista, instrumento de medição, local, em curto período de tempo

- REPRO: grau de concordância entre resultados de medições sucessivas sob condições variadas

Mesma amostra e mesmo procedimento

Diferentes analistas, equipamentos, condições ambientais



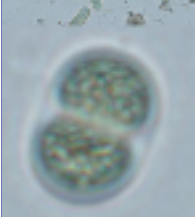
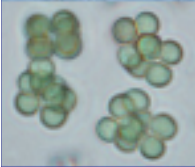
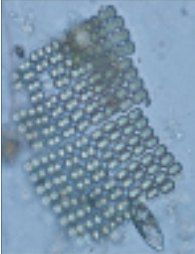
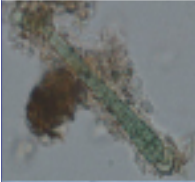
EXEMPLO DE VALIDAÇÃO



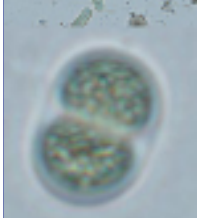
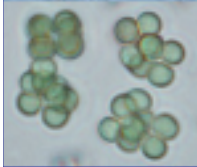
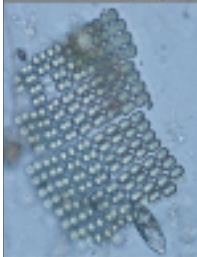
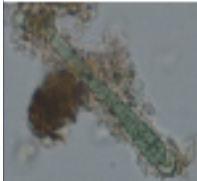
“Estudo Formal de Repetitividade e Reprodutibilidade”

- 2 analistas; 20 amostras; triplicata;
- σ_{REPE} ; σ_{REPRO} ; R&R (%).

Diferentes métodos no Guia Prático



EXEMPLO DE VALIDAÇÃO



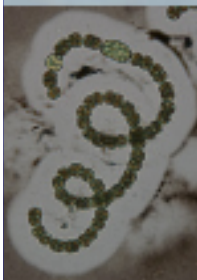
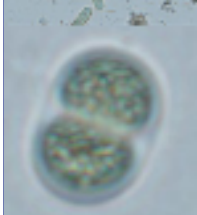
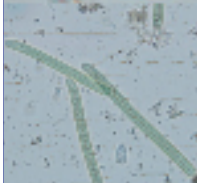
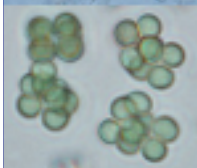
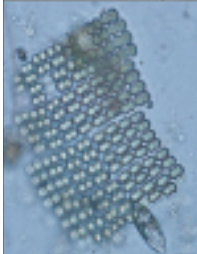
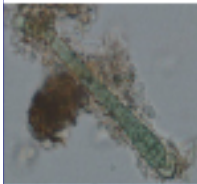
- $\sigma_{REPE} = 0,066$
Variação 75%

- $\sigma_{REPRO} = 0,038$

- R&R = 10%
Aceitável
(AIAG, 2002)

Amostra	Analista 1			Analista 2		
<p>Interferências: baixa contagem de células, sedimentação não aleatória, indivíduos coloniais/filamentosos; amostra viva é suspensão com variabilidade inerente.</p>						
6	4,04	4,05	4,04	4,00	4,09	4,00
7	2,46	2,42	2,44	2,38	2,35	2,31
8	2,51	2,32	2,59	2,43	2,36	2,49
<p>Formação, treinamento e rotina de análise.</p>						
11	2,36	2,28	2,36	2,36	2,22	2,33
12	3,23	3,13	3,23	3,07	3,14	3,35
13	3,40	3,34	3,46	3,36	3,37	3,38
<p>Alta precisão utilizando amostras vivas !!!</p>						
14	3,77	3,75	3,75	3,77	3,77	3,77
16	4,32	4,20	4,32	4,22	4,17	4,17
17	4,30	4,30	4,03	4,28	4,17	4,11
18	3,12	3,29	3,28	3,19	3,30	3,30
19	3,34	3,44	3,43	3,41	3,44	3,45
20	2,96	2,90	3,29	2,97	2,96	3,14

(Corbett et al., 2006)



EXEMPLO DE VALIDAÇÃO



- **ROBUSTEZ**

Suscetibilidade em responder a pequenas alterações das condições experimentais (armazenamento, ambientais, preparação).

- Escolher pelo menos 2 fatores, sendo dois níveis de cada fator e analisar 6 réplicas

3 fatores → 8 combinações

frasco de coleta, microscópio e tempo da coleta até a análise (imediato e 3 dias)

- Calcular desvio da robustez – menor que o desvio da reprodutibilidade = MÉTODO ROBUSTO

EXEMPLO DE VALIDAÇÃO

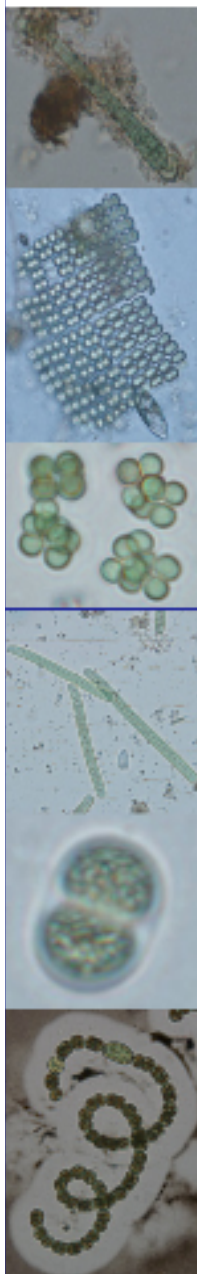


$$\sigma_{\text{ROB}} = 0,023 < \sigma_{\text{REPRO}} = 0,038$$

MÉTODO ROBUSTO

Réplicas	Resultados em céls.mL ⁻¹ das							
	I-M1-C	I-M1-E	I-M2-C	I-M2-E	3-M1-C	3-M1-E	3-M2-C	3-M2-E
1	3,08	3,18	3,05	3,07	3,11	3,02	3,20	3,20
2	3,16	3,08	3,03	3,16	3,12	3,05	3,11	3,15
3	3,22	3,06	3,08	3,16	3,29	3,16	3,11	3,08
4	3,22	3,11	3,02	3,05	3,20	3,15	3,29	3,19
5	3,14	3,26	3,25	3,06	3,20	3,08	3,11	3,17
6	3,11	3,14	3,15	3,18	3,09	3,14	2,94	3,18

I: análise imediata; 3: análise após 3 dias; M1 e M2: microscópios;
C: frasco claro; E: frasco escuro



EXEMPLO DE VALIDAÇÃO

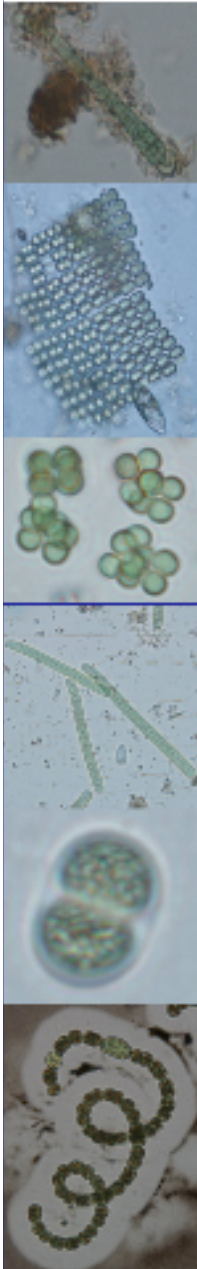


- INCERTEZA DE MEDIÇÃO

Parâmetro associado ao resultado – dispersão dos valores que podem ser atribuídos – dúvida remanescente ao processo de medição.

→ (...) *Em alguns casos, a natureza do método de ensaio pode impedir o cálculo rigoroso (...) da incerteza de medição. Nesses casos, o laboratório deve pelo menos tentar identificar todos os componentes de incerteza e fazer uma estimativa razoável. (...)*

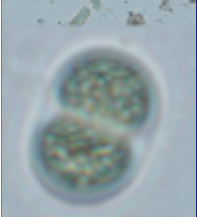
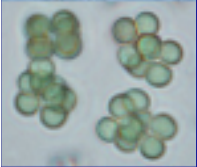
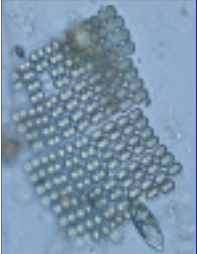
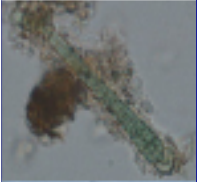
(ABNT, 2005)



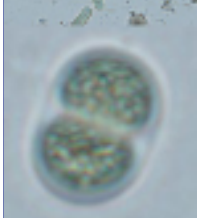
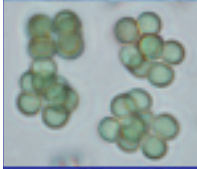
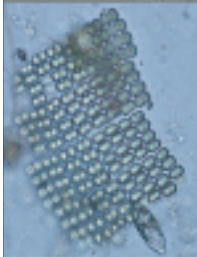
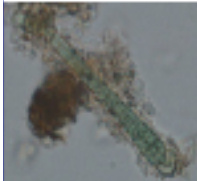
EXEMPLO DE VALIDAÇÃO



- Ensaios microbiológicos e ecotoxicológicos: principal componente de incerteza é a REPRO (RM 68, 2009; ISO/TS 19036, 2006)
- Também pode ser utilizada a REPE (CALA, 2010)
- Ensaio de Cianobactérias/Fitoplâncton utiliza o mesmo procedimento:
 - componentes considerados: REPE e REPRO
 - σ_{REPE} e σ_{REPRO} calculados no estudo da Precisão



EXEMPLO DE VALIDAÇÃO



- IM = 4,8% ou 0,048 (em \log_{10});
- Melhor compreendida quando expressa por intervalo:

Resultado	Incerteza de medição
2,75 (\log_{10})	$\pm 0,048$ (\log_{10})
568 céls.mL ⁻¹	509-634 céls.mL ⁻¹



• Recalculada em 2011:

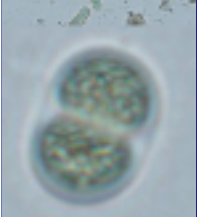
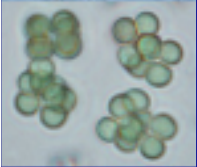
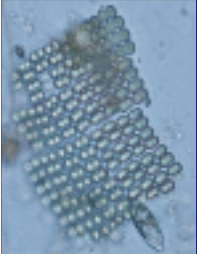
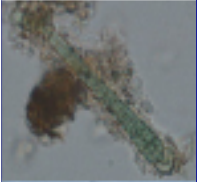
- IM = 5,2% ou 0,052 (em \log_{10});
- 568 céls.mL⁻¹ (503-641 céls.mL⁻¹).

EXEMPLO DE VALIDAÇÃO



CONCLUSÕES

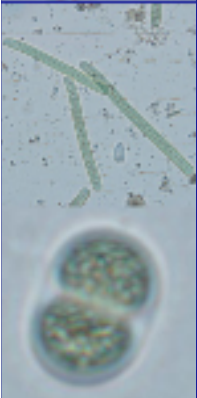
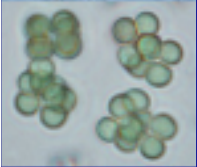
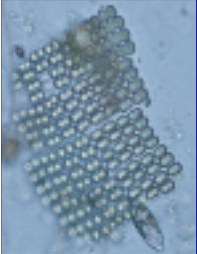
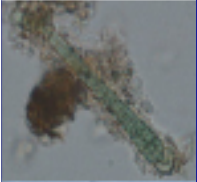
- Validação do método de Sedgwick-Rafter para quantificação de cianobactérias/fitoplâncton com amostras vivas foi atingida;
- Estabelecido o prazo de 72 horas entre coleta e análise das amostras – armazenamento com ou sem refrigeração;
- Método validado equivalente aos métodos normalizados;
- LDM, LQM, precisão e incerteza de medição → maior conhecimento do ensaio → melhoria contínua.



CONSIDERAÇÕES FINAIS



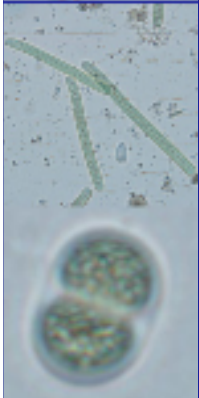
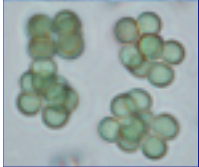
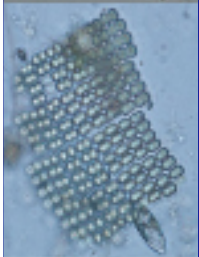
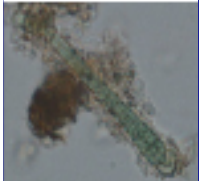
- Importância do monitoramento fitoplanctônico;
- Utilização de métodos adequados – métodos microscópicos normalizados ou validados;
- Normas de qualidade → demonstração de competência; parâmetros de garantia da qualidade do resultado; conhecimento do método e melhoria contínua;
- Formação e treinamento dos analistas (quali e quanti) e infra-estrutura de trabalho.



REFERÊNCIAS



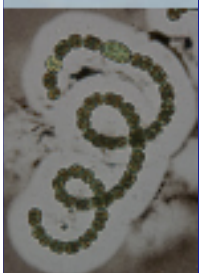
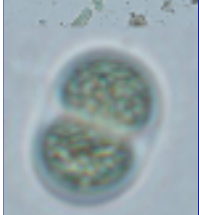
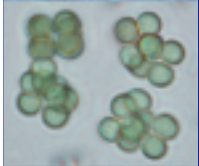
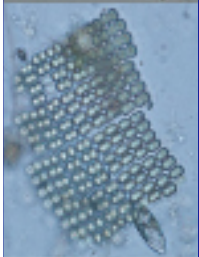
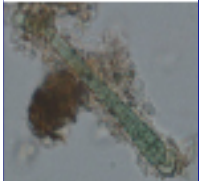
- ABNT. NBR ISO/IEC 17025: Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2005.
- ALBANO, F. M.; RAYA-RODRIGUEZ, M. T. Validação e Garantia da Qualidade de Ensaio Laboratoriais. Guia Prático. Porto Alegre, RS: Rede Metrológica RS, 2009. 136p.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 21. Ed. Washington, 2005.
- ASTM D4148-82:2004. Standard Test Method for Analysis of Phytoplankton in Surface Water by the Sedgwick-Rafter Method.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004: estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Brasília: *Diário Oficial da União*, n. 59, 26/03/2004, p. 266-270.
- CANADIAN ASSOCIATION FOR LABORATORY ACCREDITATION INC. – CALA. Measurement Uncertainty Policy. P19, Revision 1.10, 2010.
- CHORUS, I.; BARTRAM, J. *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Published on behalf of WHO – World Health Organization by Taylor and Francis. London & New York, 1999.



REFERÊNCIAS



- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. Resolução CONAMA nº 357 de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial da União, n. 53, p. 58-63, Mar. 2005
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL – CETESB. Norma Técnica L5.303: Fitoplâncton de Água Doce - Métodos Qualitativo e Quantitativo (Método de Ensaio). São Paulo, 2005.
- EN 15204:2006. Water Quality – Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy (Utermöhl technique).
- ISO / TR 13843:2001. Water quality – Guidance on validation of microbiological methods.
- ISO / TS 19036:2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines of the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations.
- RM 68 – Incerteza de medição guia prático do avaliador de laboratórios. Revisão 03. Rede Metrológica, Porto Alegre, 2009.





MUITO OBRIGADA!

carla.muller@corsan.com.br

Hidrobiologia

3215-5760

