

**I-021 – PRECISÃO E INCERTEZA DE MEDIÇÃO EM ENSAIO
HIDROBIOLÓGICO****Carla Cristine Müller⁽¹⁾**

Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas, Mestre em Ecologia e Doutora em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Bióloga da Companhia Riograndense de Saneamento (CORSAN).

Juliana Karl Frizzo

Bacharel e Licenciada em Biologia, Mestre e Doutora em Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Pós-doutorado em Neurobiologia Celular pelo European Brain Research Institute (EBRI), Roma, Itália. Bióloga da Companhia Riograndense de Saneamento (CORSAN).

Solange Corrêa

Licenciada em Ciências e Matemática pela Faculdade Porto-Alegrense. Licenciada em Biologia pela Universidade Luterana do Brasil. Pós-graduação em Educação Ambiental pelo Centro Universitário La Salle. Funcionária da Companhia Riograndense de Saneamento (CORSAN).

Andréa Vidal dos Anjos

Bacharel em Farmácia e Bioquímica pela Universidade Católica de Pelotas. Pós-graduação em Saúde Pública pelo Instituto Metodista de Educação e Cultura. Funcionária da Companhia Riograndense de Saneamento (CORSAN).

Endereço⁽¹⁾: Avenida Antônio de Carvalho, 2667 – Jardim Carvalho – Porto Alegre - RS - CEP: 95430-001 - Brasil - Tel: (51) 3215-5760 - e-mail: carla.muller@corsan.com.br

RESUMO

O reconhecimento de competências, baseado em normas de qualidade, gera competitividade entre prestadores de serviços e aumenta a confiabilidade dos resultados entregues aos clientes. Nesse sentido, os laboratórios de ensaio buscam a implantação da NBR ISO/IEC 17025. Dentre os requisitos dessa Norma consta a seleção de métodos normalizados ou validados. Em caso de validação de método, deve-se estabelecer um estudo, envolvendo diversos parâmetros a serem analisados, como precisão e incerteza de medição. O objetivo do presente trabalho é avaliar esses parâmetros na contagem de fitoplâncton. O método utilizado foi o de Sedgwick-Rafter validado pelo laboratório Central de Águas da Companhia Riograndense de Saneamento (DEAL/SUTRA) para a utilização de amostras vivas. Avaliando dois analistas, realizando análises em triplicata, foi estabelecido um desvio de precisão de 10%, considerado baixo e aceitável para amostras biológicas e uma incerteza de medição de 4,8%, em \log_{10} . O estabelecimento desses parâmetros contribui para a garantia da qualidade analítica dos resultados da análise de fitoplâncton.

PALAVRAS-CHAVE: Fitoplâncton, incerteza de medição, NBR ISO/IEC 17025, precisão.

INTRODUÇÃO

A implantação e manutenção de um sistema de gestão da qualidade, concebido para melhorar continuamente o desempenho de um laboratório, levando em consideração as necessidades de todas as partes interessadas, pode resultar no sucesso de uma organização. A competitividade aumenta quando os clientes estão preocupados com a qualidade e confiabilidade dos resultados analíticos, incentivando os prestadores de serviços na busca por reconhecimento de suas competências.

Em relação à água para abastecimento público, as empresas responsáveis pelo tratamento e distribuição da água à população devem seguir o padrão de potabilidade vigente, à saber, a Portaria nº 518/04 do Ministério da Saúde (1). Além disso, também devem seguir a Resolução nº 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) (2), em relação às classes de enquadramento das águas e seus usos preponderantes. Na Portaria nº 518, em seu artigo 17º, § 3º, consta que as análises laboratoriais para o controle e vigilância da qualidade da água, devem ser realizadas por laboratório que mantém programa de controle da qualidade interna ou externa ou ainda acreditado ou reconhecido por órgãos competentes para esse fim. Já no artigo 9º da Resolução CONAMA, a realização das análises dos parâmetros de qualidade da água deverá ser feita por laboratório que adote procedimentos de controle da qualidade analítica, analise estatisticamente e considere as incertezas de medição dos resultados do monitoramento da qualidade da água.

Nesse sentido, a NBR ISO/IEC 17025 (3) traz os requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração e reconhece os laboratórios capacitados para análises específicas através de acreditação pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) ou reconhecimento por Rede Metrológica Estadual. Dentre os requisitos da referida Norma, na seção 5 – Requisitos Técnicos, o item 5.4.2 trata da seleção de métodos, e o item 5.4.6, da estimativa da incerteza de medição. O laboratório deve utilizar, de preferência, métodos publicados em normas internacionais, regionais ou nacionais, por organizações técnicas ou publicações científicas. Também pode utilizar métodos desenvolvidos pelo laboratório ou não abrangidos por métodos normalizados. Estes últimos, bem como métodos normalizados usados fora do seu escopo original, ou ampliações e modificações de métodos normalizados precisam passar por uma etapa de validação. Segundo o item 5.4.5 da NBR ISO/IEC 17025 (3), “validação é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos”.

O item 5.4.6.2 solicita que os laboratórios de ensaio tenham e apliquem procedimentos para a estimativa da incerteza de medição. A incerteza está relacionada ao valor de medição. Caracteriza-se como um intervalo de valores que podem ser atribuídos ao mensurando, dentro do qual está o valor verdadeiro que, na prática, não é conhecido. Em alguns casos, a natureza do método de ensaio pode impedir o cálculo rigoroso, metrologia e estatisticamente válido da incerteza de medição (3). Nesses casos, o laboratório deve, pelo menos, tentar identificar todos os componentes de incerteza e fazer uma estimativa razoável. Este é o caso dos ensaios biológicos.

Nesse contexto, insere-se o ensaio hidrobiológico de quantificação do fitoplâncton. Os métodos normalizados mais utilizados para contagem são o de Utermöhl e o de Sedgwick-Rafter. No entanto, no Departamento de Ensaios e Apoio Laboratorial da Companhia Riograndense de Saneamento (DEAL/CORSAN), o método utilizado pelo Setor de Hidrobiologia para análise qualitativa e quantitativa do fitoplâncton é o método de Sedgwick-Rafter com modificação. Contrário ao método normalizado, que utiliza amostra preservada para quantificação dos organismos, o método utilizado no DEAL usa amostras vivas. Assim, foi realizado um estudo de validação deste método avaliando os seguintes parâmetros (4): estabilidade, exatidão, robustez, Z-score, limite de detecção do método (LDM), limite de quantificação do método (LQM), precisão e incerteza de medição; sendo os dois últimos abordados neste trabalho.

A avaliação da precisão reflete a concordância entre vários valores experimentais obtidos. Quanto menor a amplitude dos resultados, maior será a precisão. Esta pode ser expressada pelo desvio padrão ou coeficiente de variação de uma série de valores de um experimento ou pelos parâmetros de Repetitividade (REPE) e Reprodutibilidade (REPRO). A REPE é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurado, efetuadas sob as mesmas condições de medição, mesmo observador, mesmo instrumento usado sob mesmas condições, mesmo local e repetições em curto espaço de tempo. A REPRO é o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, que podem ser amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo local, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como diferentes analistas, diferentes equipamentos e diferentes tempos de análise.

A estimativa da incerteza de medição caracteriza a dispersão dos valores que podem ser atribuídos a um mensurado, isto é, uma faixa ou intervalo e não um valor pontual. Para ensaios biológicos, não é possível avaliar todos os componentes que contribuem para a incerteza do ensaio de forma individual. A reprodutibilidade é referida como a principal fonte de incerteza para esses ensaios. No entanto, também será considerada como componente de incerteza a repetitividade, uma vez que ambas (REPE e REPRO) agregam todos os fatores significativos de influência no ensaio.

Em função do exposto anteriormente, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a precisão do método de Sedgwick-Rafter utilizando amostras vivas e a incerteza de medição para o ensaio quantitativo do fitoplâncton.

MATERIAIS E MÉTODOS

As contagens dos organismos fitoplanctônicos foram realizadas através do método de Sedgwick-Rafter com amostras *in natura*. As amostras, provenientes de diferentes mananciais superficiais utilizados para abastecimento público, foram coletadas em frascos de polietileno branco leitoso com capacidade para 1 L (Figura 1). Após recebidas pelo Setor de Hidrobiologia, elas eram preparadas para análise.



Figura 1. Frasco de coleta para análise do fitoplâncton.

A concentração das amostras foi realizada por centrifugação a 2.500 rpm, por 20 minutos (5). Em seguida, as câmaras de contagem eram preparadas (Figura 2) e deixadas para sedimentação, por 15 minutos, em local plano e livre de movimento. A identificação e a contagem dos organismos, em nível de gênero, foi realizada em microscópio óptico comum. Dependendo da densidade de organismos, realizava-se a contagem em campos ou faixas da câmara de contagem. A ocular do microscópio estava equipada com retículo de Whipple calibrado (Figura 3) para delimitar os campos de contagem (5,6).



Figura 2. Câmara de Sedgwick-Rafter.

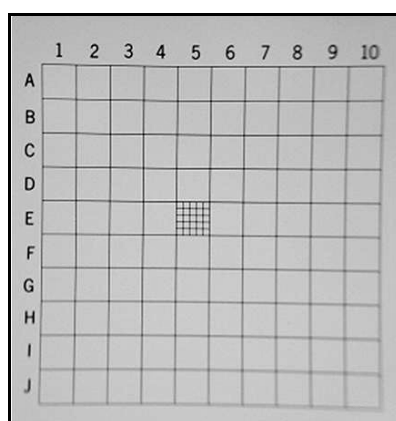


Figura 3. Retículo de Whipple.

Os cálculos para a expressão dos resultados, em células.mL⁻¹, seguem as Equações 1 e 2, conforme abaixo.

- Contagem de campos:

$$n^{\circ} \text{ células.mL}^{-1} = \frac{C \times 1000 \text{ mm}^3}{A \times D \times F} \quad \text{Equação (1)}$$

Sendo:

C: n° de células contadas;

A: área do campo (= área do retículo de Whipple), mm²;

D: profundidade do campo (= profundidade da câmara de contagem), mm;

F: n° de campos contados.

• Contagem de faixas:

$$n^{\circ} \text{ células.mL}^{-1} = \frac{C \times 1000 \text{ mm}^3}{L \times D \times W \times S} \quad \text{Equação (2)}$$

Sendo:

C: n° de células contadas;

L: comprimento da faixa (= comprimento da câmara de contagem), mm;

D: profundidade da faixa (= profundidade da câmara de contagem), mm;

W: largura da faixa (= largura do retículo de Whipple), mm;

S: n° de faixas contadas.

As câmaras de contagem foram calibradas, em volume e dimensões lineares, por laboratório especializado e credenciado à Rede Brasileira de Calibração (RBC).

A avaliação da precisão seguiu o Estudo Formal de Repetitividade (REPE) e Reprodutibilidade (REPRO), de acordo com Albano e Raya-Rodriguez (7).

As amostras utilizadas no estudo da precisão e no cálculo da incerteza de medição foram provenientes da rotina do laboratório. Foram avaliadas 20 amostras, sendo cada amostra contada, no mesmo dia, por dois analistas, em triplicata. Os analistas eram profissionais biólogos treinados e atuantes na rotina de análises laboratoriais.

Os resultados das contagens foram transformados em log₁₀ e analisados estatisticamente, obtendo-se o desvio da REPE (σ_{REPE}), o desvio da REPRO (σ_{REPRO}) e o desvio de REPE e REPRO (% R&R) (7).

Os mesmos resultados foram utilizados para a estimativa da incerteza de medição, sendo considerados como componentes de incerteza os desvios de REPE e de REPRO, e calculada conforme CALA (8) e Albano e Raya-Rodriguez (7).

Cada desvio foi utilizado para o cálculo do Desvio Padrão Relativo (RSD) e das Incertezas Padrão (IP), conforme Equação 3.

$$IP(\%) = RSD \times 100 = \left(\frac{\sigma}{\text{média das contagens}} \right) \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$

Sendo RSD o desvio padrão relativo calculado para cada componente de incerteza, isto é, REPE e REPRO (IC) e a incerteza expandida (IE), foram calculadas seguindo CALA (8) através da Equação 4 e da Equação 5, respectivamente. *k* é o fator de abrangência para 95,45% de probabilidade (9) obtido em função do grau de liberdade efetivo.

$$IC = \sqrt{RSD_{REPRO}^2 + RSD_{REPE}^2} \quad \text{Equação (4)}$$

$$IE = IC \times k \quad \text{Equação (5)}$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Estudo Formal de REPE e REPRO é uma avaliação que permite decompor a parcela da variabilidade referente a REPE e a REPRO, identificando as maiores contribuições para as possíveis variações de um ensaio (7). A Tabela 1 mostra os resultados das contagens em cél.mL^{-1} . Assim, a REPE mostrou-se como a maior fonte de incerteza para o ensaio com 75% de contribuição. O desvio de REPE, em \log_{10} , foi de 0,066 e o da REPRO, também em \log_{10} , foi de 0,038. O desvio de R&R, que avalia a variabilidade total do ensaio, foi de 10%, sendo considerado baixo e aceitável, pois essa faixa de aceitação está baseada em ensaios físico-químicos, onde as condições de REPE e REPRO são menos variáveis (10).

Tabela 1. Resultados das contagens, em células.mL⁻¹, do estudo de precisão.

Amostra	Analista 1			Analista 2		
	Via 1	Via 2	Via 3	Via 1	Via 2	Via 3
1	8055	8813	8228	6269	5914	5607
2	12812	13725	13584	10797	9438	11026
3	9605	9693	10528	8513	9643	10750
4	5242	5193	5271	4368	4532	4617
5	5626	6557	5367	3696	3658	3840
6	43781	42771	43438	39614	39231	39660
7	288	263	279	241	222	203
8	326	208	387	269	227	312
9	402	456	472	458	323	364
10	90	164	82	71	77	82
11	232	189	230	229	165	215
12	1690	1350	1706	1186	1377	2242
13	2520	2179	2853	2294	2068	2396
14	173	229	210	246	278	226
15	148	153	230	130	162	130
16	21132	15951	20931	16455	14829	14872
17	20077	19854	10641	18585	14958	12810
18	1318	1940	1911	1552	1979	1979
19	2194	2775	2679	2592	2771	2816
20	907	794	1954	931	917	1395

O alto desvio de REPE pode estar refletindo algumas interferências, como a baixa concentração de organismos na amostra, presença de formas coloniais ou filamentosas, sedimentação não aleatória dos indivíduos na câmara de contagem e a natureza da amostra viva que não é uma solução perfeita, mas uma suspensão com variabilidade inerente (11,12). Com relação à REPRO, a rotina de análise e os treinamentos específicos dos analistas para o ensaio de fitoplâncton, contribuem para o baixo desvio observado.

A incerteza de medição, para resultados em \log_{10} , foi de 4,8%, resultante de uma incerteza expandida igual a 0,048 com fator de abrangência para 95,45% equivalente a 2,03. Como o resultado da análise é fornecido na unidade de cél.mL^{-1} e não em \log_{10} , não é apropriado expressar a incerteza de medição em percentual de \log_{10} . Além disso, dificulta a interpretação do resultado final. A forma mais adequada para apresentar o resultado é na forma de intervalo, dentro do qual está inserido o resultado da medição. Por exemplo, para um resultado de contagem do fitoplâncton igual a $5.000 \text{ células.mL}^{-1}$, a expressão com a incerteza de medição deve ser $[5.000 \text{ células.mL}^{-1} (3415-7320 \text{ células.mL}^{-1})]$.

Além de conhecer a precisão e a incerteza de medição do ensaio quantitativo do fitoplâncton, este estudo também permitiu construir uma carta de controle do ensaio, baseada em dados de precisão do grupo de analistas, a fim de verificar se as condições de ensaio se mantêm constantes no tempo ou estão sofrendo alterações. Assim, a Figura 4 apresenta a carta de controle inicial sendo o limite de controle superior (LCS) estabelecido a partir da amplitude dos resultados de contagem entre os analistas. Esta carta está baseada no modelo de carta de controle para valores individuais, conforme Albano e Raya-Rodriguez (7). A linha central

representa a média das amplitudes consideradas e os pontos que serão marcados na carta devem ficar abaixo do LCS. Quanto mais próximo de zero, melhor o resultado da precisão, significando menor amplitude de resultados entre os analistas. Uma aplicação prática do uso da carta de controle é no treinamento de novos analistas. A participação do novo analista no estudo de REPE e REPRO que alimenta a carta de controle, permite verificar se a variabilidade dos resultados se mantém ou aumenta. Se os pontos marcados na carta, gerados com a participação do treinando ficarem dentro do limite de controle, ele poderá realizar os ensaios na rotina, pois o padrão de precisão não foi alterado. Caso contrário, o treinamento deve continuar até que os resultados voltem a ficar dentro da faixa de aceitação.

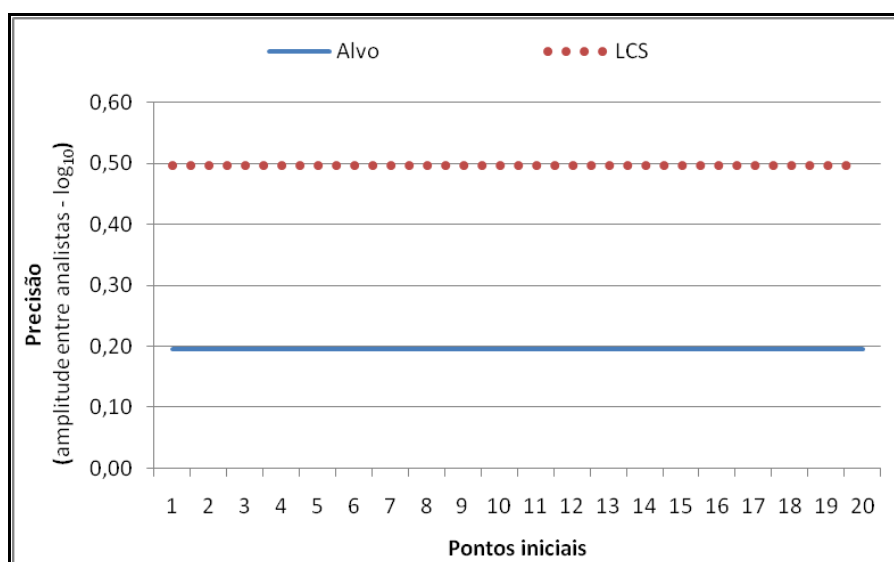


Figura 4. Exemplo de carta de controle da precisão do ensaio de contagem de fitoplâncton.

CONCLUSÕES

Após análise dos dados concluiu-se que:

- O treinamento dos profissionais é uma etapa fundamental para a formação de analistas capacitados na quantificação do fitoplâncton, evidenciada pela alta precisão obtida pelo método estudado (desvio R&R igual a 10%);
- O método de Sedgwick-Rafter utilizando amostras vivas apresentou uma incerteza de medição baixa, sendo de 4,8% em \log_{10} ;
- Verificou-se que a REPE é uma importante fonte de variabilidade para a análise, sendo necessário incluí-la como uma componente de incerteza no cálculo da incerteza de medição. Esta estimativa confere confiabilidade aos resultados de analíticos;
- Em se tratando de material biológico, a precisão e a confiabilidade do método estão satisfatórias e adequadas à utilização em análises de rotina laboratorial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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, 26/03/04, p. 266-270.
2. 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.

3. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR ISO/IEC 17025: Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2005.
4. MÜLLER, C.C.; RAYA-RODRIGUEZ; M. T. M.; CYBIS, L. F. Validação do método de Sedgwick-Rafter para a quantificação do fitoplâncton. *Revista DAE*, 2011 (no prelo).
5. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION (APHA; AWWA; WEF). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 21 ed. Washington, D.C., 2005.
6. COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). *Norma Técnica L5.303: Fitoplâncton de Água Doce – Método Qualitativo e Quantitativo (Método de Ensaio)*. São Paulo, 2005.
7. ALBANO, F. M.; RAYA-RODRIGUEZ, M. T. *Validação e Garantia da Qualidade de Ensaio Laboratoriais – Guia Prático*. Porto Alegre, RS,: Rede Metrológica RS, 2009.
8. CANADIAN ASSOCIATION FOR LABORATORY ACCREDITATION INC. (CALA). *Measurement Uncertainty Policy*. Revision 1.10, 2010.
9. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (ABNT; INMETRO). *Guia para a expressão da Incerteza de Medição (GUM)*. 3 Ed. Rio de Janeiro, 2003.
10. AUTOMOTIVE INDUSTRY ACTION GROUP (AIAG). *Measurement Systems Analysis*. 3 ed. Detroit: Chrysler Corporation, Ford Motors Company and General Motors Corporation, 2002.
11. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). *ISO 19458: Water Quality – Sampling for microbiological analysis*. Suíça, 2006.
12. KARLSON, B. *et al.* Introduction to methods for quantitative phytoplankton analysis. In: KARLSON, B.; CUSACK, C.; BRESNAN, E. (Editors.) *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis*. UNESCO (IOC Manuals and Guides, nº 55). (IOC/2010/MG/M), Paris, 2010.