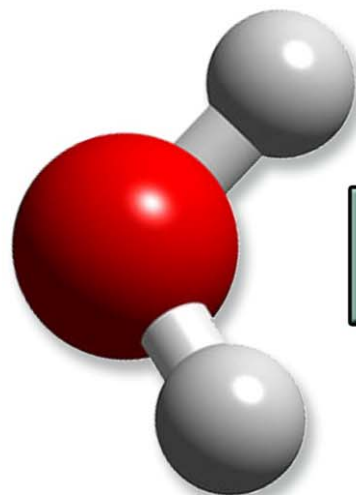


Conselho Regional de Química IV Região (SP)



Minicursos 2015

Orientações básicas para validação de metodologias analíticas

Ministrante: João Cristiano Ulrich

Mestrado e Doutorado pelo Ipen/USP

e-mail: jculrich@ig.com.br

Apoio:

CAIXA

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PÁTRIA EDUCADORA

São Paulo, 16 de setembro de 2015



**M
I
N
I
C
U
R
S
O
S
-
2
0
1
5**

Orientações básicas para validação de metodologias analíticas

João Cristiano Ulrich
Mestrado e Doutorado
pelo Ipen/USP

São Paulo
16/09/2015



Documentos de referência:

- ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração.
- DOQ-CGCRE-008: Orientação sobre validação de métodos analíticos. Documento de caráter orientativo. Revisão 04, Julho/2011.
- Resolução RE n. 899 – ANVISA: Determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, 29/05/2003. (indicado para determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos).
- VIM – Vocabulário Internacional de Metrologia, 2012.
- PO-LCQ-1004: Validação de métodos desenvolvidos no laboratório.



Objetivos do treinamento

Auxiliar os responsáveis na tarefa de demonstrar que um método analítico, nas condições em que é praticado, tem as características necessárias para a obtenção de resultados com a qualidade exigida.

Mostrar ao responsável como buscar a forma de validar que mais se aplica ao estudo em questão.



DOQ-CGCRE-008

SUMÁRIO

1. Objetivo
2. Campo de Aplicação
3. Responsabilidade
4. Documentos Complementares
5. Siglas
6. Definições
7. Introdução
8. Validação
 - 8.1. Planejamento da validação
 - 8.2. Parâmetros de validação
 - 8.2.1. Seletividade
 - 8.2.2. Linearidade
 - 8.2.3. Faixa de trabalho e faixa linear
 - 8.2.4. Limite de detecção
 - 8.2.5. Limite de quantificação
 - 8.2.6. Tendência/recuperação



DOQ-CGCRE-008

- 8.2.6.1. Materiais de referência certificados
 - 8.2.6.1.1. Erro relativo
 - 8.2.6.1.2. Índice z
 - 8.2.6.1.3. Erro normalizado
- 8.2.6.2. Ensaio de recuperação
- 8.2.6.3. Precisão
 - 8.2.6.3.1. Repetitividade
 - 8.2.6.3.1.1. Limite de repetitividade
 - 8.2.6.3.1.2. Precisão intermediária
 - 8.2.6.3.1.3. Reprodutibilidade
 - 8.2.6.3.1.3.1. Limite de reprodutibilidade
 - 8.2.6.3.1.4. Comparação da precisão entre métodos
 - 8.2.6.3.1.5. Avaliação da aceitabilidade das características de precisão de um método de análise
 - 8.2.6.3.1.5.1 Interpretação
 - 8.2.6.3.1.5.2 Cálculo do valor de Horwitz
- 8.2.6.4. Robustez
- 8.2.6.5. Comparações interlaboratoriais
- 9. Documentação de métodos validado



VIM 2012

VOCABULÁRIO
INTERNACIONAL
DE METROLOGIA

VIM 2012

CONCEITOS FUNDAMENTAIS E GERAIS
E TERMOS ASSOCIADOS

1ª edição Luso - Brasileira | 2012





VIM 2012

Índice alfabético (em português)

A	erro de justeza instrumental, tendência instrumental 4.20 erro de medição 2.16 erro máximo admissível 4.26 erro máximo permissível 4.26 erro máximo tolerado 4.26 erro no ponto de controle 4.27 erro no zero 4.28 erro sistemático 2.17 escala de referência convencional 1.29 escala de valores 1.27 escala dum instrumento de medição afixador, escala dum instrumento de medição mostrador 3.5 escala ordinal 1.28 estabilidade 4.19 estabilidade dum instrumento de medição 4.19 exatidão 2.13 exatidão de medição 2.13
B	
balanço de incerteza 2.33	
C	
cadeia de medição 3.10 cadeia de rastreabilidade 2.42 cadeia de rastreabilidade metrológica 2.42 calibração 2.39 calibrador 5.12 classe de exatidão 4.25 comparabilidade metrológica 2.46 comparabilidade metrológica de resultados de medição 2.46 compatibilidade metrologica 2.47 compatibilidade metrológica de resultados de medição 2.47 comutatividade dum material de referência, comutabilidade dum material de referência 5.15 condição de fidelidade intermediária, condição de precisão intermediária 2.22 condição de funcionamento de referência 4.11 condição de referência 4.11 condição de regime estável 4.8 condição de regime permanente 4.8 condição de repetibilidade 2.20 condição de repetibilidade de medição 2.20 condição de reprodutibilidade 2.24 condição de reprodutibilidade de medição 2.24 condição estipulada de funcionamento 4.9 condição limite de funcionamento 4.10 conservação dum padrão 5.11 correção 2.53 curva de calibração 4.31	fator de conversão entre unidades 1.24 fator de expansão, fator de abrangência 2.38 fidelidade, precisão 2.15 fidelidade de medição, precisão de medição 2.15 fidelidade intermediária, precisão intermediária 2.23 fidelidade intermediária de medição, precisão intermediária de medição 2.23 função de medição 2.49
D	
dado de referência 5.16 dado de referência normalizado 5.17 deriva 4.21 deriva instrumental 4.21 detector 3.9 diagrama de calibração 4.30 dimensão 1.7 dimensão duma grandeza 1.7 dimensional duma grandeza 1.7 dispositivo de transferência 5.9	grandeza 1.1 grandeza adimensional 1.8 grandeza de base 1.4 grandeza de dimensão um 1.8 grandeza de entrada 2.50 grandeza de entrada num modelo de medição 2.50 grandeza de influência 2.52 grandeza de saída 2.51 grandeza de saída num modelo de medição 2.51 grandeza derivada 1.5 grandeza ordinal 1.26 grandeza sem dimensão 1.8
E	
equação das grandezas 1.22 equação das unidades 1.23 equação de valores numéricos 1.25 erro 2.16 erro aleatório 2.19 erro de justeza, tendência de medição 2.18	hierarquia de calibração 2.40
	I
	incerteza 2.26 incerteza alvo 2.34 incerteza de medição 2.26 incerteza de medição expandida 2.35 incerteza de medição instrumental 4.24 incerteza de medição no zero 4.29 incerteza de medição pretendida 2.34 incerteza definicional 2.27 incerteza expandida 2.35 incerteza instrumental 4.24 incerteza padrão 2.30 incerteza padrão combinada 2.31 incerteza padrão relativa 2.32 indicação 4.1 indicação do branco 4.2 instrumento de medição 3.1 instrumento de medição afixador, instrumento de medição mostrador 3.4 instrumento de medição indicador 3.3 instrumento indicador 3.3



VIM 2012

intervalo de abrangência, intervalo expandido 2.36
intervalo de indicações 4.3
intervalo de medição 4.7
intervalo nominal 4.4
intervalo nominal de indicações 4.4
ISQ 1.6

L

limiar de mobilidade 4.16
limite de detecção 4.18
limite de erro 4.26

M

manutenção dum padrão 5.11
material de referência 5.13
material de referência certificado 5.14
medição 2.1
medida materializada 3.6
mensurando, mensuranda 2.3
método de medição 2.5
metrologia 2.2
mobilidade 4.16
modelo de medição 2.48
modelo matemático da medição 2.48
MR 5.13
MRC 5.14
múltiplo duma unidade 1.17

N

natureza 1.2
natureza duma grandeza 1.2

P

padrão 5.1
padrão de medição 5.1
padrão de medição de referência 5.6
padrão de medição de trabalho 5.7
padrão de medição internacional 5.2
padrão de medição intrínseco 5.10
padrão de medição itinerante 5.8
padrão de medição nacional 5.3
padrão de medição primário 5.4
padrão de medição secundário 5.5
padrão de referência 5.6
padrão de trabalho 5.7
padrão internacional 5.2
padrão intrínseco 5.10
padrão itinerante 5.8
padrão nacional 5.3
padrão primário 5.4
padrão secundário 5.5
planilha de incerteza 2.33
princípio de medição 2.4
probabilidade de abrangência, probabilidade de expansão 2.37
procedimento de medição 2.6
procedimento de medição de referência 2.7
procedimento de medição de referência primário 2.8
procedimento de medição primário 2.8
propriedade qualitativa 1.30

R

rastreabilidade 2.41
rastreabilidade a uma unidade de medida 2.43
rastreabilidade metrológica 2.41

rastreabilidade metrológica a uma unidade 2.43
rastreabilidade metrológica a uma unidade de medida 2.43
repetibilidade 2.21
repetibilidade de medição 2.21
reprodutibilidade 2.25
reprodutibilidade de medição 2.25
resolução 4.14
resolução dum dispositivo mostrador, resolução dum dispositivo afixador 4.15
resultado de medição 2.9

S

seletividade 4.13
seletividade dum sistema de medição 4.13
sensibilidade 4.12
sensibilidade dum sistema de medição 4.12
sensor 3.8
SI 1.16
sistema coerente de unidades 1.14
sistema de grandezas 1.3
sistema de medição 3.2
sistema de unidades 1.13
Sistema Internacional de Grandezas 1.6
Sistema Internacional de Unidades 1.16
submúltiplo duma unidade 1.18

T

tempo de resposta a um degrau, tempo de resposta a um escalão 4.23
transdutor de medição 3.7

U

unidade 1.9
unidade de base 1.10
unidade de medida 1.9
unidade de medida fora do sistema 1.15
unidade derivada 1.11
unidade derivada coerente 1.12
unidade fora do sistema 1.15

V

validação 2.45
valor 1.19
valor convencional 2.12
valor convencional duma grandeza 2.12
valor de referência 5.18
valor de referência duma grandeza 5.18
valor duma grandeza 1.19
valor medido 2.10
valor medido duma grandeza 2.10
valor nominal 4.6
valor numérico 1.20
valor numérico duma grandeza 1.20
valor verdadeiro 2.11
valor verdadeiro duma grandeza 2.11
variação devida a uma grandeza de influência 4.22
veracidade de medição, justeza de medição 2.14
veracidade, justeza 2.14
verificação 2.44

Z

zona morta 4.17



MAS, O QUE É VALIDAÇÃO?

Segundo o VIM – Vocabulário Internacional de Metrologia, 2012

2.45

Validação

validation

validation

validación

**Verificação na qual os requisitos especificados
são adequados para um uso pretendido.**



Itens importantes descritos nos documentos de referência:

O processo de validação de um método deve estar descrito em um procedimento, e os estudos para determinar os parâmetros de validação devem ser realizados com equipamentos e instrumentos dentro das especificações, funcionando corretamente e adequadamente calibrados. Os analistas devem ser qualificados e adequadamente treinados.

-EXEMPLO PRÁTICO:

-PO-LCQ-1004: Validação de métodos desenvolvidos no laboratório.



1 Objetivo

Fornecer orientações sobre o planejamento e as etapas dos experimentos a serem realizados para validação de métodos de ensaio desenvolvidos no laboratório.

2 Campo de Aplicação

Aplica-se a todos os métodos de ensaio, independente da técnica analítica empregada, desenvolvidos no Laboratório de Caracterização Química – LCQ, até os métodos normalizados publicados em normas internacionais, nacionais ou regionais, quando usados fora dos escopos para os quais foram concebidos ou quando foram ampliados e modificados. Métodos normalizados não necessitam seguir as orientações deste procedimento.

3 Definições e Abreviaturas

Validação	Verificação na qual os requisitos especificados são adequados para um uso pretendido (VIM 2012).
Erro Sistemático	Componente do erro de medição que, em medições repetidas, permanece constante ou varia de maneira previsível (VIM 2012). O valor de referência para um erro sistemático é um valor verdadeiro, ou um valor medido de um padrão com incerteza de medição desprezável, ou um valor convencional. O erro sistemático é igual à diferença entre o erro de medição e o erro aleatório.
Erro Aleatório	Componente do erro de medição que, em medições repetidas, varia de maneira imprevisível (VIM 2012). O valor de referência para um erro aleatório é a média que resultaria de um número infinito de medições repetidas do mesmo mensurando.

4 Documentos de Referência

DOQ-CGCRE-008	Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos
VIM - 2012	Vocabulário Internacional de Metrologia: conceitos fundamentais e gerais de termos associados, 1ª edição luso-brasileira.
Chui, QSH.	Qualidade em curvas de calibração. 17º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais – CBECIMat, 15-19/11/2006, Foz do Iguaçu, PR-Brasil.
Pimentel, MF; Barros Neto, B.	Calibração: uma revisão para químicos analíticos. (1996) Química Nova, 19, 3:268-277.
Vieira, V.	Introdução à bioestatística, 3ª edição, Elsevier – Editora Campus, 1980.



Título	Código	Rev.
VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE ENSAIO DESENVOLVIDOS NO LABORATÓRIO	PO-LCQ-1004	05

5. Procedimento

5.1 Condições e Recursos necessários

EPI apropriados: Não aplicável.

Materiais: Não aplicável.

Equipamentos necessários: Não aplicável.

5.2 Cuidados especiais

- Documentar todas as etapas, desde o planejamento até o término dos ensaios de validação, colocando nome do responsável, técnica utilizada, data e local de realização.

5.3 Descrição das atividades

5.3.1 Planejamento da validação

- Definir a aplicação, objetivo e escopo do método desenvolvido;
- Definir os parâmetros de validação e critérios de aceitação;
- Verificar se as características de desempenho do equipamento estão compatíveis com o exigido pelo método em estudo;
- Qualificar os materiais, por exemplo, padrões e reagentes;
- Planejar os experimentos de validação, incluindo o tratamento estatístico;
- Executar os experimentos de validação;
- Definir critérios de revalidação (por exemplo, mudanças de pessoal, condições ambientais, equipamentos, etc.);
- Registrar, de forma adequada, todos os experimentos utilizados para validação e revalidação.

5.3.2 Execução da validação

A seguir estão descritas algumas características normalmente utilizadas para a validação de um método analítico e que, se realizadas, devem constar no relatório de validação.

5.3.2.1 Seletividade

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição pelo detector selecionado. Os interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal e a magnitude do efeito também pode depender da concentração.

Experimentos para avaliação da seletividade, normalmente, envolvem ensaios com padrões ou materiais de referência, amostras com e sem o analito, além da avaliação da capacidade de identificação do analito de interesse na presença de interferentes (vide quadro 2 no documento DOQ-CGCRE-008). Quando não há disponibilidade de interferentes, sugere-se a avaliação da habilidade de medição do analito por diferentes métodos, técnicas ou por meio de variações nas condições instrumentais.

Preparam-se dois grupos de amostras de teste, um com a matriz e o outro sem, ambos os grupos com a concentração do analito idêntica em cada nível de concentração de interesse.



Itens importantes descritos nos documentos de referência:

No planejamento e execução da validação, sugere-se a seguinte sequência de trabalho:

- Definir a aplicação, objetivo e escopo do método;
- Definir os parâmetros de validação e critérios de aceitação;
- Verificar se as características de desempenho do equipamento estão compatíveis com o exigido pelo método em estudo;
- Qualificar os materiais, por exemplo, padrões e reagentes;
- Planejar os experimentos de validação, incluindo o tratamento estatístico, e
- Fazer os experimentos de validação.

Os experimentos e os resultados devem ser documentados e registrados.



Itens importantes descritos nos documentos de referência:

EXEMPLO PRÁTICO:
- Planejamento de validação de ensaio

Laboratório de Caracterização Química - LCQ

**PLANEJAMENTO PARA VALIDAÇÃO DE
DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO (Cd) E
CHUMBO (Pb) EM SANGUE POR MEIO
DA TÉCNICA ICP-MS
(Nexlon 300D – Perkin Elmer)**

SETEMBRO 2014



Itens importantes descritos nos documentos de referência:

EXEMPLO PRÁTICO: - Planejamento de validação de ensaio

Planejamento para validação de determinação de cádmio (Cd) e chumbo (Pb) em sangue por meio da técnica ICP-MS.

Laboratório de Caracterização Química - LCQ

1. Objetivo

Este documento tem como objetivo auxiliar o LCQ na tarefa de demonstrar que o método de determinação de cádmio (Cd) e chumbo (Pb) em sangue por meio da técnica de espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) tem as características necessárias para a obtenção de resultados com a qualidade exigida.

Este planejamento, com base no documento do INMETRO "DOC-CGCRE-008", não pretende abordar todas as técnicas aplicáveis à validação de métodos analíticos, porém buscou aquelas que mais se aplicam ao estudo em questão.

2. Aplicação

Aplica-se a amostras de sangue humano ou de animal, devidamente acondicionadas e entregues no laboratório.

As determinações serão realizadas no equipamento espectrômetro de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), modelo NexION 300D, Perkin Elmer.

3. Escopo do Método

O método baseia-se na diluição de quantidade predeterminada de sangue com formação de solução em meio EDTA + Triton X-100 e posterior determinação de cádmio (Cd) e chumbo (Pb) por meio da técnica ICP-MS.

4. Planejamento da validação

4.1. Definição dos parâmetros de validação

A princípio serão definidos os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, faixa de trabalho, limite de detecção, limite de quantificação, tendência/recuperação, precisão e Robustez.

4.2. Planejamento dos experimentos

4.2.1. Seletividade

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição pelo detector selecionado. Os interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal e a magnitude do efeito também pode depender da concentração.

Preparar dois grupos de teste, um com a matriz e o outro sem, ambos os grupos devem conter a concentração do analito (s) idêntica em cada nível de concentração de interesse. O número de amostras paralelas em cada nível de concentração deve ser maior ou igual a 7 (sete).

4.2.2. Linearidade

A linearidade consiste em construir uma curva de calibração, com no mínimo 5 pontos, para provar a faixa dinâmica linear. A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A equação da reta é utilizada para relacionar as variáveis: $y = a + bx$.



Itens importantes descritos nos documentos de referência:

Como registrar os experimentos e os resultados:

Relatório de validação:

É um resumo ou sumário do processo de validação, contendo a descrição e todos os dados e resultados obtidos. Deve concluir se os critérios de aceitação foram atingidos e relatar as não conformidades ou problemas encontrados.



Itens importantes descritos nos documentos de referência:

EXEMPLO PRÁTICO - RELATÓRIO DE VALIDAÇÃO

Laboratório de Caracterização Química - LCQ

RELATÓRIO DE VALIDAÇÃO DO ENSAIO:

DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO TOTAL EM PEIXES POR MEIO DA TÉCNICA FIA-CV-AAS

Maio/2006

Relatório de Validação do ensaio: Determinação de mercúrio total em peixes por meio da técnica FIA-CV-AAS

ÍNDICE

Item		Página
1	Objetivo	2
2	Campo de aplicação	2
3	Documentos de referência	2
4	Descrição das atividades	2
4.1	Planejamento da validação	2
4.2	Características de desempenho do método - Teoria	2
4.2.1	Limite de Detecção	3
4.2.2	Exatidão	3
4.2.3	Precisão	3
4.2.4	Linearidade	4
4.2.5	Incerteza de medição	4
4.2.6	Testes adicionais	4
4.3	Características de desempenho do método - Resultados obtidos e Discussão	5
4.3.1	Limite de Detecção	5
4.3.2	Exatidão	5
4.3.3	Precisão	8
4.3.4	Linearidade	8
4.3.5	Incerteza de medição	10
4.3.6	Testes adicionais	11
5	Conclusões	12
6	Anexos	14



Quando realizar a validação de um método:

Conforme DOQ-CGCRE-008, do Inmetro:

- Métodos não normalizados;
- Métodos criados/desenvolvidos pelo próprio laboratório;
- Métodos normalizados usados fora dos escopos para os quais foram concebidos;
- Ampliações e modificações de métodos normalizados.



Quando realizar a revalidação de um método:

Conforme RE 899/2003, da ANVISA:

- Mudanças na síntese da substância ativa;
- Mudanças na composição do produto acabado;
- Mudanças no procedimento analítico.



Parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Parâmetros	Tipo de ensaio			
	Qualitativo	Determinação do componente (ou analito) em maior teor (1)	Análise de elementos menores e traços (2)	Propriedades físicas
Precisão		✓	✓	✓
Seletividade	✓	✓	✓	✓
Tendência/recuperação		✓	✓	✓
Robustez	✓	✓	✓	✓
Sensibilidade/ linearidade/ faixa de trabalho		✓	✓	✓
Limite de detecção	✓		✓	
Limite de quantificação			✓	

Continua...



Parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

... continuação

(1) Dependendo da faixa de concentração do analito, pode não ser necessária a determinação dos limites de detecção e de quantificação, como por exemplo: a determinação de sacarose em balas e determinação do teor de gordura em carnes, pois são componentes maiores com concentração entre 1 a 100%.

(2) São considerados como de menor teor as concentrações dos analitos entre 0,01 a 1% e traços, os analitos em concentração abaixo de 0,01%.



Discussão dos parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Seletividade e Especificidade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.

Para análise qualitativa (teste de identificação) é necessário demonstrar a capacidade de seleção do método entre compostos com estruturas relacionadas que podem estar presentes. Isto deve ser confirmado pela obtenção de resultados positivos (preferivelmente em relação ao material de referência conhecido).



Discussão dos parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Seletividade e Especificidade

Para análise quantitativa (teor) e análise de impurezas, a especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras (analito, fármaco ou medicamento) contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais. Quando a impureza ou o padrão do produto de degradação não estiverem disponíveis, pode-se comparar os resultados do teste das amostras contendo impurezas ou produtos de degradação com os resultados de um segundo procedimento bem caracterizado (por exemplo metodologia farmacopéica ou outro procedimento validado).



Discussão dos parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Seletividade e Especificidade

EXEMPLO PRÁTICO: teste de seletividade para determinação de metais em análise de água para consumo humano - construção de curva de calibração, contendo os metais a serem determinados, com água purificada (Milli-Q, por exemplo) e água de torneira.



Discussão dos parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Linearidade

A maioria dos equipamentos de medição existentes estabelece a sua faixa dinâmica linear. É necessário, entretanto, verificar até que ponto a faixa de concentração do analito coincide com a faixa dinâmica linear e assegurar que nenhum outro fenômeno tenha impacto indesejável na resposta.

A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. A equação da reta que relaciona as duas variáveis é:



Discussão dos parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Linearidade

$$y = a + bx$$

sendo:

y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.);

x = concentração;

a = interseção com o eixo y, quando x = 0;

b = inclinação da curva analítica = sensibilidade.

Em geral, serão necessários vários níveis de concentração, no mínimo cinco, para construir a curva de calibração. O número de replicatas em cada nível de concentração deve ser o mais próximo possível daquele empregado na rotina do laboratório.



Discussão dos parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Linearidade

Calcular o modelo através da regressão linear, os resíduos e o coeficiente de correlação linear (r). Este é frequentemente utilizado para indicar o quanto a reta pode ser considerada adequada como modelo matemático para o estudo de caso. Uma alternativa para avaliar a linearidade seria a realização da análise de variância (ANOVA) na regressão.

Alguns procedimentos analíticos não demonstram linearidade mesmo após qualquer transformação. Nesses casos, a resposta analítica pode ser descrita por uma função que modela a concentração do analito na amostra.



Discussão dos parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Faixa de Trabalho e Faixa Linear

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentrações do analito ou valores da propriedade no qual o método pode ser aplicado.

Todo experimento de determinação da faixa de trabalho é iniciado pela escolha de uma faixa preliminar. A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado e a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho.

No limite inferior da faixa de concentração, o fator limitante é o valor do limite de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição.



Discussão dos parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Limite de Detecção (LD)

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito ou de uma propriedade, como por exemplo, análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método.

O limite de detecção para um procedimento analítico pode variar em função do tipo da amostra. É fundamental assegurar-se de que todas as etapas de processamento do método analítico sejam incluídas na determinação desse limite de detecção.



Discussão dos parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Existem diversas formas de se calcular o limite de detecção.

O LD pode ser estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável.

No caso de métodos não instrumentais (titulação ou comparação de cor), esta determinação pode ser feita visualmente, onde o LD é o menor valor de concentração capaz de produzir o efeito esperado)

Pode ainda ser determinado por análises de soluções branco da amostra (branco do método), obtendo-se o desvio padrão das determinações e em seguida, calculado como mostrado no quadro a seguir.

Discussão dos parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Matriz	Cálculos	Observações
Branco da amostra	$LD = \bar{X} + t_{(n-1, 1-\alpha)} \cdot s$ sendo: $\bar{X}$ = média dos valores dos brancos da amostra; t é a distribuição de Student, dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança e, s = desvio-padrão amostral dos brancos da amostra.	A média e o desvio-padrão amostral dos brancos da amostra são dependentes da matriz. Válido somente quando os valores dos brancos apresentarem um desvio-padrão amostral diferente de zero.
Ou		
Branco da amostra com adição da menor concentração aceitável do analito	$LD = 0 + t_{(n-1, 1-\alpha)} \cdot s$ sendo: t = distribuição de Student, dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança e, s = desvio-padrão amostral dos brancos da amostra, com adição.	A "menor concentração aceitável" é aquela tida como a concentração mais baixa para a qual um grau aceitável de incerteza pode ser alcançado.



Discussão dos parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Limite de Detecção (LD)

Quando utilizada a solução branco, é recomendado um mínimo de 7 replicatas para a determinação do LD. Por exemplo, no caso de se analisar 7 alíquotas, temos $7-1 = 6$ graus de liberdade de uma matriz de branco da amostra com adição da menor concentração aceitável do analito. Para esses graus de liberdade, o valor de t unilateral, para 99 % de confiança é 3,143. Assim, O LD será igual a 3,143 vezes o desvio padrão amostral.

O método analítico deve ser especificado e o LD para cada analito deve ser expresso nas unidades apropriadas, de acordo com o preconizado no método analítico. A matriz da amostra usada para determinar o LD deve ser identificada.



Discussão dos parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Limite de Quantificação (LQ)

Algumas vezes é também denominado “Limite de Determinação”. Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). É definido também como a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas.

O LQ pode ser estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do analito (ou fármaco) até o menor nível determinável ou soluções do branco da amostra.



Discussão dos parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Determinação do Limite de Quantificação (LQ)

Matriz	Determinação
Branco da amostra	$LQ = \bar{X} + 5s$ ou $LQ = \bar{X} + 6s$ ou $LQ = \bar{X} + 10s$ onde: $\bar{X}$ = média dos valores dos brancos s = desvio-padrão amostral dos brancos
Branco com adição de concentrações variadas do analito, próximas ao LD	- Medir, uma vez cada replicata independente, a cada nível de concentração. - Calcular o desvio-padrão amostral "s" do valor do analito, para cada concentração. - Fazer o gráfico "concentração" versus "s", e atribuir um valor para o LQ, por inspeção.



Discussão dos parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Limite de Quantificação

O método analítico deve ser especificado e o LQ para cada analito deve ser expresso nas unidades apropriadas, de acordo com o preconizado no método analítico. A matriz da amostra usada para determinar o LQ deve ser identificada.

Nota: Para a análise em nível de traços, é recomendado adotar o LQ como a concentração mais baixa da curva de calibração.



Discussão dos parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Tendência/Recuperação

Os processos normalmente utilizados para avaliar a tendência de um método são, entre outros: uso de materiais de referência certificados (MRC), participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação.

A determinação da tendência com relação aos valores de referência apropriados é importante no estabelecimento da rastreabilidade aos padrões reconhecidos.

A tendência pode ser expressa como recuperação analítica, definida como:

$$\frac{\text{Valor observado}}{\text{Valor esperado}} \times 100\%$$



Discussão dos parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Materiais de referência certificados

Sempre que possível, os materiais de referência certificados (MRC) devem ser utilizados no processo de validação de um método de ensaio.

Um MRC possui um valor de concentração, ou outra grandeza, para cada parâmetro, e uma incerteza associada. É muito importante, portanto, que o fornecimento desses MRC seja realizado por organismos reconhecidos e confiáveis, como por exemplo: INMETRO, NIST, LGC, etc.

O uso correto dos MRC consiste na sua análise para avaliar o desempenho do laboratório. Na avaliação da tendência utilizando um material de referência certificado, os valores obtidos pelo laboratório – média e o desvio padrão amostral de uma série de ensaios em replicata – devem ser comparados com os valores certificados do material de referência.



Discussão dos parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Para esta comparação podem ser utilizados diversos critérios de decisão, entre os quais:

- erro relativo;
- índice z (z-score), e
- erro normalizado.

Quando o valor obtido não estiver dentro do intervalo da região de aceitação para o valor certificado, o laboratório deve procurar as causas desse desvio e procurar eliminá-las.



Discussão dos parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Erro relativo (ER)

Uma forma de avaliar a exatidão do método é por meio do cálculo do erro relativo (ER), expresso em porcentagem por meio da expressão:

$$ER = \frac{X_{lab} - X_v}{X_v} \cdot 100$$

Sendo:

X_{lab} = valor obtido experimentalmente ou média aritmética de valores obtidos

X_v = valor aceito como verdadeiro (valor certificado do MRC)



Discussão dos parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Índice z (z score)

O índice z é também um modo de avaliar o desempenho do laboratório em comparações interlaboratoriais.

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

Sendo:

X_{lab} = valor obtido pelo laboratório;

X_v = valor aceito como verdadeiro;

s = desvio-padrão do ensaio de proficiência.



Discussão dos parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Índice z (z score)

A avaliação é feita com o seguinte critério de decisão, de acordo com a ISO/IEC 17043:2010:

$|z| \leq 2 \Rightarrow$ resultado satisfatório;

$2 < |z| < 3 \Rightarrow$ resultado questionável;

$|z| \geq 3 \Rightarrow$ resultado insatisfatório

Discussão dos parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Erro normalizado

Quando o laboratório calcular a incerteza expandida do seu resultado (U_{lab}), o valor verdadeiro (X_v) deve estar dentro do intervalo ($X_{lab} \pm U_{lab}$). Quando isso não acontece, esse intervalo pode estar subestimado. Nesses casos é empregado o conceito de erro normalizado (E_n):

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

Sendo:

U_{ref} = incerteza associada ao MRC

Se $|E_n| \leq 1$, então pode ser considerado que o resultado do laboratório é adequado.



Discussão dos parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Ensaio de recuperação

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do mesmo analito (spike).

As amostras podem ser fortificadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações: baixa, média e alta, da faixa de uso do método.

A limitação deste procedimento é a de que o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que a presente na amostra.

A presença de analitos adicionados em uma forma mais facilmente detectável pode ocasionar avaliações excessivamente otimistas da recuperação.



Discussão dos parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

A recuperação é calculada segundo:

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100$$

Sendo:

C_1 = concentração do analito na amostra fortificada,

C_2 = concentração do analito na amostra não fortificada,

C_3 = concentração do analito adicionada à amostra fortificada



Discussão dos parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra e as três formas mais comuns de expressá-la são: por meio da repetibilidade, precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão e coeficiente de variação.

O coeficiente de variação (CV, usualmente expresso em %), também conhecido como desvio padrão relativo (DPR), é calculado da seguinte forma:

$$\text{C.V.} = \text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100$$

Sendo:

DP = desvio-padrão; CMD = concentração média determinada



Discussão dos parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Repetibilidade

As condições de repetibilidade podem ser caracterizadas utilizando:

- Mesmo procedimento de medição;
- Mesmo observador;
- Mesmo instrumento usado sob mesmas condições;
- Mesmo local, e
- Repetições no menor espaço de tempo possível.

A repetibilidade pode ser expressa quantitativamente em termos da característica da dispersão dos resultados e pode ser determinada por meio da análise de padrões, material de referência ou adição do analito a branco da amostra, em várias concentrações na faixa de trabalho.



Discussão dos parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Limite de repetibilidade (r)

A partir do desvio-padrão dos resultados dos ensaios sob condição de repetibilidade é aconselhável calcular o limite de repetibilidade (r) que capacita o analista a decidir se a diferença entre análises realizadas nas condições de repetibilidade é significativa.

O limite de repetibilidade (r) é dado por:

$$r = t_{(n-1, 1-\alpha)} \sqrt{2} \cdot S$$

Sendo:

S = desvio-padrão amostral associado aos resultados considerados para cada nível de concentração



Discussão dos parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Precisão intermediária

A precisão intermediária, de acordo com a ISO 5725-3, refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como:

- diferentes analistas;
- diferentes equipamentos;
- diferentes tempos.

Esta medida de precisão representa a variabilidade dos resultados em um laboratório.



Discussão dos parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Reprodutibilidade

Embora a reprodutibilidade não seja um componente de validação de método executado por um único laboratório, é considerada importante quando um laboratório busca a verificação do desempenho dos seus métodos em relação aos dados de validação obtidos por meio de comparação interlaboratorial.

A partir do desvio padrão obtido sob condições de reprodutibilidade é possível calcular o limite de reprodutibilidade (R), o qual permite ao analista decidir se a diferença entre os valores da duplicata das amostras analisadas sob condições de reprodutibilidade é significativa.



Discussão dos parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Limite de reprodutibilidade (R)

Do mesmo modo que para repetibilidade, o limite de reprodutibilidade (R), é dado por

$$R = t_{(n-1, 1-\alpha)} \sqrt{2} \cdot S_R$$

Sendo:

S_R = desvio-padrão associado aos resultados de todos os laboratórios

$$S_R = \sqrt{S_{lab}^2 + S_r^2}$$

Onde:

S_{lab} = média das variâncias dos resultados de cada laboratório

S_r = variância das médias dos laboratórios



Discussão dos parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Comparação da precisão entre métodos

Consiste na comparação dos resultados obtidos utilizando um método a ser validado com os resultados conseguidos por meio de um método de referência validado. O objetivo é estudar o grau de proximidade dos resultados obtidos pelos dois métodos, ou seja, avaliar a exatidão do método em processo de validação com o de referência.

As análises são efetuadas em replicata, utilizando os dois métodos, em separado, sobre as mesmas amostras, em toda faixa de concentrações em que se pretende validar o método.

Existem várias técnicas para comparar os resultados obtidos por dois métodos de ensaio, entre as quais: testes de hipótese e planejamento de experimentos.



Discussão dos parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos.

Para determinar a robustez de um método de ensaio, pode-se recorrer ao teste de Youden.

Trata-se de um teste que permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações.

Convém salientar que quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança desse relacionamento à sua precisão.



Discussão dos parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Fatores que podem ser considerados na determinação da robustez:

Preparo das amostras	- Estabilidade das soluções analíticas
	- Tempo de extração
Espectrofotometria	- Variação do pH da solução
	- Temperatura
	- Diferentes fabricantes de solventes
Cromatografia líquida	- Variação do pH da fase móvel
	- Variação na composição da fase móvel
	- Diferentes lotes ou fabricantes de colunas
	- Temperatura
	- Fluxo da fase móvel
Cromatografia gasosa	- Diferentes lotes ou fabricantes de colunas
	- Temperatura
	- Velocidade do gás de arraste



Discussão dos parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Comparações Interlaboratoriais

A norma ISO/IEC 17043:2010 faz distinção entre o uso de comparações interlaboratoriais para ensaios de proficiência para a determinação do desempenho do laboratório e para outros propósitos tais como: estabelecer a eficácia e a comparabilidade de novos métodos de ensaio ou de medição, acompanhar métodos estabelecidos e determinar as características de desempenho de um método, geralmente conhecidos como estudos colaborativos.

Para a avaliação dos resultados das comparações interlaboratoriais também são aplicáveis os critérios de decisão descritos quando da análise de materiais de referência certificados.

Nos processos de comparação interlaboratorial, caso não se alcancem as condições satisfatórias, deve ser efetuado um plano de ações corretivas para verificar as causas e reavaliar o ensaio.



**M
I
N
I
C
U
R
S
O
S
-
2
0
1
5**

Muito obrigado pela atenção

jculrich@ig.com.br

Fones: (com) 11-3133-9365 / (cel) 11-99159-7059