



Coordenação Geral de Acreditação

**ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE
MÉTODOS ANALÍTICOS**

Documento de caráter orientativo

DOQ-CGCRE-008

Revisão 04 – JUL/2011

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
 - 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
 - 8.2.6.3.2. Precisão intermediária
 - 8.2.6.3.3. Reprodutibilidade
 - 8.2.6.3.3.1. Limite de reprodutibilidade
 - 8.2.6.3.4. Comparação da precisão entre métodos
 - 8.2.6.3.5. Avaliação da aceitabilidade das características de precisão de um método de análise
 - 8.2.6.3.5.1. Interpretação
 - 8.2.6.3.5.2. Cálculo do valor de *Horwitz*
 - 8.2.6.4. Robustez
 - 8.2.6.5. Comparações interlaboratoriais
9. Documentação de métodos validados
10. Documentos de Referência
11. Histórico da Revisão

ANEXO – Relação dos participantes da elaboração deste documento.

1 OBJETIVO

Este documento tem como objetivo auxiliar os laboratórios 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.

Este documento não pretende abordar todas as técnicas aplicáveis à validação de métodos analíticos, cabendo ao laboratório buscar aquela que mais se aplica ao estudo em questão.

2 CAMPO DE APLICAÇÃO

Este documento aplica-se à Dicla, aos laboratórios acreditados ou postulantes à acreditação, e aos avaliadores e especialistas na área de laboratórios de ensaios.

3 RESPONSABILIDADE

A responsabilidade pela revisão deste documento é da Dicla.

4 DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

Aplicam-se as últimas edições dos seguintes documentos:

- ABNT NBR ISO/IEC 17000 - Avaliação de conformidade – Vocabulário e princípios gerais
- ABNT NBR ISO/IEC 17025 - Requisitos Gerais para a Competência dos Laboratórios de Ensaio e de Calibração
- VIM - Vocabulário Internacional de Metrologia: conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM 2008), 1ª Edição Brasileira, Rio de Janeiro, 2009.
- ABNT ISO/IEC Guia 43-1 – Ensaio de proficiência por comparações interlaboratoriais Parte 1: Desenvolvimento e operação de programas de ensaios de proficiência
- DOQ-Cgcre-020 - Definições de termos utilizados nos documentos relacionados à acreditação de laboratórios

5 SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
APHA	<i>American Public Health Association</i>
ANSI	<i>American National Standards Institute</i>
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
AWWA	<i>American Water Works Association</i>
Cgcre	Coordenação Geral de Acreditação
CV	Coeficiente de Variação
Dicla	Divisão de Acreditação de Laboratórios
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
IEC	<i>International Electrotechnical Commission</i>
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LGC	<i>Laboratory of the Government Chemist (UK)</i>
MRC	Material de Referência Certificado
NBR	Norma Brasileira
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology (USA)</i>

VIM - Vocabulário Internacional de Metrologia: conceitos fundamentais e gerais e termos associados

WEF *Water Environment Federation*

6 DEFINIÇÕES

Para o propósito deste documento, são adotadas as definições contidas no documento DOQ-Cgcre-020, ABNT NBR ISO/IEC 17000, ABNT NBR ISO/IEC 17025 e no VIM.

7 INTRODUÇÃO

O laboratório deve atender aos requisitos da ABNT NBR ISO/IEC 17025 para a seleção de métodos de ensaios (item 5.4.2), desenvolvimento de métodos de ensaio pelo laboratório (item 5.4.3), utilização de métodos não normalizados (item 5.4.4) e validação de métodos (item 5.4.5).

É fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar, por meio da validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida.

O laboratório, ao empregar métodos normalizados, necessita demonstrar que tem condições de operá-los de maneira adequada, dentro das condições específicas existentes nas suas instalações antes de implantá-los, não necessitando realizar os parâmetros, descritos nos itens, deste documento, referentes a seletividade (item 8.2.1), linearidade (item 8.2.2), faixa de trabalho e faixa linear (item 8.2.3), comparação de métodos (item 8.2.6.3.4), avaliação da aceitabilidade (item 8.2.6.3.5) e robustez (item 8.2.6.4) e comparação da precisão entre os métodos (item 8.2.6.3.4) desde que os parâmetros de validação estejam declarados nos métodos em questão.

Se um método existente for modificado para atender aos requisitos específicos, ou um método totalmente novo for desenvolvido, o laboratório deve se assegurar de que as características de desempenho do método atendem aos requisitos para as operações analíticas pretendidas.

8 VALIDAÇÃO

Com o objetivo de confirmar que os métodos são apropriados para o uso pretendido, o laboratório deve validar:

- 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.

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.

Do mesmo modo, o responsável pela realização dos estudos deve ser competente na área e precisa ter conhecimento suficiente sobre o trabalho, sendo capaz de tomar as decisões apropriadas durante a realização do mesmo.

8.1 Planejamento da validação

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.

8.2 Parâmetros de validação

Os parâmetros de validação devem estar claramente declarados no procedimento documentado e incluir, quando aplicável:

- Seletividade
- Linearidade
- Faixa de trabalho e Faixa linear
- Limite de detecção
- Limite de quantificação
- Tendência/recuperação
- Precisão (repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade)
- Robustez

Os parâmetros que necessitam ser calculados durante o processo de validação podem variar de acordo com o tipo de ensaio, como mostra o quadro 1.

Quadro 1 – 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			√	

Fonte: In-House Method Validation - A guide for Chemical Laboratories LGC / VAM, 2003

- (1) Dependendo da faixa de concentração do analito pode não ser necessária a determinação dos limites de detecção e de quantificação, como por exemplo: determinação de sacarose em balas e determinação do teor de gordura em carnes. por exemplo .componentes maiores com concentração entre 1 a 100%,
- (2) São considerados como de menor teor concentrações entre 0,01 a 1% e elementos traços, os elementos em concentração abaixo de 0,01%

8.2.1 Seletividade

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

Experimentos para avaliação da seletividade descritos na literatura sobre validação de métodos analíticos 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 (quadro 2). Quando não há disponibilidade de interferentes, alguns autores sugerem a avaliação da habilidade de medição do analito por diferentes métodos, técnicas ou por meio de variações nas condições instrumentais.

Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a tendência e a precisão estarão seriamente comprometidas.

Quadro 2 – Avaliação da seletividade

Procedimento	Demonstrar	Comentários
a) Fazer a análise com a amostra e materiais de referência pelo método em estudo e outros métodos validados.	Habilidade do método em estudo de identificar e dosar o analito na presença de interferentes.	Evidências necessárias para dar suporte e gerar confiabilidade suficiente.
b) Analisar amostras contendo vários interferentes suspeitos na presença do analito de interesse.	Efeito de interferentes - a presença de interferente acentua ou inibe a detecção ou quantificação do analito de interesse.	Se alteram resultados, aperfeiçoar o método ou selecionar outro mais adequado.

8.2.2 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:

$$y = a + bx \quad (1)$$

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.

O método é mais sensível quando pequenas variações de concentração resultam em maior variação na resposta, ou seja, maior inclinação (b).

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

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito e verificada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. Para tal, deve ser verificada a ausência de valores discrepantes para cada nível de concentração e a homocedasticidade dos dados, antes de fazer a regressão linear.

A verificação da ausência de valores discrepantes pode ser feita pelo teste de *Grubbs* (ISO 5725-3:1994 e ISO 5725-2, 1994) ou de resíduo *Jackknife* (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005) e a **homocedasticidade**, isto é, **homogeneidade da variância dos resíduos** pelo teste de *Cochran* (ISO 5725-3:1994) ou teste de *Levene* (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005) ou o teste de *Brown-Forsythe* (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

Calcular o modelo através da regressão linear, os resíduos e o coeficiente de correlação linear (r). Este é freqüentemente 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.

8.2.3 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.

Dentro da faixa de trabalho pode existir uma faixa de resposta linear e dentro desta, a resposta do sinal terá uma relação linear com o analito ou valor da propriedade. A extensão dessa faixa pode ser estabelecida durante a avaliação da faixa de trabalho.

Tabela 1 - Métodos para determinação da Faixa de Trabalho e Faixa Linear.

Nº de Replicatas	Matriz	Procedimento
Etapa (1): ≥7 (sete)	- Branco com adição de concentrações variadas do analito ou, - Branco da amostra com adição de concentrações variadas do analito. <i>Obs.:</i> preparar diferentes concentrações de modo independente e não alíquotas da mesma solução mãe.	Objetivo: identificar inicialmente, por observação visual, a faixa linear aproximada e os limites superior e inferior da faixa de trabalho. - Colocar no eixo x as concentrações do analito e no eixo do y as respostas das medições. - Ir para a etapa (2).
Etapa (2): ≥7 (sete) na faixa linear	- Materiais de referência (diferentes concentrações), na faixa linear ou - Branco da amostra com adição de concentrações variadas do analito, na faixa linear.	Objetivo: determinar a faixa de trabalho e confirmar a linearidade. - Colocar no eixo x as concentrações do analito e no eixo do y as respostas das medições. - Verificar visualmente a existência de dispersos que possam interferir na regressão (antes de remover os dispersos fazer determinações nas proximidades das concentrações). - Calcular os coeficientes da reta de regressão. - Calcular e fazer o gráfico dos valores dos resíduos para cada valor de x (resíduo é a diferença entre o valor observado e o valor calculado pela equação da reta de regressão). A distribuição aleatória em torno da linha reta confirma a linearidade. - Ir para a etapa (3).
Etapa (3): ≥7 (sete)	- Branco da amostra com adição de concentrações variadas do analito, próximas ao LD	Objetivo: determinar o Limite de Quantificação (LQ), que efetivamente forma o limite mais baixo da faixa de trabalho. - Expressar o LQ como a concentração mais baixa do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de incerteza.

Observações: Branco = água reagente

Branco da amostra = matriz da amostra sem o analito de interesse

8.2.4 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.

A importância desta determinação e os problemas associados a ela advêm do fato de que a probabilidade de detecção não muda rapidamente de zero para *um* quando seu limiar é ultrapassado. Os problemas têm sido investigados estatisticamente e diversos critérios de decisão têm sido propostos. Muitas controvérsias são originadas devido ao fato de não haver atualmente uma concordância da terminologia aplicável. O termo "*limite de detecção*" não é aceito por todos, apesar de ser usado em alguns documentos setoriais.

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.

Para a validação de um método analítico, é normalmente suficiente fornecer uma indicação do nível em que a detecção do analito pode ser distinguida do sinal do branco/ruído.

Existem diversas formas de se calcular o limite de detecção. No quadro 3 são apresentadas algumas destas metodologias.

Quadro 3 - Determinação de Limite de Detecção (LD)

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.

A parte estatística é somente uma orientação, e que o LD deva ser obtido experimentalmente, já que, conforme descrito, o limite de detecção para um procedimento analítico pode variar em função do tipo da amostra e, por isso, não há uma fórmula estatística.

É fundamental que avaliações independentes sejam realizadas em amostras com concentração igual ao limite de detecção determinado.

O número de replicatas muito elevado pode superestimar o limite de detecção, por isto, este número (n) deve expressar a rotina do laboratório.

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. 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.

8.2.5 Limite de Quantificação

Algumas vezes é também denominado “Limite de Determinação”. Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). Este limite, após ter sido determinado, deve ser testado com amostras independentes, para averiguar se a tendência e a precisão conseguidas são satisfatórias.

A descrição do quadro 4 pode ser considerada como sendo uma maneira de se calcular o limite de quantificação. A concentração do analito corresponde ao valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 desvios padrão. Todavia, a maneira mais realista é determinar o LQ experimentalmente, com base em critérios de aceitação pré-definidos.

Quadro 4 – 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	<ul style="list-style-type: none"> - 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.

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 analítica.

8.2.6 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 tendência, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos.

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:

$$\frac{\text{valor observado}}{\text{valor esperado}} \times 100\%.$$

Esta tendência deve ser corrigida ou demonstrada ser desprezível, mas em ambos os casos, a incerteza associada com a determinação da tendência permanece como um componente essencial da incerteza global.

Nota: A exatidão é avaliada numericamente através da tendência.

8.2.6.1 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. 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.

8.2.6.1.1 Erro relativo (ER)

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

$$ER = \frac{X_{lab} - X_v}{X_v} \cdot 100 \quad (2)$$

Sendo:

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

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

8.2.6.1.2 Índice z (z score)

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

$$z = \frac{(X_{lab} - X_v)}{s} \quad (3)$$

Sendo:

X_{lab} = valor obtido pelo laboratório;

X_v = valor aceito como verdadeiro;

s = desvio-padrão do ensaio de proficiência.

A avaliação é feita com o seguinte critério de decisão, de acordo com a ISO Guia 43:

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

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

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

8.2.6.1.3 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):

$$E_n = \frac{(X_{lab} - X_v)}{\sqrt{U_{lab}^2 + U_{ref}^2}} \quad (4)$$

Sendo:

U_{ref} = incerteza associada ao MRC

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

8.2.6.2 Ensaios de recuperação

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

A recuperação é calculada segundo:

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (5)$$

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.

8.2.6.3 Precisão

Normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e as três formas mais comuns de expressá-la são: por meio da repetitividade, 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:

$$\text{C.V.} = \text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100 \quad (6)$$

Sendo:

DP = desvio-padrão;

CMD = concentração média determinada

8.2.6.3.1 Repetitividade

As condições de repetitividade 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 repetitividade 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.

O número de replicatas para cada nível de concentração deve expressar a rotina do laboratório.

8.2.6.3.1.1 Limite de repetitividade (r)

A partir do desvio-padrão dos resultados dos ensaios sob condição de repetitividade é aconselhável calcular o limite de repetitividade (r) que capacita o analista a decidir se a diferença entre análises realizadas nas condições de 10.7.1 é significativa.

O limite de repetitividade (r) é dado por:

$$r = t_{(n-1, 1-\alpha)} \sqrt{2} \cdot S \quad (7)$$

Sendo:

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

Caso o laboratório obtenha resultados diferentes para r nos diferentes níveis de concentração, o limite de repetitividade (r) é calculado de acordo com a norma ISO 5725-2.

8.2.6.3.2 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.

Na maioria dos casos, o valor de precisão intermediária é função do nível de concentração do ensaio e o seu cálculo é efetuado, preferencialmente, a partir dos resultados obtidos, após eliminação dos resultados discrepantes. A visualização gráfica dos valores também pode ser útil para identificá-los.

Dependendo do ensaio e do tipo de aplicação do estudo da precisão intermediária, existem vários métodos para determinação e controle desse parâmetro, tais como:

- por meio de gráfico de controle do desvio padrão, que poderá ser aplicados para replicatas de amostras e para padrões estáveis ao longo do tempo;
- por meio da expressão:

$$Spi_{(j,k)} = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2} \quad (8)$$

$Spi_{(j,k)}$ = desvio padrão de precisão intermediária

t = total de amostras ensaiadas (não confundir com o t de Student);

n = total de ensaios efetuados por amostra;

j = nº da amostra, $j = 1, t$

k = nº do ensaio da amostra j , $k = 1, n$

y_{jk} = valor do resultado k para a amostra j

y_j = representa a média aritmética dos resultados da amostra j .

Nesse caso, a determinação da precisão intermediária é feita por meio de t valores de n ensaios de amostras ou padrões. A precisão intermediária baseia-se na dispersão entre ensaios. É recomendado que o valor “ $t (n-1)$ ”, seja, pelo menos, igual a 15. Quando $n = 2$ a equação (8) toma a forma:

$$Si_{(j,k)} = \sqrt{\frac{1}{2 \cdot t} \cdot \sum_{j=1}^t (y_{j1} - y_{j2})^2} \quad (9)$$

Sendo

y_{j1} = primeiro resultado obtido para a amostra j ;

y_{j2} = segundo resultado obtido para a amostra j

Um método simplificado para estimar a precisão intermediária baseia-se na execução de n medições ($n \geq 15$), em condições pré-definidas, sobre:

- uma mesma amostra;
- amostras supostamente idênticas;
- padrões

A estimativa da precisão intermediária $Si ()$, neste caso, é dada por:

$$Si_{(j,k)} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (y_k - \bar{y})^2} \quad (10)$$

em que $Si (j,k)$ é o desvio padrão de precisão intermediária relativo a esse grupo, onde os símbolos relativos às condições intermediárias de precisão podem aparecer entre parêntesis (Ex: $Si (T.O)$ significa tempo e operadores diferentes). Este método revela-se menos eficiente quando comparado com os anteriores.

Sendo:

n = nº de ensaios efetuados por amostra ou padrão;

y_k = cada resultado obtido;

y = representa a média aritmética de cada resultado obtido.

8.2.6.3.3 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.

O cálculo teórico do desvio padrão da reprodutibilidade baseado na concentração do analito pode ser obtido pela equação de Horwitz, modificada por Thompson, de tal forma que:

- para c (concentrações) $> 0,138$ $\Rightarrow \sigma = 0,01 c^{0,5}$
- para $1,2 \times 10^{-7} \leq c$ (concentrações) $\geq 0,138$ $\Rightarrow \sigma = 0,02 c^{0,8495}$
- para c (concentrações) $< 1,2 \times 10^{-7}$ $\Rightarrow \sigma = 0,02 c$

8.2.6.3.3.1 Limite de reprodutibilidade (R)

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

$$R = t_{(n-1, 1-\alpha)} \sqrt{2} \cdot S_R \quad (11)$$

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

O cálculo da reprodutibilidade é efetuado para cada nível, separadamente, após eliminação dos valores discrepantes (ISO 5725-2).

No quadro 5, está apresentado um resumo da determinação da repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

Quadro 5 – Repetitividade, Precisão Intermediária e Reprodutibilidade

Analisar: Padrões, materiais de referência ou amostras fortificadas à várias concentrações ao longo da faixa de trabalho	Repetições (independentes)	O que calcular a partir dos dados?	Comentários
a) Mesmo analista, equipamento, laboratório, período curto (repetitividade)	≥ 7	Determinar o desvio-padrão amostral (s) de cada concentração	Determinar o desvio-padrão amostral da repetitividade de cada concentração.
b) Analistas e equipamentos diferentes, mesmo laboratório, período estendido (precisão intermediária)	≥ 7	Determinar o desvio-padrão amostral (s) de cada concentração	Determinar o desvio-padrão da reprodutibilidade intralaboratorial de cada concentração.
c) Analistas, equipamentos e laboratórios diferentes, período estendido (reprodutibilidade)	≥ 7	Determinar o desvio-padrão amostral (s) de cada concentração	Determinar o desvio-padrão da reprodutibilidade interlaboratorial de cada concentração. Requer estudo colaborativo

O Laboratório deve realizar o maior número de repetições técnica e economicamente viáveis, pois se no número de repetições for pequeno, as conclusões, para uma determinada confiabilidade, podem não ter utilidade prática ou o erro maior que o admissível. A ISO 5725-3 que trata de precisão intermediária recomenda que sejam efetuadas no mínimo 15 repetições.

8.2.6.3.4 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.

Considerando adequada a exatidão dos métodos, quando se pretende avaliar se dois métodos (A e B) tem diferenças significativas entre si, em termos de precisão, pode-se recorrer ao teste F . Este baseia-se no cálculo da razão entre as variâncias dos dois métodos ($F_{calc} = s_A^2/s_B^2$), colocando-se a maior no numerador, de modo que a razão seja maior ou igual a 1. Em seguida, compara-se este valor obtido com o valor tabelado de F . Se $F_{calculado} \leq F_{tabelado}$, os dois métodos não apresentam diferenças significativas entre si, relativamente às suas precisões.

O teste “*t student*” pode também ser utilizado para verificar se as médias dos resultados de dois métodos podem ser consideradas estatisticamente iguais.

8.2.6.3.5. Avaliação da aceitabilidade das características de precisão de um método de análise

No caso de não haver método com os quais possam ser comparadas as características de precisão, então, valores teóricos de repetitividade e reprodutibilidade podem ser calculados a partir da equação de *Horwitz* [1]. A forma mais adequada é o uso dos valores de *HORRAT* para avaliar a aceitabilidade das características de precisão de um método.

O valor de *HORRAT* é dado por:

$$\frac{DPR_{(R)} \text{ derivado do estudo colaborativo}}{DPR_{(R)} \text{ previsto da equação de Horwitz}}$$

Assim, HO_R , o valor *HORRAT* para reprodutibilidade, é o valor do desvio padrão relativo (**CV**) da reprodutibilidade dividido pelo valor do desvio padrão relativo (**CV**) da reprodutibilidade calculado a partir da equação de *Horwitz*, na concentração de interesse.

8.2.6.3.5.1 Interpretação

Se os valores de *HORRAT* forem menores ou iguais a 2, os valores da reprodutibilidade do métodos podem ser considerados satisfatórios. Os laboratórios devem se assegurar de que os métodos que eles empregam atendem esse critério.

8.2.6.3.5.2 Cálculo do valor de *Horwitz*

O valor de *Horwitz* é derivado da equação de *Horwitz*, que estabelece para qualquer método:

$$DPR_R = 2^{(1 - 0,5 \log C)} \quad (12)$$

E que este valor independe da matriz/analito. Os principais valores são:

Razão de Concentração	PDPR _R
1 (100%)	2
10 ⁻¹	2,8
10 ⁻² (1%)	4
10 ⁻³	5,6
10 ⁻⁴	8
10 ⁻⁵	11
10 ⁻⁶ (ppm)	16
10 ⁻⁷	23
10 ⁻⁸	32
10 ⁻⁹ (ppb)	45

8.2.6.4 Robustez

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.

8.2.6.5 Comparações Interlaboratoriais

O ABNT ISO/IEC Guia 43-Parte 1 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 em 8.2.6.1.

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.

9 DOCUMENTAÇÃO DE MÉTODOS VALIDADOS

Todos os dados relevantes no estudo de validação de um método, como o planejamento, experimentos e resultados obtidos, devem ser documentados e registrados de forma a possibilitar a rastreabilidade de todo o processo. Documentações que registrem etapas da validação são necessárias também para fins de avaliação e podem ser exigidas por razões contratuais ou até mesmo por organismos regulamentadores.

Depois de cumpridas todas as etapas do processo de validação, é importante elaborar o procedimento operacional de forma que o método possa ser implementado de maneira clara e sem ambigüidades. A documentação apropriada auxilia na aplicação consistente do método, possibilitando sua execução conforme descrito; caso contrário o desempenho real do método não irá corresponder àquele previsto nos dados de validação. Portanto, a documentação deve minimizar a introdução de variação acidental no método.

Os métodos documentados formam uma parte importante do sistema da qualidade do laboratório e devem estar sujeitos a um controle eficaz de documentos, assegurando desse modo que somente métodos e procedimentos validados sejam utilizados. O método documentado deve informar quando foi autorizado para uso.

Convém que a documentação seja clara, precisa e concisa, dentro dos limites estabelecidos pelo seu campo de aplicação. Um formato padronizado assegura que nenhum ponto importante foi esquecido, que as informações a serem incluídas no procedimento são fornecidas sempre na mesma ordem e que qualquer assunto desejado pode ser encontrado rapidamente

10 DOCUMENTOS DE REFERÊNCIA

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21st ed. Washington, 2005.
 - AOAC (Association of Official Analytical Chemists). *AOAC Official methods of analysis. Appendix D: guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis*. Washington: AOAC, 2002.
 - ASTM E178:2002 *Standard Practice for Dealing With Outlying Observations*.
 - BARRET, V.; LEWIS, T. *Outliers in statistical data*. 3 ed. New York: John Wiley, 1994. 604 p.
 - BELSLEY, D.A.; KUH, E.; WELSCH, R.E. *Regression diagnostics: identifying influential data and sources of collinearity*. New York: Wiley, 1980. 292 p.
 - BROWN, M.B.; FORSYTHE, A.B. *Robust tests for the equality of variances*. *J. Am. Stat. Assoc.*, v. 69, p. 364-367, 1974.
 - BRUCE, P.; MINKKINEN P.; RIEKKOTA M.L. *Practical Method Validation: Validation Sufficient for an Analysis Method*. *Mikrochim. Acta*. 128, 93-106. 1998.
 - COCHRAN, W. G. The distribution of the largest of a set of estimated variances as a fraction of their total, *Ann. Eugenics*, 11, 47, 1941.
 - EAL.- P11. *Validation of Test Methods - General principles and concepts*. EAL European cooperation for Accreditation of Laboratories. 1997.
 - EURACHEM. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. 1st ed. 1998.
 - GARFIELD, F.M. *Quality Assurance Principles for Analytical Laboratories*. AOAC. Arlington. 1997.
 - GREEN, J.M. *A Practical Guide to Analytical Method Validation*. *Analytical Chemistry*. 1996. (68) 305A-309A
 - GRUBBS, F. E.; BECK, G. *Extension of sample sizes and percentage points for significance tests of outlying observations*. *Technometrics*, 14:847-856, 1972.
 - GRUBBS, F. E. *Procedures for detecting outlying observations in samples*. *Technometrics*, v. 11, p. 1-21, 1969.
 - HORWITZ, W. *Evaluation of Analytical Methods Used for Regulation of Food and Drugs*. *Analytical Chemistry*, 54 (1982) 67A
 - HUBER, Ludwig, *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*. Interpharm Press. 1999.
 - ISO 5725-1:1994. *Accuracy (trueness and precision) of Measurement Methods and Results - Part 1: General principles and definitions*.
 - ISO 5725-2:1994(1998). *Accuracy (trueness and precision) of Measurement Methods and Results - Part 2: basic method for the Determination of Repeatability and Reproducibility of a Standard Measurement Method*.
 - ISO 5725-3:1994(2001). *Accuracy (trueness and precision) of Measurement Methods and Results - Part 3: Intermediate Measures of Precision of a Standard Measurement Method*.
 - ISO 5725-4:1994. *Accuracy (trueness and precision) of Measurement Methods and Results - Part 4: Basic Methods for the Determination of the Trueness of a Standard Measurement method*.
 - ISO 5725-6:1994(2001). *Accuracy (trueness and precision) of Measurement Methods and Results - Part 6: Use in Practice of Accuracy Values*.
-

- IUPAC; HORWITZ, W. *Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies*. Pure & Appl. Chem., 67(2): 331-343, 1995.
- KELLY, P.C. *Outlier detection in collaborative studies*. J. Assoc. Off. Anal. Chem., v. 73, p. 58-64, 1990
- LEVENE, H. *Robust tests for equality of variances*. In: OLKIN, I.; GHURYE, S.G.; HOEFFDING, W.; MADOW, W.G.; MANN, H.B. (Ed.) *Contributions to probability and statistics*. Stanford: Stanford University Press, 1960. p. 278-292.
- LGC / VAM – *In-House Method Validation - A Guide for Chemical Laboratories*. 2003.
- NATA. Technical Note 17. *Format and Content of Test Methods and Procedures for Validation and Verification of Chemical Test Methods*. 1997.
- RELACRE. Guia Relacre 13. *Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*. Portugal. 2000.
- SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method *Analytica Chimica Acta*, Vol. 552, issue 1-2, November 2005, p. 25-35.
- TAYLOR, J.K. . *Quality Assurance of Chemical Measurements*. Lewis Publishers, 1987.
- THOMPSON, M. *Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing*. *Analyst*, v.125, p. 385-6, 2000.
- VIM - Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia (VIM). Tradução do documento VIM JCGM 200-2008, dezembro de 2008.
- WEISBERG, S. *Applied linear regression*. New York: Wiley, 1985. 324 p.
- WOOD, R., *How to validate analytical methods*. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 18, n. 9, 10 September 1999, pp. 624-632(9).

11. HISTÓRICO DA REVISÃO

Revisão geral do documento, que inclui:

- ✓ a mudança do título de “Orientação sobre a Validação de Métodos de Ensaio Químicos” para “Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos”.
 - ✓ reordenação de itens para tornar mais claro o documento.
 - ✓ retirada das definições de termos referenciando-as a documentos normativos.
 - ✓ atualização do documento adequando-o à terminologia e metodologias de validação mais recentes.
 - ✓ retirada de fórmulas para cálculos, por exemplo, no teste de seletividade do método, por entender-se que há bastante bibliografia da qual os laboratórios podem se utilizar para este fim.
-

ANEXO – RELAÇÃO DOS PARTICIPANTES DA ELABORAÇÃO DESTE DOCUMENTO

De forma a auxiliar aos laboratórios de ensaios, especialmente os postulantes à acreditação, na tarefa de validar os métodos por eles desenvolvidos, a Divisão de Acreditação de Laboratórios (Dicla) da Cgcre reuniu a sua **Comissão Técnica de Química (CT-05)**, congregando os especialistas, abaixo listados, que dedicaram um tempo de suas atividades à elaboração e revisão deste documento.

A Dicla agradece pela contribuição prestada no apoio ao fortalecimento da atividade de acreditação de laboratórios.

Emissão e revisão 01: **Hélio Lionel** (*in memoriam*) Especialista em Química do Petróleo; **Sônia Elisa Pereira** (Coordenadora do trabalho) - Instituto Nacional de Tecnologia / INT; **Suzana Saboia de Moura** - INMETRO / Dicla; **Eduardo Castello Branco T. Guimarães** - UERJ / LABCON; **Margareth Westin D. de Azevedo** - CETEC / Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais; **Lina Yamachita Oliveras** - CIENTEC / RS; **Tânia Barreto Simões Corrêa** - EMBRAPA / CTA; **Alfredo Rodrigues de Oliveira** - Hidroquímica; **Vanderléa de Souza** - INMETRO / DQUIM; **Albert Hartmann** - Millennium Chemicals; **Lúcia Helena Noanta de Souza** - PETROBRAS / CENPES; **Vera Harcar** - Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro; **Sérgio Motta** - SENAI / CETIND; **Kikue Higashi** - Especialista em Química Ambiental; **Paulo Afonso Lopes da Silva** - Ph. D., Estatístico; **Reginaldo Ramos** - Especialista em Química Ambiental; **Walderez Bindilatti** - Química

Membros do Grupo Técnico responsável pela revisão 02: **Eduardo Castello Branco T. Guimarães** – (Coordenador do trabalho) - UERJ / LABCON; **Akie Kawakami Ávila** - FIOCRUZ / Biomanguinhos; **Alfredo Rodriguez de Oliveira** - Especialista em Química Ambiental; **Ise Maria Guilhermino Lemos** - Especialista em Química do Petróleo; **Janaína Marques Rodrigues Caixeiro** - INMETRO / DQUIM; **Kikue Higashi** - Especialista em Química Ambiental; **Olga Benário Ramos Leal** - INMETRO / DICLA; **Patrícia Ritter Martins** - PETROBRAS / CENPES, com a colaboração de: **Paulo Afonso Lopes da Silva** - Ph. D., Estatístico; **Renata M. Borges** - INMETRO / Dicla

Membros do Grupo Técnico responsável pela revisão 03: **Eduardo Castello Branco T. Guimarães** - Coordenador do trabalho - IQ / UERJ; **Adriane Castro Pereira** - Laboratório Biominaerais Ltda.; **Akie Kawakami Ávila** - Fundação BIO RIO; **Eliane Cristina Pires do Rego** – INMETRO / DQUIM; **Ise Maria Guilhermino Lemos** - Especialista em Química do Petróleo; **Lina Yamachita Oliveras** - CIENTEC/RS; **Luzia Cristina Valente Rodrigues** - LAMIM / CPRM; **Neimar Araújo** – IBP; **Olga Benário Ramos Leal**; Dicla / INMETRO; **Paula Fernandes de Aguiar** - IQ / UFRJ; **Paulo Afonso Lopes da Silva** - Ph. D, Estatístico; **Paulo Paschoal Borges** – INMETRO / DQUIM; **Patrícia Ritter Martins** - CENPES / PETROBRAS; **Renata M. Borges** – INMETRO / DICLA; **Roberto Gonçalves Junqueira** - ALM/FAFAR /UFMG; **Tânia Barreto Simões Corrêa** - Especialista em Alimentos
