



Instituto Nacional de Metrologia,
Normalização e Qualidade Industrial

ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE ENSAIOS QUÍMICOS

Documento de caráter orientativo

DOQ-CGCRE-008

Revisão 02 – JUNHO/2007

ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE ENSAIOS QUÍMICOS**SUMÁRIO**

- 1 Objetivo**
- 2 Campo de Aplicação**
- 3 Responsabilidade**
- 4 Documentos de Referência**
- 5 Introdução**
- 6 Definições**
- 7 Questões relevantes na utilização de métodos analíticos**
- 8 Validade de métodos**
 - 8.1 Validação**
 - 8.2 Comparação de métodos**
 - 8.3 Programas interlaboratoriais**
- 9 Planejamento de validação**
- 10 Parâmetros de validação**
 - 10.1 Especificidade e seletividade**
 - 10.2 Linearidade**
 - 10.3 Faixa de trabalho e faixa linear de trabalho**
 - 10.4 Sensibilidade**
 - 10.5 Limite de detecção**
 - 10.6 Limite de quantificação**
 - 10.7 Exatidão e tendência (bias)**
 - 10.7.1 Materiais de referência certificados (MRC)**
 - 10.7.2 Recuperação**
 - 10.8 Precisão**
 - 10.8.1 Precisão**
 - 10.8.2 Reprodutibilidade**
 - 10.8.3 Precisão intermediária**
 - 10.8.4 Comparação da precisão entre métodos**
 - 10.9 Robustez**
 - 10.10 Incerteza de medição**
- 11 Documentação de métodos validados**
- 12 Itens revisados**

ANEXO – Relação dos participantes da elaboração deste documento.

1 OBJETIVO

Este documento tem como objetivo auxiliar laboratórios na tarefa de demonstrar que um método de ensaio químico, nas condições em que é praticado, tem as características necessárias para a obtenção de resultados com a qualidade exigida.

2 CAMPO DE APLICAÇÃO

Este documento aplica-se à Dicla, aos laboratórios acreditados e postulantes à acreditação.

3 RESPONSABILIDADE

A responsabilidade pela revisão deste documento é da Dicla.

4 DOCUMENTOS DE REFERÊNCIA

Diretiva Parte 2 : 2007 – Regras para a Estrutura e Redação de Documento Técnico ABNT

ABNT ISO/IEC Guia 43-1:1999. Ensaio de Proficiência por Comparações Interlaboratoriais. Parte 1: Desenvolvimento e Operação de Programas de Ensaio de Proficiência.

ABNT NBR ISO/IEC 9000:2000. Sistemas de gestão da qualidade - Fundamentos e vocabulário

ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005. Requisitos Gerais para Competência de laboratórios de Ensaio e Calibração.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st ed. Washington, 2005.

ASTM D 5172:1991(2004) Standard Guide for Documenting the Standard Operating Procedures used for the Analysis of Water.

ASTM E178:2002 Standard Practice for Dealing With Outlying Observations.

ASTM E 1169:2002 Standard Guide for Conducting Ruggedness Tests.

Bruce, P., Minkkinen P., Riekkota M.L. Practical Method Validation: Validation Sufficient for an Analysis Method. Mikrochim. Acta. 128, 93-106. 1998.

Bruns, R. E.; Neto, B. B.; Scarminio, I. S. Como fazer Experimentos. Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria - Editora da Unicamp - 2^a edição - 2005

CFR Title 40 - Part 136 - Guidelines Establishing Test Procedures for the Analysis of Pollutants – Appendix B – Definition and Procedure for the Determination of the Method Detection Limit. Revision 1.11.

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.

EURACHEM. Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. 2nd ed., 2000

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

HUBER, Ludwig, Validation and Qualification in Analytical Laboratories. Interpharm Press. 1999.

INMETRO/ABNT. Guia para a Expressão da Incerteza de Medição, 2003, 3^a Ed. Brasileira do “ISO Guide to the Expression of Uncertainty in Measurements”.

ISO 3534-1:1993 - Statistics - Vocabulary and Symbols - Part 1: Probability and general statistical terms.

ISO 3534-2:1993 - Statistics - Vocabulary and Symbols - Part 2: Statistical quality control.

ISO 3534-3:1999 - Statistics - Vocabulary and Symbols - Part 3: Design of experiments.

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.

ISO 78-2:1999 – Chemistry – Layout for standards – Part 2: Methods of chemical analysis.

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.

RESOLUÇÃO RE nº 899, de 29/05/03, da ANVISA – Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos.

TAYLOR, J.K. . Quality Assurance of Chemical Measurements. Lewis Publishers, 1987.

VIM - Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia, 1995.

5 INTRODUÇÃO

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. 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.

O laboratório, ao empregar métodos de ensaios químicos emitidos por organismos de normalização, organizações reconhecidas na sua área de atuação ou publicados em livros e/ou periódicos de grande credibilidade na comunidade científica, necessita demonstrar que tem condições de operar de maneira adequada estes métodos normalizados, dentro das condições específicas existentes nas suas instalações antes de implantá-los.

6 DEFINIÇÕES

As definições gerais referentes à qualidade são as da norma ABNT NBR ISO/IEC 9000. Preferem-se as definições do VIM se diferentes da ABNT NBR ISO/IEC 9000.

6.1 Validação

Comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos. (ABNT NBR ISO/IEC 9000).

6.2 Método normalizado

É aquele desenvolvido por um organismo de normalização ou outras organizações (por exemplo, ABNT, ASTM, ANSI ou APHA/AWWA/WEF), cujos métodos são aceitos pelo setor técnico em questão.

6.3 Método não normalizado

É aquele desenvolvido pelo próprio laboratório ou outras partes, ou adaptado a partir de métodos normalizados e validados. Por exemplo, métodos publicados em revistas técnicas, métodos de fabricantes de equipamentos, métodos utilizando conjuntos (*kits*) de ensaio e instrumentos portáteis.

7 QUESTÕES RELEVANTES NA UTILIZAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

O laboratório deve estar ciente dos requisitos da Norma 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).

Quando o laboratório utilizar métodos normalizados, será necessário verificar se os dados de desempenho declarados são adequados ao propósito do ensaio e, se necessário, fazer declaração de competência. No caso do método normalizado, se não declarar dados de desempenho relevantes para a aplicação em questão, o laboratório deve comprovar a sua competência.

8 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS (ABNT NBR ISO/IEC 17025)

8.1 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 desempenho devem ser realizados com equipamentos e instrumentos dentro das especificações, funcionando corretamente, adequadamente calibrados e validados. Do mesmo modo, o operador que realiza os estudos deve ser competente na área de estudo e precisa ter conhecimento suficiente sobre o trabalho sendo capaz de tomar as decisões apropriadas durante a realização do estudo.

8.2 Comparação de Métodos

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

As análises são efetuadas em replicata, utilizando os dois métodos de ensaio, em separado, sobre as mesmas amostras, numa faixa restrita de concentrações ou 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, Regressão Linear entre os dois métodos e Planejamento de Experimentos.

Nota: Ver item 10.1.2 sobre Teste de Hipótese (teste **F** seguido pelo teste **t** correspondente).

8.3 Programas 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 processos colaborativos.

O processo colaborativo é uma forma especial de ensaio para avaliar o desempenho de um método nas condições normais de trabalho em vários laboratórios, por meio de ensaio de amostras homogêneas preparadas cuidadosamente.

9 PLANEJAMENTO DA VALIDAÇÃO

No planejamento e execução da validação, sugere-se a seguinte seqüência 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;
- Fazer um procedimento operacional para validação;
- Fazer os experimentos preliminares de validação;
- Ajustar os parâmetros do método e/ou critérios de aceitação, se necessário;

- Fazer experimentos completos de validação;
- Fazer um procedimento operacional para execução do método.

Os experimentos e os resultados devem ser documentados e registrados.

10 PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO

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

- Especificidade e Seletividade
- Linearidade
- Faixa de trabalho e Faixa linear de trabalho
- Sensibilidade
- Limite de detecção
- Limite de quantificação
- Exatidão e tendência (*bias*)
- Precisão
- Robustez
- Incerteza de medição

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 Principal Componente	Análise de Traços	Propriedades Físicas
Precisão		✓	✓	✓
Especificidade/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

10.1 Especificidade e Seletividade

Uma amostra, de maneira geral, consiste dos analitos a serem medidos, da matriz, e de outros componentes que podem ter algum efeito na medição, mas que não se quer quantificar. A especificidade e a seletividade estão relacionadas ao evento da detecção. Um método que produz resposta para apenas um analito é chamado específico. Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo. Entretanto, os termos especificidade e seletividade são frequentemente utilizados indistintamente ou com diferentes interpretações.

Na prática, diferentes testes de especificidade e seletividade tentam abordar o mesmo problema: o que se mede é o que se pensa que se mede? Entender os diferentes mecanismos que causam interferências pode ajudar na estruturação dos testes e achar soluções para os problemas encontrados. A medição pode ser alterada porque os reagentes, matriz da amostra ou outros componentes alteram a sensibilidade do detector que mede o analito de interesse ou porque estes compostos afetam diretamente a resposta. O efeito de erros constantes (interferências) e erros proporcionais (efeito de matriz) podem ocorrer ao mesmo tempo. Uma vez conhecidos, estes problemas podem ser superados por meio de adição-padrão, análise de múltiplos componentes ou por uma mudança no pré-tratamento, separação, ou detecção.

Dependendo da técnica analítica utilizada, a quantidade relativa da matriz pode diminuir conforme a amostra é processada durante as etapas do ensaio. A matriz está presente nas fases de amostragem, no pré-tratamento da amostra e nas etapas de preparação. Alguma porção da matriz entra no sistema de separação e alguns componentes podem ainda estar presentes na fase de detecção. Os possíveis problemas encontrados durante as fases de preparação da amostra afetam a exatidão do método e isto será abordado neste documento.

10.1.1 Testes de Especificidade

Testes de especificidade necessitam de uma pesquisa cuidadosa do conhecimento disponível na área de aplicação, para que se encontrem todos os componentes que precisam ser testados. Assim sendo, o analito, a matriz com ou sem analito, matérias-primas do processo, impurezas dos materiais iniciais ou do processo, subprodutos e produtos de degradação ou metabólitos e reagentes em branco devem todos ser analisados. Às vezes se faz necessário expor todos os componentes e a matriz a condições extremas (calor, ácido, álcali, oxidação, radiação UV/Visível, luz fluorescente) para determinar possíveis produtos de degradação.

Muito esforço foi dedicado para resolver os problemas de especificidade freqüentemente encontrados com as técnicas mais comuns de espectrofotometria de UV/Visível ou de cromatografia líquida. Comparações de resultados, variando as condições de medição e análise de pureza de sinal, podem ser usados para verificar que nenhum outro componente conhecido ou desconhecido esteja sendo determinado junto com o analito. Algumas vezes devem-se usar técnicas adicionais, como cromatografia de camada fina (CCF) ou espectroscopia de massa (EM), após a separação e a coleta do analito. Em particular, isso é necessário em métodos usados para avaliar estabilidade. Para este propósito, as amostras utilizadas nos ensaios de condições extremas, são estudadas cuidadosamente para provar que nenhum produto de degradação conhecido ou desconhecido possa perturbar o sinal do analito.

Como exemplo, para técnicas cromatográficas, além das comparações visuais de cromatogramas, diferentes parâmetros devem ser calculados nos cromatogramas para descrever a especificidade do método. Os parâmetros mais importantes são: resolução, retenção relativa (fator de separação), fator de capacidade (fator de retenção), fator de simetria e número de pratos teóricos.

10.1.2 Testes de Seletividade

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

Vários testes e suas estatísticas correspondentes podem ser utilizados para o estudo da seletividade dependendo da disponibilidade do analito, da matriz sem o analito e de amostras de referência nas concentrações de interesse. Se a matriz da amostra sem analito ou um grupo satisfatório de amostras de referência estão disponíveis, podem ser aplicados os testes F (*Snedecor*) de homogeneidade de variâncias e o teste t (*Student*) de comparação de médias, ou então realizada a análise dos desvios em relação aos valores de referência. Normalmente, parte-se da hipótese em que a matriz não afeta o sinal do analito em níveis de concentrações elevados ou acima da faixa. 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. O número de amostras paralelas em cada nível de concentração deve ser maior ou igual a 7 (sete) para permitir o uso adequado dos modelos estatísticos e proporcionar uma comparação válida. Primeiro, faz-se o teste F para verificar se as variâncias das amostras podem ser consideradas iguais, calculando-se:

$$F_{\text{calculado}} = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (1)$$

onde s_1^2 e s_2^2 são as variâncias de cada amostra, com a maior variância no numerador. Ao mesmo tempo, obtém-se o valor de F_{tabelado} , com (n_1-1) graus de liberdade no numerador e (n_2-1) graus de liberdade no denominador; usualmente, adota-se um nível de confiança de 95%. Tem-se dois casos:

(I) se F calculado for menor que o F tabelado, as variâncias podem ser consideradas iguais, isto é, a matriz não tem um efeito importante sobre a precisão do método na faixa de concentração em estudo. Neste caso, os desvios-padrão dos grupos de testes podem ser agrupados e a igualdade das médias dos dois conjuntos de amostras pode ser testada com a distribuição t de Student.

Desse modo, calculam-se:

- a) \bar{x}_1 e \bar{x}_2 = médias das respostas dos analitos em amostras “com matriz” e “sem matriz”, respectivamente, na mesma faixa de concentrações;
- b) s_1 e s_2 = desvios-padrão das respostas desses mesmos analitos;
- c) o valor:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{s^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} \quad (2)$$

onde $s^2 = \frac{(n_1 - 1) s_1^2 + (n_2 - 1) s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}$ e n_1 e n_2 são os tamanhos das amostras 1 e 2.

O valor de t_{tabelado} é obtido a partir da tabela da distribuição de Student para $(n_1 + n_2 - 2)$ graus de liberdade e a confiança desejada.

(II) se F calculado for maior que o F tabelado, as variâncias não podem ser consideradas iguais, ou seja, a matriz tem um efeito importante sobre a precisão do método na faixa de concentração em estudo, e o $t_{\text{calculado}}$ é:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad (3)$$

Neste caso, para a obtenção do t tabelado, o número de graus de liberdade (v) é igual a:

$$v = \frac{(s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2)^2}{\frac{(s_1^2/n_1)^2}{n_1+1} + \frac{(s_2^2/n_2)^2}{n_2+1}} - 2 \quad (4)$$

Quando interessar somente uma faixa relativamente estreita de concentrações, ou se o erro analítico devido a uma possível dependência com a concentração for desprezível, o teste t denominado “com dados pareados” pode ser utilizado para verificar efeitos de matriz. Nesse caso, tem-se:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{\bar{x}_d \sqrt{n}}{s_d} \quad (5)$$

onde:

$$\bar{x}_d = \sum_{i=1}^n \frac{(d_{i1} - d_{i2})}{n} \quad (6) \quad \text{e} \quad s_d = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [(d_{i1} - d_{i2}) - \bar{x}_d]^2}{n-1}} \quad (7)$$

Nas equações, \bar{x}_d = média das diferenças entre as respostas dos pares de analitos; d_{i1}, d_{i2} = respostas do analito para o par de amostras “com matriz” e “sem matriz”; s_d = desvio padrão das diferenças e n = número de pares. O valor de t tabelado é obtido da distribuição t de Student com $(n-1)$ graus de liberdade e a confiança desejada.

Se o valor de t calculado for menor que o t tabelado, pode-se concluir que a matriz não afeta o ensaio. Se o valor de t for maior que o t tabelado, pode-se concluir que a matriz tem um efeito estatisticamente significativo sobre o resultado do ensaio.

Se a matriz sem o analito não estiver disponível, a seletividade pode ser testada comparando-se as inclinações das curvas de adição padrão. Isto é feito preparando-se dois grupos de amostras que contenham a mesma adição de analito para cada nível de concentração. Um grupo inclui a matriz da amostra (contendo um nível básico do analito) e o outro grupo não inclui a matriz de amostra. Os resultados destas amostras podem ser representados em um mesmo gráfico em função da concentração de analito adicionado. Se as inclinações destas duas curvas de regressão linear forem as mesmas, o único efeito de matriz presente é a interferência natural causada pelo nível básico do analito.

Outros testes são encontrados na literatura e podem ser bastante úteis para a aplicação dos dados dos laboratórios.

10.2 Linearidade

Linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração. 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:

$$y = ax + b \quad (8)$$

Onde:

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

x = concentração;

a = inclinação da curva de calibração = sensibilidade;

b = interseção com o eixo y , quando $x = 0$.

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito ou então calculada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados.

O coeficiente de correlação linear (r) é frequentemente usado para indicar o quanto pode ser considerada adequada a reta como modelo matemático.

Nota: Convém avaliar a homocedasticidade (homogeneidade de variáveis)

Como os desvios da linearidade são muitas vezes difíceis de serem detectados visualmente, pode-se verificar a sua adequação por meio do cálculo dos resíduos entre os valores medidos e os valores calculados a partir da equação de regressão. Calcula-se o valor de t por:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{\text{resíduo}}{s_r / \sqrt{n}} \quad (9)$$

onde:

resíduo = $|x_{\text{medido}} - x_{\text{calculado}}|$

s_r = desvio padrão dos resíduos

n = número de pontos

Se o valor de t calculado para um ponto duvidoso de uma curva de calibração for menor ou igual ao valor de t unilateral, para a confiança desejada e $(n-1)$ graus de liberdade, considera-se que o ponto pertence à curva e a faixa até ele é linear:

A maioria dos equipamentos de detecção 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.

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

10.3 Faixa de Trabalho e Faixa Linear de Trabalho

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

No limite inferior da faixa de concentração, os fatores limitantes são os valores dos limites de detecção e 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.

A faixa linear de trabalho de um método de ensaio é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com a precisão, exatidão e linearidade exigidas, sob as condições especificadas para o ensaio. A faixa linear é definida como a faixa de concentrações na qual a sensibilidade pode ser considerada constante e é normalmente expressa nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico.

10.3.1 Escolha da faixa de trabalho

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. A concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho. Os valores medidos obtidos têm que estar linearmente correlacionados às concentrações. Isto requer que os valores medidos próximos ao limite inferior da faixa de trabalho possam ser distinguidos dos brancos dos métodos. Esse limite inferior deve, portanto, ser igual ou maior do que o limite de detecção do método. As etapas de diluição e concentração devem ser praticadas sem o risco de introduzir erros sistemáticos. A variância dos valores informados deve ser independente da concentração. Esta independência deve ser verificada por um teste estatístico para a linearidade.

Em geral, serão necessários vários pontos de calibração, de preferência mais que seis, para determinar a faixa de trabalho. Na Tabela 1, são apresentadas as metodologias para determinação das faixas de trabalho e linear.

A relação da resposta do instrumento para a concentração não tem que ser perfeitamente linear para um método ser efetivo, mas neste caso, a curva de calibração deve ser preparada diariamente.

A faixa de trabalho e a faixa linear podem ser diferentes para cada tipo de amostra, devido ao efeito das interferências provenientes da matriz.

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. <u>Obs.:</u> preparar diferentes concentrações de modo independente e não alíquotas da mesma solução mãe.	<u>Objetivo:</u> 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.	<u>Objetivo:</u> 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	<u>Objetivo:</u> 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***10.4 Sensibilidade**

Sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito. Pode ser expressa pela inclinação da reta de regressão de calibração, conforme a equação (10) e é determinada simultaneamente com os testes de linearidade.

$$S = \frac{dx}{dc} \quad (10)$$

Onde:

S = sensibilidade;*dx* = variação da resposta;*dc* = variação da concentração.

A sensibilidade depende da natureza do analito e da técnica de detecção utilizada.

10.5 Limite de Detecção

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 do equipamento (*LDE*) é definido como a concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes a razão sinal/ruído do equipamento.

O limite de detecção do método (*LD*) é definido como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero. O LD é determinado por meio de análise completa de uma dada matriz contendo o analito.

O procedimento de determinação do *LD* é aplicado a uma grande variedade de tipos de amostras, desde a água reagente (branco) até águas residuárias, todas contendo o analito. O *LD* 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 começa a ficar problemática., ou seja, “Branco + 3s” e “0 + 3s”, considerando análise de sete ou mais amostras de branco e de brancos com adição, respectivamente.

Na Tabela 2 são apresentadas as metodologias para as medições quantitativas do limite de detecção.

Tabela 2 - Determinação de Limite de Detecção (*LD*)

Nº de Replicatas	Matriz	Cálculos	Observações
≥ 7	Branco da amostra	$LD = \bar{X} + t.s$ onde: \bar{X} = média dos valores dos brancos da amostra; t é a abcissa da distribuição de Student, dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança e, s = desvio padrão dos brancos da amostra.	A média e o desvio padrão dos brancos da amostra são dependentes da matriz.. Válido somente quando os valores dos brancos apresentarem um desvio padrão diferente de zero.
Ou			
≥ 7	Branco da amostra com adição da menor concentração aceitável do analito	$LD = 0 + t.s$ onde: t é a abcissa da distribuição de Student, dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança e, s = desvio padrão 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.

Calcular a variância (s^2) e o desvio padrão (s) das medições em replicata e calcular o LD como a seguir:

$$LDM = t_{(n-1, 1-\alpha)} \cdot (s) \quad (11)$$

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.

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.

10.6 Limite de Quantificação

O Limite de Quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão. Pode ser considerado como sendo a concentração do analito correspondente ao valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 desvios-padrão. 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 para averiguar se a exatidão e a precisão conseguidas são satisfatórias. A Tabela 3 apresenta um resumo do método de determinação do Limite de Quantificação. A diferença entre os Limites de Detecção e de Quantificação é a ordem de grandeza das incertezas associadas

Tabela 3 – Determinação do Limite de Quantificação (LQ)

N ° Replicatas	Matriz	Determinação
≥ 7	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 dos brancos
≥ 7	Branco com adição de concentrações variadas do analito, próximas ao LD	<ul style="list-style-type: none"> - Medir, uma vez cada, 7 replicatas independentes a cada nível de concentração. - Calcular o desvio padrão “s” do valor do analito, para cada concentração. - Fazer o gráfico “s” versus concentração e atribuir um valor para o LQ, por inspeção. - Expressar o LQ como a concentração mais baixa do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de confiança.

10.7 Exatidão e Tendência (bias)

Exatidão do método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro. Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros: uso de materiais de referência, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação.

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

A determinação da tendência total 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 $\frac{\text{valor observado}}{\text{valor esperado}}$.

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.

10.7.1 Materiais de referência certificados (MRC)

Sempre que possível, os materiais de referência certificados 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: NIST, LGC, etc).

O uso correto dos MRC consiste na sua análise para avaliar o desempenho do laboratório. 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.

Na avaliação da exatidão utilizando um material de referência, os valores obtidos pelo laboratório – média e o desvio padrão 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;
- teste de hipóteses;
- índice z (z Score), e
- erro normalizado.

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

10.7.1.1 Erro relativo

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

$$ER = \frac{X_{lab} - X_v}{X_v} \cdot 100 \quad (12)$$

Onde:

X_{lab} = valor obtido experimentalmente ou média aritmética de valores obtidos
 X_v = valor aceito como verdadeiro (valor certificado do MRC)

10.7.1.2 Teste de hipótese

Vide descrição do teste no item 10.1.2 deste documento.

10.7.1.3 Índice Z (Z score)

O índice Z é também um modo de avaliar o desempenho do laboratório, utilizando MRC.

$$Z = \frac{(X_{lab} - X_v)}{s} \quad (13)$$

Onde:

X_{lab} = valor obtido pelo laboratório;
 X_v = valor aceito como verdadeiro (valor certificado do MRC);
 s = desvio-padrão do ensaio de proficiência.

A avaliação pode ser feita (ISO Guia 43) de acordo com o seguinte critério de decisão:

- $|Z| \leq 2 \Rightarrow$ resultado satisfatório;
- $2 < |Z| \leq 3 \Rightarrow$ resultado questionável;
- $|Z| > 3 \Rightarrow$ resultado insatisfatório.

10.7.1.4 Erro normalizado

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

$$E_n = \frac{(X_{lab} - X_v)}{\sqrt{U_{lab}^2 + U_{ref}^2}} \quad (14)$$

Onde:

U_{ref} – incerteza associada ao valor verdadeiro

Se $|E_n| \leq 1$, então pode-se considerar que o resultado do laboratório seja adequado.

10.7.2 Recuperação

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras adicionadas com quantidades conhecidas do mesmo (*spike*). As amostras podem ser adicionadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações, por exemplo, próximo ao limite de detecção, próximo à concentração máxima permissível e em uma concentração próxima à média 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:

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (15)$$

onde: C_1 = concentração determinada na amostra adicionada,
 C_2 = concentração determinada na amostra não adicionada,
 C_3 = concentração adicionada.

10.8 Precisão

Precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. É normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e as duas formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetitividade e a reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio-padrão.

Ambas repetitividade e reprodutibilidade, são geralmente dependentes da concentração do analito e, deste modo, devem ser determinadas para um diferente número de concentrações e, em casos relevantes, a relação entre precisão e a concentração do analito deve ser estabelecida. O desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%) pode ser mais útil neste caso, pois foi normalizado com base na concentração e deste modo ele é praticamente constante ao longo da faixa de interesse, contanto que esta não seja muito grande:

$$\text{DPR} = \text{DP}/\text{CMD} \times 100$$

Onde:

DP = desvio padrão;

CMD = concentração média determinada

10.8.1 Repetitividade

É o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade, a seguir:

- Mesmo procedimento de medição;
- Mesmo observador;
- Mesmo instrumento usado sob mesmas condições;
- Mesmo local, e
- Repetições em curto espaço de tempo.

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 a branco em várias concentrações na faixa de trabalho. Sugere-se 7 ou mais repetições para o cálculo do desvio padrão para cada concentração, chamado desvio padrão de repetitividade.

10.8.1.1 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 duplicatas de uma amostra, determinada sob condições de repetitividade, é significativa.

O limite de repetitividade (r) é dado por:

$$r = t_{\infty} \sqrt{2} \cdot S_r \quad (16)$$

ou, para um nível de significância de 95%:

$$r = 2,8 \cdot S_r \quad (17)$$

sendo: S_r = desvio-padrão de repetitividade associada aos resultados considerados;

Caso o laboratório obtenha mais de dois resultados, o limite de repetitividade (r) é calculado de acordo com a Norma ISO 5725-6.

Nota: Convém avaliar a homocedasticidade(homogeneidade de variáveis)

10.8.2 Reprodutibilidade

É o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, efetuadas sob condições variadas de medição.

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.

Precisão sob condições de reprodutibilidade, por exemplo, onde resultados dos ensaios são obtidos com o mesmo método, variando-se laboratórios, operadores ou equipamentos é denominada “precisão intermediária” (ver 10.8.3).

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.

10.8.2.1 Limite de reprodutibilidade – “R”

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

$$R = t_{\infty} \sqrt{2} \cdot S_R \quad (18)$$

ou, para um nível de significância de 95%:

$$R = 2,8 \cdot \sqrt{S_R^2} \quad (19)$$

sendo: S_R^2 - variância de reprodutibilidade associada aos resultados considerados, para cada laboratório;

O cálculo da reprodutibilidade é efetuado para cada nível, separadamente, após eliminação dos valores dispersos (ISO 5725-2, ASTM E178)

10.8.3 Precisão intermediária

A precisão intermediária, também denominada de reprodutibilidade interna, 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 é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um laboratório e, como tal, mais aconselhável de usar.

Para determinar a precisão intermediária de um método, efetuam-se “n” medições em replicata, ou em ensaio único, sobre a amostra, nas condições pré-definidas, pois existem vários métodos de estudar este tipo de precisão. Quando aplicável, este procedimento é repetido sobre outras amostras, abrangendo outros níveis de concentração.

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 dispersos. A visualização gráfica dos valores também pode ser útil para identificar a existência de valores dispersos.

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

- por meio de gráfico de controle de amplitude, que poderão ser aplicados para replicatas de amostra e para padrões estáveis ao longo do tempo;
- por meio da expressão:

$$Si_{(j,k)} = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2} \quad (20)$$

Onde: $Si_{(j,k)}$ - desvio padrão de precisão intermediária (onde os símbolos relativos às condições intermediárias de precisão podem aparecer entre parênteses, ex: $Si_{(T.O.)}$ significa tempo e operadores diferentes)

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

\bar{y}_j - representa a média aritmética dos resultados da amostra j .

Nesse caso, a determinação da precisão 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 (17) toma a forma:

$$Si_{(j,k)} = \sqrt{\frac{1}{2.t} \cdot \sum_{j=1}^t (y_{j1} - y_{j2})^2} \quad (21)$$

Onde: 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:

$$Si_{(j,k)} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (y_k - \bar{y})^2} \quad (22)$$

em que $Si_{()}$ 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.

Onde:

n – nº de amostras / padrões;

y_k - cada resultado obtido;

\bar{y} - representa a média aritmética de cada resultado obtido.

Recomenda-se a leitura da Norma ISO 5725-3 para aprofundar conhecimento nesta área. Na Norma ISO 5725-6 são expostos vários exemplos práticos de estimativa e controle da precisão intermediária, por meio de gráficos de controle.

Na Tabela 4, está apresentado um resumo da determinação da repetitividade, reprodutibilidade e precisão intermediária.

Tabela 4 – Repetitividade e Reprodutibilidade

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

10.8.4 Comparação da precisão entre métodos

Considerando a exatidão dos métodos adequada, 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 ($F_{\text{calc}} = S_A^2/S_B^2$), colocando-se a maior no numerador, de modo que a razão seja maior ou igual a um. Em seguida, compara-se este valor obtido com o valor tabelado de F . Se $F_{\text{calculado}} \leq F_{\text{tabelado}}$, os dois métodos não apresentam diferenças significativas entre si, relativamente às suas precisões.

10.9 Robustez

A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Um método diz-se robusto se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando esse está sendo executado.

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.

Nesse método são realizados 8 ensaios, separados para determinar os efeitos da variação das 7 diferentes etapas, no procedimento analítico. As oito medições podem ser realizadas numa ordem aleatória. Para ilustrar, a Tabela 5 mostra um exemplo dos efeitos das alterações nos fatores a serem determinados.

Tabela 5. Exemplo de variação nos fatores para a determinação da robustez

Fator	Nominal	Varição
Tempo de agitação	10 min.	12 min.
Tamanho da amostra	5 g	10g
Concentração ácida	1M	1,1M
Temperatura de aquecimento	100°C	95°C
Tempo de aquecimento	5 min.	10 min.
Agitação	sim	Não
PH	6,0	6,5

Fonte: APHA, AWWA, WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st Edition, 2005

Para a determinação da robustez, denominar os fatores nominais por letras maiúsculas, de **A** a **G** e a variação, por letra minúsculas. Preparar uma tabela idêntica à Tabela 6.

Tabela 6. Matriz dos fatores para determinação da robustez do método

Valor do fator	Combinação ensaiada							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A ou a	A	A	A	A	a	a	a	a
B ou b	B	B	b	b	B	B	b	b
C ou c	C	c	C	c	C	c	C	c
D ou d	D	D	d	d	d	d	D	D
E ou e	E	e	E	e	e	E	e	E
F ou f	F	f	f	F	F	f	f	F
G ou g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado	S	t	u	v	w	x	y	z

Fonte: APHA, AWWA, WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st Edition, 2005

Se a combinação **1** for ensaiada, o resultado será **s**. Se a combinação **2** for ensaiada será **t** e assim sucessivamente até que todas as 8 combinações tenham sido ensaiadas. Para determinar a variação de um fator, encontrar os 4 valores correspondentes às letras maiúsculas e as 4 minúsculas e comparar as médias dos dois grupos. Por exemplo, ao calcular as alterações de C para c, usar os resultados: $\frac{s + u + w + y}{4}$ e $\frac{t + v + x + z}{4}$.

No caso acima, o efeito do fator C/c será:

$$\text{Efeito C/c} = \frac{s + u + w + y}{4} - \frac{t + v + x + z}{4}$$

Calcular todos os 7 pares para obter 7 diferenças, que podem ser ordenados para revelar aqueles com efeito significativo no resultado.

Se forem investigados menos que sete fatores, eliminar simplesmente as colunas excedentes. Entretanto, para cada situação, consultar um estatístico para avaliar a variabilidade da medição. Após crítica dos resultados obtidos, fazer um controle mais rigoroso dos fatores de maior influência.

Se não houver diferença significativa, calcular a média e o desvio padrão dos 8 resultados, de s até z. O desvio padrão é uma estimativa realista da precisão do método.

10.10 Incerteza de Medição

Os estudos de validação produzem dados de desempenho global do método e fatores de influência individuais que podem ser aplicados à estimativa da incerteza de medição associada aos resultados do método em rotina.

Informações detalhadas sobre incerteza de medição podem ser encontradas nos documentos listados no item 4 - Documentos de Referência.

11 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 a 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.

É preferível que, ao se escrever um método de ensaio, as informações sejam descritas, tanto quanto possível, na ordem em que o usuário vai precisar delas. Não se pode assumir que todos irão entender como funciona o método com a mesma profundidade do técnico que o desenvolveu e documentou. Uma maneira prática de testar a documentação é pedir a um outro técnico competente para ler com atenção o procedimento e executar o ensaio. Se corresponder ao esperado, então é provável que o método possa ser utilizado por vários técnicos com resultados consistentes. Caso contrário pode ser necessário reescrever o procedimento com mais detalhes para evitar ambigüidades.

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 um procedimento de ensaio seja coerente, claro, correto e tão completo quanto necessário, 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.

Na padronização do formato dos métodos validados, sugere-se utilizar a ABNT ISO/IEC Diretiva – Parte 3, a Norma ISO 78/2, além dos requisitos da NBR ISO/IEC 17025 para a sistemática de controle de documentos do laboratório.

12 ITENS REVISADOS

Revisão 01

- Incluído texto complementando o item 11.1.2 e introduzindo os itens 11.2 e 11.2.1 (início), que foram inadvertidamente suprimidos na edição da revisão anterior.

Revisão 02

- Revisão geral do documento.

ANEXO – RELAÇÃO DOS PARTICIPANTES DA ELABORAÇÃO DESTE DOCUMENTO

De forma a auxiliar aos laboratórios de ensaios químicos, especialmente os postulantes à acreditação, na tarefa de validar os métodos por eles desenvolvidos, a Divisão de Credenciamento de Laboratórios (DICLA) da CGCRE/INMETRO reuniu a sua **Comissão Técnica de Química (CT-05)**, congregando especialistas, abaixo listados, que dedicaram o seu tempo de trabalho à elaboração e revisão deste Documento.

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

Sônia Elisa Pereira (Coordenadora do trabalho)
Instituto Nacional de Tecnologia - INT

Suzana Saboia de Moura
INMETRO / Divisão de Credenciamento de Laboratórios

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 Simões
EMBRAPA / CTAA

Alfredo Rodrigues de Oliveira
Hidroquímica

Vanderléa de Souza
INMETRO / Divisão de Metrologia Química

Albert Hartmann
Millennium Chemicals

Lúcia Helena Noanta de Souza
PETROBRAS / CENPES

Vera Harcar
Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro

Sérgio Motta
SENAI / CETIND

Hélio Lionel
Especialista em Química do Petróleo

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

Ilse Maria Guilhermino Lemos
Especialista em Química do Petróleo

Kikue Higashi
Especialista em Química Ambiental

Olga Benário Ramos Leal
INMETRO / Divisão de Credenciamento de Laboratórios

Patrícia Ritter Martins
PETROBRAS / CENPES

Com a colaboração de:

Paulo Afonso
Ph. D., Estatístico

Renata M. Borges
INMETRO / Divisão de Credenciamento de Laboratórios