



Coordenação Geral de Acreditação

ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Documento de caráter orientativo

DOQ-CGCRE-008

Revisão 09 – JUN/2020



SUMÁRIO

1. Objetivo
 2. Campo de Aplicação
 3. Responsabilidade
 4. Histórico das Revisões
 5. Documentos Complementares
 6. Documentos de Referência
 7. Siglas
 8. Definições
 9. Introdução
 10. Validação
 11. Documentação de métodos validados
- ANEXO A – Relação dos participantes na elaboração deste documento.**

1 OBJETIVO

Este documento tem como objetivo auxiliar os laboratórios de ensaio 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.

Este documento foi desenvolvido de acordo com as diretrizes internacionais e contém aplicações sobre os requisitos da acreditação. Caso o laboratório siga estas orientações, atenderá aos respectivos requisitos; caso contrário, o laboratório deve demonstrar como é assegurado o seu atendimento. As não conformidades constatadas numa avaliação são registradas contra o requisito da acreditação e não contra este documento orientativo, porém as orientações deste documento serão consideradas pelos avaliadores e especialistas.

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 HISTÓRICO DAS REVISÕES

Revisão	Data	Itens revisados
8	ABR/2020	- Revisão do DOQ para atender ao Mod-Cgcre-004 - Incluído capítulo 6 Documentos de Referência no lugar da Bibliografia.
9	JUN/2020	- Corrigidas as referências no item 9.



5 DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

Aplicam-se as últimas edições dos seguintes documentos:

	Massart, D.L., <i>Handbook of chemometrics and qualimetrics</i> . Data handling in science and technology v 20A-20B. 1997, Amsterdam ; New York: Elsevier. v. <1-2 >.
	Miller, J.N. and J.C. Miller, <i>Statistics and chemometrics for analytical chemistry</i> . 6th ed. 2010, Harlow: Prentice Hall. xvi, 278 p.
	NATA. Technical Note 17: <i>Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods</i> . National Association of Testing Authorities, Australia, 2013.
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.
ABNT NBR ISO/IEC 17043	Avaliação da conformidade — Requisitos gerais para ensaios de proficiência.
DOQ-Cgcre-020	Definições de Termos Utilizados nos Documentos Relacionados à Acreditação de Laboratórios, Produtores de Materiais de Referência e Provedores de Ensaios de Proficiência.
Eurachem Guide 2014	The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Magnusson, B. and U. Örnemark (Ed.)
ISO 5725-2:2019	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 5725-3:2001	Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method.
NIT-Dicla-026	Requisitos para a Participação de Laboratórios em Ensaios de Proficiência.
NIT-Dicla-030	Rastreabilidade Metrológica na Acreditação de Organismos de Avaliação da Conformidade e no Reconhecimento da Conformidade aos Princípios das BPL.
VIM 2012	Vocabulário Internacional de Metrologia: conceitos fundamentais e gerais e termos associados, 1ª Edição Luso Brasileira, Duque de Caxias, Inmetro, 2012.

6 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.
- AOAC International, *Official methods of analysis of AOAC International*, in *Guidelines for Standard Method Performance Requirements (Appendix F)*. Gaithersburg: AOAC International, 2016.
- 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.
- EC (2002) Commission decision 2002/657/EC of 12 august 2002 implementing council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off. J. Eur. Commun.*: L221, p. 8-36.
- *EURACHEM Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. Magnusson, B. and U. Örnemark (Ed.), 2014.
- 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.
- ICH: *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, in Q2(R1). ICH Harmonised Tripartite Guideline: London, 2005.
- 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.
- RELACRE. Guia Relacre 13. Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química. Portugal. 2000.
- SERGENT, M. *Statistical design: Chemometrics, number 25 of the series 'Data handling in science and technology'*, R. E. Bruns, I. S. Scarminio and B. de Barros Neto, Elsevier, Amsterdam, 2006, ISBN 978-0-444-52181-1, xx + 412 pp. *Journal of Chemometrics*, v. 21, n. 12, p. 635-635, 2007.
- 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.
- Thompson, M., S.L.R. Ellison, and R. Wood, *Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis - (IUPAC technical report)*. *Pure and Applied Chemistry*, 74(5): p. 835-855, 2002.
- 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).

7 SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AOAC	Association of Official Analytical Chemists (Associação de Químicos Analíticos Oficiais)
ASTM	American Society for Testing and Materials (Sociedade Americana de Ensaios e Materiais)
Cgcre	Coordenação Geral de Acreditação
CMD	Concentração Média Determinada
CV	Coefficiente de Variação
Dicla	Divisão de Acreditação de Laboratórios
DOQ	Documento Orientativo da Qualidade
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
ER	Erro relativo
E_n	Erro normalizado
IEC	International Electrotechnical Commission (Comissão Eletrotécnica Internacional)
ISO	International Organization for Standardization (Organização Internacional para Normalização)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry (União Internacional de Química Pura e Aplicada)
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MRC	Material de Referência Certificado
NBR	Norma Brasileira
NIT	Norma Inmetro Técnica
VIM	Vocabulário Internacional de Metrologia



8 DEFINIÇÕES

Para o propósito deste documento, são adotadas as definições contidas no documento DOQ-Cgcre-020, nas normas ABNT NBR ISO/IEC 17000 e ABNT NBR ISO/IEC 17025 e no VIM. Algumas delas seguem abaixo:

- **Validação** é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos (ABNT NBR ISO/IEC 17025, item 3.9);
- **Validação** é a verificação (ABNT NBR ISO/IEC 17025, item 3.8) na qual os requisitos especificados são adequados para um uso pretendido (VIM, item 2.45);
- **Verificação** é o fornecimento de evidência objetiva de que um dado item satisfaz requisitos especificados, como, por exemplo, a confirmação de que as propriedades relativas ao desempenho ou aos requisitos legais são satisfeitas por um sistema de medição (VIM, item 2.45).

9 INTRODUÇÃO

O laboratório deve atender aos requisitos da ABNT NBR ISO/IEC 17025 para a seleção de métodos de ensaios (item 7.2.1), desenvolvimento de métodos de ensaio pelo laboratório (item 7.2.2), utilização de métodos não normalizados (item 7.2.2.1) e validação de métodos (item 7.2.2).

É fundamental que os laboratórios disponham de meios, critérios e objetivos para comprovar, 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. Para os métodos normalizados, o laboratório deve obrigatoriamente estudar os parâmetros descritos nos itens deste documento, referentes à recuperação/tendência (10.2.5) e precisão (10.2.6) em toda a faixa de trabalho, LD e LQ (10.2.3 e 10.2.4), desde que os parâmetros de validação estejam declarados nos métodos em questão e estejam adequados ao uso pretendido. Muitas vezes, esse estudo é chamado de verificação. Se o método normalizado mudar, a verificação deve ser repetida.

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 atendam aos requisitos para as operações analíticas pretendidas. Para métodos modificados (normalizados ou não) ou desenvolvidos pelo laboratório, existe uma série de parâmetros a serem avaliados para garantir a adequação do método ao uso pretendido. Este documento apresenta os parâmetros mais comumente utilizados no processo de validação. O laboratório deve definir os parâmetros de validação que melhor evidenciem a adequação do método ao uso pretendido.



10 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.

A validação deve ser suficientemente abrangente para atender às necessidades de uma determinada aplicação ou área de aplicação. O laboratório deve registrar os resultados obtidos, o procedimento utilizado para a validação e uma declaração de que o método é ou não adequado para o uso pretendido.

O processo de validação de um método deve estar descrito em um relatório de validação, e os estudos para determinar os parâmetros de validação devem ser realizados com equipamentos e instrumentos dentro das especificações, funcionando corretamente e 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.

10.1 Planejamento e execução da validação

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

- Definir objetivo e escopo do método;
- Definir os parâmetros de desempenho;
- Definir os critérios de aceitação para cada parâmetro de desempenho;
- Verificar se as características de desempenho dos equipamentos 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 a ser utilizado;
- Realizar os experimentos de validação;
- Realizar a análise crítica dos resultados obtidos, considerando os critérios de aceitação;
- Concluir se o método é adequado ao uso pretendido.

Os resultados devem estar documentados e registrados de modo organizado e facilmente acessíveis.

10.2 Parâmetros de desempenho

Os parâmetros de desempenho devem estar claramente descritos no procedimento e relatório de validação e devem incluir, quando aplicável:

- Seletividade
- Linearidade / Faixa de trabalho / Faixa linear de trabalho / Sensibilidade
- Limite de Detecção (LD)
- Limite de Quantificação (LQ)
- Tendência/Recuperação
- Precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade)



- Robustez (*)

(*) A robustez é um procedimento opcional, normalmente realizado previamente à validação do método, na etapa de otimização.

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

Tabela 1 – Parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Parâmetros	Tipo de ensaio	
	Qualitativo	Quantitativo
Seletividade	√	√
Linearidade / faixa de trabalho / Faixa linear de trabalho / Sensibilidade		√
Limite de detecção	√	√
Limite de quantificação		√
Tendência / recuperação		√
Precisão		√
Robustez	(*)	(*)

(*) parâmetro opcional

Nota 1 - Dependendo da faixa de concentração do analito, pode não ser necessária a determinação dos limites de detecção e de quantificação. Por exemplo, quando a faixa de trabalho estiver muito acima do LQ típico para o método a ser validado.

Nota 2 - Os métodos estatísticos empregados neste documento baseiam-se no pressuposto de que toda variação, seja ela associada à amostra (homogeneidade) ou ao processo de medição, é aleatória e segue a distribuição de probabilidade de Gauss (também conhecida como distribuição normal). Caso contrário, uma pesquisa mais aprofundada será necessária.

Nota 3 - Para os métodos qualitativos, a abordagem para determinação da seletividade, do LD e da robustez pode obedecer a parâmetros estatísticos e probabilísticos diferentes dos empregados para métodos quantitativos, conforme indica a literatura. Este documento não aborda métodos estatísticos específicos para esses problemas; para tanto, deverá ser elaborado um documento específico ou métodos específicos para problemas qualitativos que serão incluídos em uma próxima revisão deste documento.



10.2.1 Seletividade

Seletividade é o grau em que o método pode quantificar o analito na presença de outros analitos, matrizes ou de outro material potencialmente interferente (AOAC, 2002). Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo.

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 (Tabela 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.

Tabela 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 possíveis interferentes 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.

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. Esses interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, comprometendo o resultado. Adicionalmente, a magnitude desse efeito também pode depender da concentração. Logo, no estudo de seletividade é necessário verificar também a existência de efeito de matriz.

O procedimento adotado para o estudo do efeito de matriz depende da disponibilidade do analito, da matriz sem o analito e de amostras de referência nas concentrações de interesse. Alguns modos como esse estudo pode ser conduzido estão descritos na Tabela 3.



Tabela 3 - Estudo de efeito de matriz

Caso	Procedimento	Hipóteses	Teste estatístico	Conclusões
Matriz sem o analito disponível ou um grupo satisfatório de amostras de referência disponível	Preparar 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. Deve-se testar toda a faixa de estudo (baixa, média e alta), com no mínimo 3 replicatas por nível de concentração.	1) a matriz não afeta a precisão do analito nos níveis de concentrações estudados 2) a matriz não afeta o sinal do analito nos níveis de concentrações estudados	Teste <i>F</i> (<i>Snedecor</i>) de homogeneidade de variâncias, por nível de concentração e Teste <i>t</i> (<i>Student</i>) de comparação de médias, por nível de concentração	Se o teste <i>F</i> (<i>Snedecor</i>) não for significativo, a matriz não causa um efeito sobre a precisão, por nível de concentração. e Se o teste <i>t</i> (<i>Student</i>) não for significativo, a matriz não causa um efeito sobre o resultado, por nível de concentração.
Matriz sem o analito não disponível	Preparar duas curvas analíticas, que contenham a mesma adição de analito para cada nível de concentração. Uma curva é preparada com adição de analito na matriz da amostra (que já contém um nível do analito) e a outra curva analítica não inclui a matriz de amostra. Devem ser preparados, no mínimo, 5 níveis de concentração com 3 replicatas por nível.	A matriz não interfere na inclinação da curva de adição padrão.	Teste <i>t</i> para inclinações das curvas. Este mesmo procedimento também pode ser aplicado no caso acima.	Comparam-se as inclinações (coeficiente s angulares) das curvas analíticas. Se as inclinações dessas duas curvas de regressão linear não diferirem significativamente, não há efeito de matriz, o que pode ser observado graficamente pelo paralelismo aproximado das duas curvas. Caso contrário, a curva analítica deve ser preparada na matriz. Os dados obtidos nesse procedimento podem ser usados para estudo da linearidade.

Nota 1 - Essas replicatas devem ser preparadas de modo independente.

Nota 2 - Caso haja efeito de matriz, a linearidade, a precisão e a tendência/recuperação também deverão ser estudadas na matriz.

Nota 3 - É necessário esclarecer que o teste *t* (*Student*) é aplicável quando a distribuição dos resultados ou das medições pode ser modelada pela distribuição de probabilidade de Gauss (também conhecida como distribuição normal). Pode-se verificar essa condição graficamente ou por qualquer teste específico como, por exemplo, o teste de Shapiro-Wilk. Ressalte-se que os testes de hipóteses, incluindo o teste *t* (*Student*), não são adequados se forem poucas as repetições. No entanto, esse é o teste atualmente mais utilizado em validação. Assim, recomenda-se, sempre que possível, adotar um número maior de repetições por nível estudado ou pesquisar a distribuição adequada para a situação que se tenha.



10.2.2 Linearidade/Faixa de trabalho/Faixa linear de trabalho/Sensibilidade

Linearidade de um procedimento analítico é a sua habilidade (dentro de uma dada faixa) em obter resultados os quais são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra (ICH, 2005).

Faixa de trabalho de um procedimento analítico é o intervalo entre a menor concentração e a maior concentração de analito na amostra para o qual se demonstrou que o procedimento analítico tem um nível aceitável de precisão, exatidão e linearidade (ICH, 2005).

Faixa linear de trabalho é por inferência a faixa de concentração do analito em que os resultados do método são proporcionais à concentração do analito (Eurachem guide, 2014).

Sensibilidade analítica é a mudança na resposta do instrumento que corresponde a uma mudança na quantidade medida (Eurachem guide, 2014). É a inclinação da curva analítica.

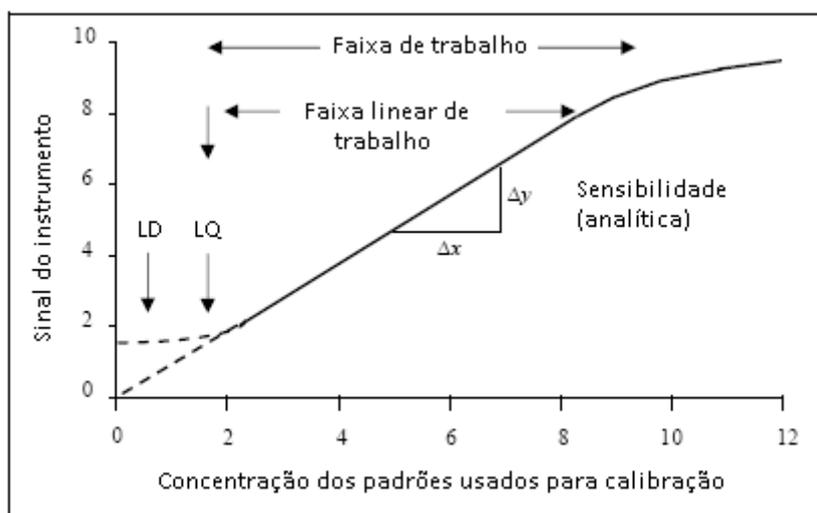
Todo experimento de determinação da faixa de trabalho é iniciado pela escolha de uma faixa preliminar. A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado e a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho.

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

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.

Na Figura 1, estão representados os parâmetros de desempenho descritos neste item.

Figura 1 - Exemplo típico de uma curva analítica com a identificação dos parâmetros de desempenho “Faixa de trabalho”, “faixa linear de trabalho”, “Sensibilidade”, “LD” e “LQ” (Fonte: Eurachem Guide 2014)





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

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

Onde:

y : resposta medida (sinal instrumental como absorbância, altura ou área do pico, etc.);

x : concentração;

a : coeficiente linear (interseção com o eixo y , quando $x = 0$);

b : coeficiente angular (inclinação da curva analítica = sensibilidade).

Os coeficientes da equação de reta são calculados através das equações abaixo:

$$a = \frac{\sum y_i - b \sum x_i}{n} = \bar{y} - b\bar{x} \quad (2)$$

$$b = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum (x_i - \bar{x})^2} \quad (3)$$

Onde:

x_i : valores individuais de concentração;

y_i : valores individuais de sinal instrumental;

\bar{x} : média de valores de x (concentração);

\bar{y} : média de valores de y (sinal instrumental).

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

São necessários vários níveis de concentração uniformemente distribuídos na faixa de trabalho pretendida (no mínimo cinco), para construir a curva analítica. O número de replicatas analisadas de cada concentração deve ser de no mínimo três, e, preferencialmente, com os níveis de concentração analisados em ordem aleatória (Thompson, 2002).

A linearidade de um método não pode ser observada apenas por meio do gráfico dos resultados de resposta em função da concentração do analito. Antes de fazer a regressão linear, deve ser verificada a ausência de valores aberrantes (em inglês, *outliers*) para cada nível de concentração e a homocedasticidade (igualdade das variâncias) dos dados.

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



Se o sistema for homocedástico, calcular a equação da regressão linear simples usando o método dos mínimos quadrados ordinários não ponderados. Caso seja heterocedástico, calcular a equação da regressão linear simples usando o método dos mínimos quadrados ordinários ponderados. É importante ressaltar que o comportamento heterocedástico pode ser causado por procedimentos analíticos inadequados ou realizados com pouco rigor. Nesse caso, o recomendado é investigar essa situação e aplicar ações corretivas pertinentes, porque o método pode voltar a apresentar comportamento homocedástico.

Calcular os coeficientes do modelo da regressão linear simples, os resíduos (resíduo é a diferença entre o valor observado e o valor calculado pela equação da reta de regressão para cada valor de x) e o coeficiente de correlação linear (r). Esse último é um bom indicativo do quanto a reta pode ser considerada adequada como modelo matemático, porém não é conclusivo. Desse modo, devem ser avaliados os resíduos para verificar essa adequação.

Os resíduos devem ser representados graficamente e observado se há comportamento aleatório. Caso se observe alguma tendência no gráfico de resíduos, pode haver indício de que o modelo linear seja inadequado.

Deve-se também avaliar a linearidade por meio do teste F (também conhecido como *F-Snedecor*) na análise da variância (ANOVA) da regressão.

Algumas curvas analíticas não demonstram comportamento linear, mesmo após qualquer transformação. Nesses casos, o comportamento pode ser descrito por uma outra função que modele a relação entre a concentração do analito e a resposta medida.

Na Tabela 4, está um resumo das etapas para determinação da faixa linear de trabalho.

Tabela 4 - Resumo das etapas para determinação da Faixa Linear de Trabalho

Nº Replicatas	Matriz	Procedimento
Etapas (1): 1 (uma) por nível	- Branco com adição de concentrações variadas do analito ou - Branco da amostra com adição de concentrações variadas do analito	Objetivo: Seleção da faixa de trabalho. 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)
Etapas (2) ≥ 3 (três) por nível	- Materiais de referência (diferentes concentrações), na faixa selecionada ou - Branco da amostra com adição de concentrações variadas do analito, na faixa selecionada <u>Obs.:</u> preparar diferentes concentrações de modo independente e não alíquotas da mesma solução mãe Usar no mínimo 5 níveis de concentração	Objetivo: confirmar a linearidade na faixa de trabalho selecionada. - Colocar no eixo x as concentrações do analito e no eixo do y as respostas das medições. - Verificar a existência de valores aberrantes que possam interferir na regressão. Verificar a homocedasticidade da distribuição dos dados. Aplicar a regressão linear adequada e calcular o coeficiente de correlação (r). Com base na estimativa dos resíduos, construir um gráfico e avaliar a tendência. A distribuição aleatória em torno da linha reta confirma a linearidade. Tendências sistemáticas indicam a não linearidade.

Nota 1 - Branco = água reagente;

Nota 2 - Branco da amostra = matriz da amostra sem o analito de interesse.



10.2.3 Limite de Detecção (LD)

Limite de detecção (LD) de um procedimento analítico individual é a menor quantidade de analito na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada sob as condições estabelecidas para o ensaio (ICH, 2005; NATA, 2013).

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 dessa determinação e os problemas associados a ela advêm do fato de que a probabilidade de detecção não muda rapidamente de “0” para “1” quando seu limiar é ultrapassado.

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, também é importante para ensaios qualitativos.

Existem diversos modos de se calcular o limite de detecção. São apresentadas a seguir algumas dessas abordagens.

10.2.3.1 Avaliação/Percepção visual

Baseia-se na percepção da resposta da concentração do analito ou da propriedade observada.

O limite de detecção é determinado pela análise de amostras com concentrações conhecidas de analito ou por valores de propriedades conhecidos e pela definição de um nível mínimo em que o analito/propriedade pode ser detectado com confiança.

Normalmente são realizadas sucessivas diluições até se encontrar a menor concentração/menor valor de propriedade que pode ser diferenciado do branco.

10.2.3.2 Relação Sinal/Ruído

Essa abordagem só pode ser aplicada em procedimentos analíticos que apresentem ruído de linha de base.

A relação sinal/ruído é determinada pela comparação dos sinais medidos de amostras com baixas concentrações conhecidas do analito e dos ruídos dos brancos de amostras, definindo-se a concentração mínima em que o analito pode ser detectado com confiança. Uma relação sinal/ruído de 3:1 ou 2:1 é geralmente considerada aceitável para a estimativa do limite de detecção. É importante ressaltar que a região do ruído do branco deve ser a mesma do sinal medido.



10.2.3.3 Estimativa a partir da curva analítica

10.2.3.3.1 Método simplificado

O limite de detecção (LD) pode ser estimado pela equação (4):

$$LD = 3,3 s / b \quad (4)$$

Onde: s = desvio padrão da resposta do branco
 b = inclinação (coeficiente angular) da curva analítica

Nota 1 - Esse método fornece melhores resultados ao nível de traços. Em altas concentrações, esse método estima valores de LD acima dos reais.

Nota 2 - Quando o branco não gera sinal, pode-se adotar para o valor de “ s ” o desvio padrão do menor nível da curva analítica.

Nota 3 - A inclinação “ b ” pode ser estimada por meio da curva analítica do analito construída na avaliação da linearidade.

10.2.3.3.2 Método completo

Essa abordagem utiliza $s_{y/x}$, obtido pela equação (6) no lugar de s_B na estimativa do limite de detecção, na equação (5):

$$LD = y_B + 3s_B \quad (5)$$

Onde:

y_B : sinal do branco

s_B : desvio padrão do branco

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \quad (6)$$

Onde:

$s_{y/x}$: desvio padrão residual;

y_i : valor individual de sinal instrumental (resposta);

\hat{y}_i : valor da resposta predita pela equação da curva analítica;

n : número de medições.

O valor do coeficiente linear da curva analítica pode ser usado como sinal do branco y_B , que é uma estimativa mais exata do valor de y_B do que uma simples medição do branco. O valor obtido para LD está em termos de resposta e deve ser convertido para concentração através da equação de regressão da curva analítica.

Por exemplo, se um método qualquer onde os valores de coeficientes angular e linear são respectivamente 1,93 e 1,52, e o valor de $s_{y/x}$ é de 0,4329, tem-se:

$LD = 1,52 + 3 \times 0,4329$, ou seja, 2,82 em termos de resposta. Usando a equação de regressão, o LD equivale a 0,67 pg/mL (Fonte: Miller & Miller, 2010).



10.2.3.4 Estimativa pelo desvio padrão do branco

10.2.3.4.1 Branco de amostra

O branco de amostra é a matriz sem o analito de interesse. O limite de detecção (LD) pode ser estimado pela equação (7):

$$LD = \bar{X} + t_{(n-1, 1-\alpha)} \cdot s \quad (7)$$

Onde:

\bar{X} : média dos valores dos brancos da amostra;

t : abscissa da distribuição de Student, dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança;

s : desvio padrão amostral dos brancos da amostra.

Nota 1 - A média e o desvio padrão amostral dos brancos da amostra são dependentes da matriz.

Nota 2 - Válido somente quando os valores dos brancos apresentarem um desvio padrão amostral diferente de zero.

10.2.3.4.2 Branco da amostra com adição da menor concentração aceitável do analito

O limite de detecção (LD) pode ser estimado pela equação (8):

$$LD = 0 + t_{(n-1, 1-\alpha)} \cdot s \quad (8)$$

sendo:

t : abscissa da distribuição de Student, dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança;

s : desvio padrão amostral dos brancos da amostra, com adição.

Nota - A “menor concentração aceitável” é aquela tida como a concentração mais baixa para a qual um grau de incerteza pode ser considerado satisfatório.

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 essa razão, esse número (n) deve expressar a rotina do laboratório.

Por exemplo, no caso de se analisar 7 alíquotas, tem-se $7-1 = 6$ 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.

10.2.3.5 Estimativa por meio de curva de desvios padrão

Nessa abordagem, são preparadas soluções com adição de concentrações variadas do analito ao branco, próximas ao LD que se supõe para o método. O LD pode ser determinado pela análise de 7 replicatas de amostra em pelo menos 3 concentrações distintas, sendo a menor concentração razoavelmente próxima de zero. Um gráfico de concentração *versus* desvio padrão de cada nível é construído e, então, extrapolado para estimar o desvio padrão à concentração “zero” (s_0). O LD do método é considerado como $b+3s_0$, onde b é o valor médio da amostra do branco (NATA, 2013).



10.2.3.6 Considerações sobre o LD

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.

Uma vez estabelecido o LD por uma das abordagens citadas ou outra abordagem contida em documentos nacionais ou internacionais reconhecidos, esse deve ser confirmado por meio da análise de amostras independentes no mesmo nível de concentração/propriedade do LD. Quando cabível, adota-se um número de 6 replicatas (Massart, 1997). Caso alguma das replicatas não seja detectada, significa que o LD determinado pode ter sido subestimado, devendo o mesmo ser reavaliado.

10.2.4 Limite de Quantificação (LQ)

O limite de quantificação (LQ) de um procedimento analítico individual é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão aceitáveis (ICH, 2005).

Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). Esse limite, após ter sido determinado, deve ser testado com amostras independentes no mesmo nível de concentração/propriedade do LQ, para averiguar se a recuperação/tendência e a precisão conseguidas são satisfatórias. Quando pertinente, adota-se um número de 6 replicatas. O limite de quantificação é importante para métodos quantitativos.

Existem diversos modos de se calcular o limite de quantificação. São apresentadas a seguir algumas dessas abordagens.

10.2.4.1 Avaliação / Percepção visual

Baseia-se na percepção da resposta da concentração do analito ou propriedade observada.

O limite de quantificação é geralmente determinado pela análise de amostras com concentrações conhecidas dos analitos ou valores de propriedades conhecidos e pelo estabelecimento de um nível mínimo em que o analito pode ser quantificado com recuperação/tendência e precisão aceitáveis.

Normalmente são realizadas sucessivas diluições até se encontrar a menor concentração/menor valor de propriedade que pode ser quantificado com confiança.

10.2.4.2 Relação Sinal/Ruído

Esta abordagem só pode ser aplicada em procedimentos analíticos que apresentem ruído de linha de base.

A relação sinal/ruído é determinada pela comparação dos sinais medidos de amostras com baixas concentrações conhecidas do analito e dos ruídos dos brancos de amostras, definindo-se a concentração mínima em que o analito pode ser detectado com confiança. A relação sinal/ruído típica para a estimativa do limite de quantificação é de 10:1. Também podem ser adotadas relações sinal/ruído de 6:1 e 5:1, em função do método. É importante ressaltar que a região do ruído do branco deve ser a mesma do sinal medido.



10.2.4.3 Estimativa a partir da curva analítica

O limite de quantificação (LQ) pode ser estimado pela equação (9):

$$LQ = 10 s / b \quad (9)$$

Onde:

s: desvio padrão da resposta do branco

b: inclinação (coeficiente angular) da curva analítica

Nota 1 - Esse método fornece melhores resultados ao nível de traços. Em altas concentrações, este método estima valores de LQ acima dos reais.

Nota 2 - Quando o branco não gera sinal, pode-se adotar para o valor de “s” o desvio padrão do menor nível da curva analítica.

Nota 3 - A inclinação “b” pode ser estimada por meio da curva analítica do analito construída na avaliação da linearidade.

10.2.4.4 Estimativa pelo desvio padrão do branco

10.2.4.4.1 Branco de amostra

O limite de quantificação (LQ) pode ser estimado pela equação (10):

$$LQ = \bar{X} + 10.s \quad (10)$$

Onde:

\bar{X} : média dos valores dos brancos da amostra;

s: desvio padrão amostral dos brancos da amostra.

Nota 1 - A média e o desvio padrão amostral dos brancos da amostra são dependentes da matriz.

Nota 2 - Válido somente quando os valores dos brancos apresentarem um desvio padrão amostral diferente de zero.

Nota 3 - A IUPAC propõe o valor “10” como valor padrão da equação (10) (Massart, 1997). Pode-se adotar também os valores “5” ou “6” em função do rigor analítico exigido.

10.2.4.4.2 Branco da amostra com adição da menor concentração aceitável do analito

O limite de quantificação (LQ) pode ser estimado pela equação (11):

$$LQ = 0 + 10.s \quad (11)$$

Onde:

s: desvio padrão amostral dos brancos da amostra, com adição.

Nota 1 - A “menor concentração aceitável” é aquela tida como a concentração mais baixa para a qual um grau de incerteza pode ser considerado satisfatório.

Nota 2 - A IUPAC propõe o valor “10” como valor padrão da equação (11) (Massart, 1997). Pode-se adotar também os valores “5” ou “6” em função do rigor analítico exigido.



10.2.4.5 Estimativa por meio da curva de desvios padrão

Nesta abordagem, são preparadas soluções com adição de concentrações variadas do analito ao branco, próximas ao LD/LQ que se supõe para o método. O LQ pode ser determinado pela análise de 7 replicatas de amostra em pelo menos 3 concentrações distintas, sendo a menor concentração razoavelmente próxima de zero. Um gráfico de concentração *versus* desvio padrão de cada nível é construído e, então, extrapolado para estimar o desvio padrão à concentração “zero” (s_0). O LQ do método é considerado como $b+10s_0$, onde b é o valor médio da amostra branco (NATA, 2013).

10.2.4.6 Considerações sobre o LQ

O LQ pode ser determinado a partir do LD, porém o mais apropriado é determinar o LD a partir do LQ por meio da equação (12):

$$LD = LQ / 3,3 \quad (12)$$

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.

Uma vez estabelecido o LQ por uma das abordagens citadas ou outra abordagem contida em documentos nacionais ou internacionais reconhecidos, esse deve ser confirmado experimentalmente por meio da análise de amostras independentes no mesmo nível de concentração/propriedade do LQ. Quando cabível, adota-se um número de 6 replicatas (Massart,1997) e deve-se avaliar se a concentração do LQ tem precisão e recuperação aceitáveis, calculando-se a recuperação (%) e o coeficiente de variação (%). Caso essa concentração estimada como LQ não atenda à precisão e à recuperação desejadas, significa que o LQ está subestimado e nova estimativa deve ser realizada com concentrações maiores.

A concentração do LQ é sempre igual ou maior ao primeiro ponto da curva analítica. Para a análise em nível de traços, é recomendado adotar o LQ como a concentração mais baixa da curva analítica. Nesse caso, é importante incluir um controle no método, em concentração equivalente ao LQ, para acompanhar o desempenho nessa concentração e fornecer dados para a reestimação periódica do mesmo com os dados de controle.

Nota - Para estimar o LQ de um método, análises devem ser realizadas em amostras, incluindo todas as etapas do procedimento analítico (NATA, 2013). No caso em que o método de medição tiver etapa de concentração, em amostras com resultados abaixo do LQ, o laboratório deve expressar claramente o fator de concentração na expressão do resultado ($<LQ$) em amostras reais.

Exemplo: Um método cujo LQ é 1,0 mg/L e a amostra analisada foi pré-concentrada 10 vezes, sendo a leitura da amostra abaixo de 1,0 mg/L, o resultado deverá ser expresso como: $< 0,1$ mg/L considerando o fator de concentração de 10 vezes.

10.2.5 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, comparação com método de referência (ou método validado) 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:

$$\frac{\text{valor observado}}{\text{valor sendo}} \times 100\% \quad (13)$$

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

Nota - A exatidão é avaliada numericamente por meio da tendência.

10.2.5.1 Materiais de referência certificados

Sempre que disponíveis, os materiais de referência certificados (MRC) devem ser utilizados no processo de validação de um método de ensaio. Um MRC tem 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 competentes conforme estabelecido na NIT-Dicla-030.

O uso correto dos MRC consiste na sua análise para avaliar o desempenho do método. 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 essa comparação podem ser utilizados diversos critérios de decisão, entre os quais:

- erro relativo, 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.

10.2.5.1.1 Erro relativo (ER)

Um modo de avaliar a exatidão do método é por meio do cálculo do erro relativo (ER), expresso em percentagem conforme a equação (14):

$$ER = \frac{X_{lab} - X_v}{X_v} \cdot 100 \quad (14)$$

Sendo:

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

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



10.2.5.1.2 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):

$$E_n = \frac{(X_{lab} - X_v)}{\sqrt{U_{lab}^2 + U_{ref}^2}} \quad (15)$$

Onde:

U_{ref} : incerteza associada ao MRC.

Se $|E_n| \leq 1$, considera-se que o resultado do laboratório é adequado.

10.2.5.2 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 a equação (16):

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (16)$$

Onde:

C1: concentração do analito na amostra fortificada.

C2: concentração do analito na amostra não fortificada.

C3: concentração do analito adicionado à amostra fortificada.

É importante que os laboratórios estabeleçam critérios de aceitação para recuperação, de preferência seguindo as orientações normativas da legislação aplicável às áreas de atividades, como, por exemplo, meio ambiente. Normalmente, os critérios estão atrelados ao nível de concentração. Na Tabela 5, temos, como exemplo, os critérios sugeridos pela AOAC.

Tabela 5 - Critério de aceitação para recuperação

Analito, %	Fração Mássica (C)	Unidade	Recuperação média, %
100	1	100%	98 – 102
10	10 ⁻¹	10%	98 – 102
1	10 ⁻²	1%	97 – 103
0,1	10 ⁻³	0,1%	95 – 105
0,01	10 ⁻⁴	100 ppm (mg/kg)	90 – 107
0,001	10 ⁻⁵	10 ppm (mg/kg)	80 – 110
0,0001	10 ⁻⁶	1 ppm (mg/kg)	80 – 110
0,00001	10 ⁻⁷	100 ppb (µg/kg)	80 – 110
0,000001	10 ⁻⁸	10 ppb (µg/kg)	60 – 115
0,0000001	10 ⁻⁹	1 ppb (µg/kg)	40 – 120



10.2.5.3 Comparação com método de referência

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 concentração 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.

No teste de hipótese, primeiramente aplica-se o Teste F para avaliar se as variâncias são estatisticamente iguais ou diferentes. O teste *t* (*Student*) é utilizado em seguida para verificar se as médias dos resultados de dois métodos podem ser consideradas estatisticamente iguais.

10.2.6 Precisão

Normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e as três maneiras mais comuns de expressá-la são por meio da repetibilidade, precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão e coeficiente de variação.

O coeficiente de variação (CV, usualmente expresso em %), também conhecido como desvio padrão relativo (DPR), é calculado da seguinte forma (equação 17):

$$CV = DPR = (DP / CMD) \times 100 \quad (17)$$

Sendo:

DP é o desvio padrão;

CMD é a concentração média determinada.

10.2.6.1 Repetibilidade

A condição de repetibilidade de medição, de acordo com o VIM (2012), é a condição de medição num conjunto de condições, as quais incluem o mesmo procedimento de medição, os mesmos operadores, o mesmo sistema de medição, as mesmas condições de operação e o mesmo local, assim como medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares durante um curto período de tempo.

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

As repetições devem ser independentes, ou seja, incluir todas as etapas de preparo do processo de medição. Para avaliar a repetibilidade do método, o número mínimo de repetições para cada nível de concentração varia de acordo com diferentes documentos de validação, mas tipicamente são entre 6 e 15 por material usado no estudo. Considerando-se a dificuldade de estimar um desvio padrão confiável a partir de poucas repetições, é admissível que os valores calculados a partir de vários pequenos grupos de repetições possam ser agrupados para se obter estimativas com números suficientes de graus de liberdade (Eurachem, 2014). É importante testar as concentrações baixa, média e alta da faixa de trabalho.

Nota - Na avaliação da precisão, quanto maior o número de replicatas, melhor é a avaliação da dispersão do método.



10.2.6.1.1 Critérios de aceitação para repetibilidade

É importante que os laboratórios estabeleçam critérios de aceitação para o desvio padrão relativo (DPR), também chamado de coeficiente de variação (CV), obtido sob condições de repetibilidade, de preferência seguindo as orientações normativas da legislação aplicável às áreas de atividades, como, por exemplo, meio ambiente. Normalmente, os critérios estão atrelados ao nível de concentração. Na Tabela 6 temos, como exemplo, os critérios sugeridos pela AOAC.

Tabela 6 - Critério de aceitação para repetibilidade

Analito %	Fração Mássica (C)	Unidade	DPR, %
100	1	100%	1,3
10	10 ⁻¹	10%	1,9
1	10 ⁻²	1%	2,7
0,1	10 ⁻³	0,1%	3,7
0,01	10 ⁻⁴	100 ppm (mg/kg)	5,3
0,001	10 ⁻⁵	10 ppm (mg/kg)	7,3
0,0001	10 ⁻⁶	1 ppm (mg/kg)	11
0,00001	10 ⁻⁷	100 ppb (µg/kg)	15
0,000001	10 ⁻⁸	10 ppb (µg/kg)	21
0,0000001	10 ⁻⁹	1 ppb (µg/kg)	30

Fonte: AOAC, 2016

10.2.6.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária, de acordo com o VIM (2012), refere-se à precisão avaliada sob condições que compreendem o mesmo procedimento de medição, o mesmo local e medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares, ao longo dum período extenso de tempo, mas pode incluir outras condições submetidas às mudanças. Nesse estudo, deve-se definir exatamente quais condições serão variadas (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 aplicado para replicatas de amostras e para padrões estáveis ao longo do tempo;
- por meio da equação (18):

$$Sp_{i(j,k)} = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2} \quad (18)$$

$Sp_{i(j,k)}$ = 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

\bar{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 (18) toma a forma da equação (19):

$$Si_{(j,k)} = \sqrt{\frac{1}{2.t} \cdot \sum_{j=1}^t (y_{j1} - y_{j2})^2} \quad (19)$$

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 predefinidas, sobre:

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

A estimativa da precisão intermediária $Si ()$, neste caso, é dada pela equação (20):

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

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 parênteses (Ex: $Si (T.O)$ significa tempo e operadores diferentes). Esse 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;

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

O desvio padrão da precisão intermediária é a dispersão mais realista do método, podendo ser usado para cálculo de incerteza de medição.



Nota - É uma boa prática metrológica avaliar se alguma condição testada influencia significativamente o valor do desvio padrão da precisão intermediária. Para avaliar se os grupos testados (ex: analistas diferentes) são considerados estatisticamente semelhantes, os resultados dos estudos efetuados sob condições variadas podem ser comparados pelos testes F e *t* ou pela ANOVA.

10.2.6.3 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.

10.2.6.3.1 Critérios de aceitação para reprodutibilidade

É importante que os laboratórios estabeleçam critérios de aceitação para o desvio padrão relativo obtido sob condições de reprodutibilidade, de preferência seguindo as orientações normativas da legislação aplicável às áreas de atividades, como, por exemplo, meio ambiente. Normalmente, os critérios estão atrelados ao nível de concentração. Na Tabela 7 temos, como exemplo, os critérios sugeridos pela AOAC.

Tabela 7 - Critério de aceitação para reprodutibilidade

Analito, %	Fração Mássica (C)	Unidade	DPR predito, %
100	1	100%	2
10	10 ⁻¹	10%	3
1	10 ⁻²	1%	4
0,1	10 ⁻³	0,1%	6
0,01	10 ⁻⁴	100 ppm (mg/kg)	8
0,001	10 ⁻⁵	10 ppm (mg/kg)	11
0,0001	10 ⁻⁶	1 ppm (mg/kg)	16
0,00001	10 ⁻⁷	100 ppb (µg/kg)	22
0,000001	10 ⁻⁸	10 ppb (µg/kg)	32
0,0000001	10 ⁻⁹	1 ppb (µg/kg)	45

Fonte: AOAC, 2016

Uma boa prática é avaliar se o desvio padrão experimental da reprodutibilidade está compatível com o desvio padrão predito pela equação de Horwitz, modificada por Thompson, que é baseada na concentração *c* do analito:

$$\text{- para } c > 0,138 \quad \Rightarrow \sigma = 0,01 c^{0,5} \quad (21)$$

$$\text{- para } 1,2 \times 10^{-7} \leq c \leq 0,138 \quad \Rightarrow \sigma = 0,02 c^{0,8495} \quad (22)$$

$$\text{- para } c < 1,2 \times 10^{-7} \quad \Rightarrow \sigma = 0,02 c \quad (23)$$

A Tabela 8 apresenta um resumo da determinação da repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.



Tabela 8 - Repetibilidade, Precisão Intermediária e Reprodutibilidade

Analisar: Padrões, materiais de referência ou amostras fortificadas a 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 (repetibilidade)	≥ 6	Determinar o desvio padrão amostral (s) de cada concentração	Determinar o desvio padrão amostral da repetibilidade de cada concentração.
b) Analistas e equipamentos diferentes, mesmo laboratório, período estendido (precisão intermediária)	≥ 6	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)	≥ 6	Determinar o desvio padrão amostral (s) de cada concentração	Determinar o desvio padrão da reprodutibilidade interlaboratorial de cada concentração. Requer estudo colaborativo

Fonte: Eurachem, 2014

O Laboratório deve realizar o maior número de repetições técnica e economicamente viáveis, pois se o número de repetições for reduzido, as conclusões, para uma determinada confiabilidade, podem não ter utilidade prática ou o erro maior que o admissível.

10.2.6.4 Limites de precisão

A partir do desvio padrão s é útil calcular os limites de precisão. Isso permitirá ao analista decidir quando há uma diferença significativa, a um determinado nível de confiança, entre os resultados de análises duplicadas de uma amostra obtida sob condições especificadas. O limite de repetibilidade (r) é calculado conforme a equação (24):

$$r = t_{(n-1, 1-\alpha)} \sqrt{2} \cdot s_r \quad (24)$$

Onde o fator $\sqrt{2}$ reflete a diferença entre 2 medições, t é o valor da abscissa da distribuição t (Student) bilateral para determinado número de graus de liberdade (relacionados à estimativa do s_r) e nível de confiança. Para graus de liberdade relativamente altos, t é aproximadamente igual a 2 para 95,35% de confiança; assim, o limite de repetibilidade é frequentemente aproximado como:

$$r = 2,8 \cdot s_r \quad (25)$$

O limite de precisão intermediária e limite de reprodutibilidade (R) são calculados de maneira similar, substituindo s_r por s_I e s_R , respectivamente (Eurachem, 2014).

10.2.6.5 Avaliação da aceitabilidade das características de precisão de um método de análise

No caso de não haver métodos com os quais possam ser comparadas as características de precisão, então, valores teóricos de repetibilidade e reprodutibilidade podem ser calculados a partir da equação de *Horwitz*. A forma mais adequada é o uso dos valores da *HORRAT* (**HOR**witz **RAT**io) para avaliar a aceitabilidade das características de precisão de um método.



O valor de *HORRAT* é dado por:

$$\frac{DPR_{(R)} \text{ derivado do estudo colaborativo}}{DPR_{(R)} \text{ previsto da equação de Horwitz}} \quad (26)$$

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

10.2.6.5.1 Interpretação

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

10.2.6.5.2 Cálculo do valor de *Horwitz*

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

$$DPR_R = 2^{(1 - 0,5 \log C)} \quad (27)$$

E que este valor independe da matriz/analito. Os principais valores estão na Tabela 9:

Tabela 9 - Valores de Horwitz

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

10.2.7 Robustez

A robustez de um método analítico é a capacidade do método em não ser afetado por pequenas variações nos parâmetros de execução do método. A robustez fornece uma indicação da confiança do método durante uma aplicação rotineira (Eurachem, 2014).

A robustez é um parâmetro opcional dentro dos estudos de validação, muitas vezes estando mais associado a estudos de otimização. Para determinar a robustez de um método de ensaio, pode-se recorrer ao planejamento de *Youden* (2002/657/EC) ou de *Plackett-Burman* (Sergent, 2007), por exemplo. Trata-se de um estudo 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 a sua precisão.



10.2.8 Comparações Interlaboratoriais

A norma ABNT NBR ISO/IEC 17043 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, são utilizadas ferramentas estatísticas, como, por exemplo, o escore z.

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. A NIT-Dicla-026 estabelece os requisitos para a participação de laboratórios acreditados em ensaios de proficiência.

10.2.8.1 Escore z (z-score)

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

$$z = \frac{(X_{lab} - X_v)}{s} \quad (28)$$

Onde:

X_{lab} : valor obtido pelo laboratório;

X_v : valor admitido como verdadeiro;

s: desvio padrão do ensaio de proficiência.

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

- $|z| \leq 2 \Rightarrow$ resultado satisfatório;
- $2 < |z| < 3 \Rightarrow$ resultado questionável;
- $|z| \geq 3 \Rightarrow$ resultado insatisfatório.

10.2.9 Acompanhamento do desempenho do método validado

Após validado o método, é preciso implantar procedimentos de controle de qualidade para acompanhar o desempenho do método na rotina laboratorial. Dentre os procedimentos que podem ser utilizados, estão o uso de materiais de referência certificados (MRC), materiais de referência secundários, participação em comparações interlaboratoriais, realização de ensaios replicados, reensaio de itens retidos entre outros (ABNT NBR ISO/IEC 17025, item 7.7).

Nota 1 - É importante que esses controles contemplem os principais parâmetros da validação, como recuperação/tendência, precisão e limites de detecção/quantificação.

Nota 2 - Os controles de qualidade podem ser acompanhados ao longo do tempo por meio de gráficos de controle, se pertinente.



10.2.10 Revalidação do método

10.2.10.1 Alteração no desempenho do método

O método validado deverá ser acompanhado na rotina laboratorial por meio de procedimentos de controles de qualidade, conforme estabelecido no item 7.7 da norma ABNT NBR ISO/IEC 17025. Se esses controles demonstrarem uma perda de desempenho do método, e se as ações corretivas aplicadas não forem suficientes para manter o desempenho esperado, o método deverá ser revalidado de forma a se conhecer seu novo desempenho.

10.2.10.2 Alteração no procedimento analítico do método

Quando forem efetuadas alterações no procedimento analítico, o laboratório deve fazer uma avaliação estatística para saber se a alteração causa impacto no resultado do ensaio. Essas diferenças podem ser avaliadas, por exemplo, por meio dos testes F e t , comparando-se com o método original. Caso as alterações sejam significativas, o método deverá ser revalidado. A extensão dessa validação deverá ser estabelecida conforme o impacto causado pela alteração, avaliando-se no mínimo os parâmetros recuperação/tendência, precisão e limites de detecção/quantificação.

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 modo 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 modo que o método possa ser implementado de maneira clara e sem ambiguidades. 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 seja esquecido, que as informações a serem incluídas no procedimento sejam fornecidas sempre na mesma ordem e que qualquer assunto desejado possa ser encontrado rapidamente.



ANEXO A – RELAÇÃO DOS PARTICIPANTES NA ELABORAÇÃO DESTE DOCUMENTO

De forma a auxiliar os 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, a seguir 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 / CTAA; **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; **Ilse 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 Biominerais Ltda.; **Akie Kawakami Ávila** - Fundação BIO RIO; **Eliane Cristina Pires do Rego** – INMETRO / DQUIM; **Ilse 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.

Membros do Grupo Técnico responsável pela revisão 05: Eliane Cristina Pires do Rego (Coordenadora do trabalho) – INMETRO / Dquim; Alice Sakuma (vice-coordenadora do trabalho) - IAL; Akie Kawakami Ávila - Fundação BIO RIO; Carlos Henrique Brasil Bizarri - Coca-cola; Elcio Cruz de Oliveira - Transpetro / PETROBRAS; Felipe Del Castillo – Evagon; Ilse Maria Guilhermino Lemos - Especialista em Química do Petróleo; Lina Yamachita Oliveras - CIENTEC/RS; Luzia Cristina Valente Rodrigues - LAMIM / CPRM; Paula Fernandes de Aguiar - IQ / UFRJ; Paulo Afonso Lopes da Silva - Ph. D, Estatístico; Patrícia Ritter Martins - CENPES / PETROBRAS; Thiago de Oliveira Araújo - INMETRO / Dquim; Margareth Westin Duarte de Azevedo – Especialista em Química; Alfredo G. H. Rodrigues de Oliveira – Especialista na área ambiental; Elsa Fuchshuber Rodrigues de Oliveira - Especialista em ensaios biológicos; Marise Tenório Wanderley Hübner – INCQS; Patricia Weigert de Camargo – INMETRO / Dicla.