



**Consulta Pública nº 129, de 12 de fevereiro de 2016**  
**D.O.U de 15/02/2016**

A **Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, no uso das atribuições que lhe confere os incisos III e IV, do art. 15 da Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999, bem como o disposto no inciso III e nos §§ 1º, 3º e 4º do art. 53 do Regimento Interno aprovado nos termos do Anexo I da Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 61 da Anvisa, de 3 de fevereiro de 2016, publicada no DOU de 5 de fevereiro de 2016, tendo em vista o disposto nos incisos III, do art. 2º, III e IV, do art. 7º da Lei nº 9.782, de 1999, o art. 35 do Decreto nº 3.029, de 16 de abril de 1999, o Programa de Melhoria do Processo de Regulamentação da Agência, instituído por meio da Portaria nº 422, de 16 de abril de 2008, resolve submeter à consulta pública, para comentários e sugestões do público em geral, proposta de ato normativo em Anexo, conforme deliberado em reunião realizada em 19 e 20 de novembro de 2015, e eu, Diretor-Presidente Substituto, determino a sua publicação.

Art. 1º Fica estabelecido o prazo de 60 (sessenta) dias para envio de comentários e sugestões ao texto da proposta de RDC que dispõe sobre a validação de métodos analíticos de ensaios biológicos, microbiológicos, imunológicos, de identificação, quantitativos para a determinação de impurezas, ensaios limite para o controle de impurezas, ensaios quantitativos para a determinação de insumos farmacêuticos em amostras de matérias-primas ou de medicamentos em todas as suas fases de produção, conforme Anexo.

Parágrafo único. O prazo de que trata este artigo terá início 7 (sete) dias após a data de publicação desta Consulta Pública no Diário Oficial da União.

Art. 2º A proposta de ato normativo estará disponível na íntegra no portal da Anvisa na internet e as sugestões deverão ser enviadas eletronicamente por meio do preenchimento de formulário específico, disponível no endereço: [http://formsus.datasus.gov.br/site/formulario.php?id\\_aplicacao=23639](http://formsus.datasus.gov.br/site/formulario.php?id_aplicacao=23639).

§1º As contribuições recebidas são consideradas públicas e estarão disponíveis a qualquer interessado por meio de ferramentas contidas no formulário eletrônico, no menu "resultado", inclusive durante o processo de consulta.

§2º Ao término do preenchimento do formulário eletrônico será disponibilizado ao interessado número de protocolo do registro de sua participação, sendo dispensado o envio postal ou protocolo presencial de documentos em meio físico junto à Agência.

§3º Em caso de limitação de acesso do cidadão a recursos informatizados será permitido o envio e recebimento de sugestões por escrito, em meio físico, durante o prazo de consulta, para o seguinte endereço: Agência Nacional de Vigilância Sanitária/ Gerência-Geral de Medicamentos, SIA trecho 5, Área Especial 57, Brasília-DF, CEP 71.205-050.

§4º Excepcionalmente, contribuições internacionais poderão ser encaminhadas em meio físico, para o seguinte endereço: Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Assessoria de Assuntos Internacionais (AINTE), SIA trecho 5, Área Especial 57, Brasília-DF, CEP 71.205-050.

Art. 3º Findo o prazo estipulado no art. 1º, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária promoverá a análise das contribuições e, ao final, publicará o resultado da consulta pública no portal da Agência.

Parágrafo único. A Agência poderá, conforme necessidade e razões de conveniência e oportunidade, articular-se com órgãos e entidades envolvidos com o assunto, bem como aqueles que tenham manifestado interesse na matéria, para subsidiar posteriores discussões técnicas e a deliberação final da Diretoria Colegiada.

*IVO BUCARESKY*

## PROPOSTA EM CONSULTA PÚBLICA

Processo nº: 25351.196952/2011-01

Assunto: Proposta de RDC que dispõe sobre a validação de métodos analíticos de ensaios biológicos, microbiológicos, imunológicos, de identificação, quantitativos para a determinação de impurezas, ensaios limite para o controle de impurezas, ensaios quantitativos para a determinação de insumos farmacêuticos em amostras de matérias-primas ou de medicamentos em todas as suas fases de produção.

Agenda Regulatória 2015-2016: Tema nº 34.9

Regime de Tramitação: Comum

Área responsável: Gerência-Geral de Medicamentos - GGMed

Relator: José Carlos Magalhães da Silva Moutinho

### RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº. XX, DE XX DE XXXX DE 2015

Dispõe sobre a validação de métodos analíticos de ensaios biológicos, microbiológicos, imunológicos, de identificação, quantitativos para a determinação de impurezas, ensaios limite para o controle de impurezas, ensaios quantitativos para a determinação de insumos farmacêuticos em amostras de matérias-primas ou de medicamentos em todas as suas fases de produção, e dá outras providências.

A **Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, no uso das atribuições que lhe confere os incisos III e IV, do art. 15 da Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999, bem como o disposto no inciso III e nos §§ 1º, 3º e 4º do art. 58º do Regimento Interno aprovado nos termos do Anexo I da Resolução RDC nº 29 da Anvisa, de 21 de julho de 2015, publicada no DOU de 23 de julho de 2015, tendo em vista o disposto nos incisos III, do art. 2º, III e IV, do art. 7º da Lei nº 9.782, de 1999, o art. 35 do Decreto nº 3.029, de 16 de abril de 1999, o Programa de Melhoria do Processo de Regulamentação da Agência, instituído por meio da Portaria nº 422, de 16 de abril de 2008, resolve submeter à consulta pública, para comentários e sugestões do público em geral, proposta de ato normativo em Anexo, conforme deliberado em reunião realizada em xx de xxxxx de 2015, e eu, Diretor-Presidente, determino a sua publicação.

#### CAPÍTULO I DAS DISPOSIÇÕES INICIAIS

##### Seção I Objetivo

Art.1º Este Regulamento possui o objetivo de estabelecer critérios mínimos para a validação de métodos analíticos.

##### Seção II Abrangência

Art.2º Este Regulamento se aplica a ensaios analíticos: biológicos, microbiológicos, imunológicos, de identificação, quantitativos para a determinação de impurezas, ensaios limite para o controle de impurezas, ensaios quantitativos para a determinação de insumos farmacêuticos em amostras de matérias-primas ou de medicamentos em todas as suas fases de produção.

##### Seção III Definições

Art.3º Para efeitos desta Resolução, são adotadas as seguintes definições:

I - adequabilidade de sistema (system suitability): ensaios aplicados com a finalidade de demonstrar que equipamentos, instalações, operações analíticas e amostras a serem analisadas constituem um sistema integrado e podem ser avaliados como tal, cujos parâmetros devem ser definidos durante a validação do método analítico;

- II - amostra: quantidade de produto terminado ou de insumo farmacêutico ativo, devidamente identificada, dentro do prazo de validade estabelecido;
- III - analito: substância de interesse que se pretende identificar ou mensurar;
- IV - caracterização de substância química: é o conjunto de ensaios que garante inequivocamente a autenticidade e qualidade da substância química caracterizada, no que se refere a sua identidade, qualidade, pureza, teor e potência, devendo incluir dados obtidos a partir de técnicas aplicáveis à caracterização de cada substância química como termogravimetria, ponto de fusão, calorimetria exploratória diferencial, espectrometria no infravermelho, espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear, análise elementar (carbono/hidrogênio/nitrogênio), difração de raio X, rotação óptica, métodos cromatográficos, entre outras;
- V - comparação de métodos: consiste na comparação entre os resultados obtidos a partir de um método de desenvolvimento interno e um método de referência;
- VI - corrida analítica: conjunto de medições efetuadas em um grupo de amostras em intervalo de tempo pré-determinado, sob as mesmas condições de repetitividade, tais como método, analista, instrumentação, local e condições de utilização;
- VII - efeito matriz: efeito dos componentes da matriz na resposta do analito;
- VIII - ensaio: operação técnica que consiste na determinação de uma ou mais características de um dado produto ou processo, de acordo com um procedimento especificado;
- IX - ensaio limite: ensaios que permitem verificar se a quantidade do analito está acima ou abaixo de um nível previamente estabelecido, sem quantificá-lo com exatidão;
- X - ensaios microbiológicos: são procedimentos que envolvem detecção, quantificação e pesquisa de micro-organismos específicos nas amostras analisadas;
- XI - impurezas: qualquer componente presente no insumo farmacêutico ou no produto terminado que não seja o insumo farmacêutico ativo nem o(s) excipiente(s) (Resolução-RDC nº 58, de 20 de dezembro de 2013);
- XII - insumo farmacêutico ativo (IFA): qualquer substância introduzida na formulação de uma forma farmacêutica que, quando administrada em um paciente, atua como ingrediente ativo. Tais substâncias podem exercer atividade farmacológica ou outro efeito direto no diagnóstico, cura, tratamento ou prevenção de uma doença, podendo ainda afetar a estrutura e funcionamento do organismo humano;
- XIII - matriz complexa: IFA ou produto terminado constituído de analito e de substâncias não monitoradas inerentes à matriz, provenientes da síntese ou extração do IFA, de excipientes ou de impurezas.
- XIV - placebo: formulação do medicamento sem o insumo farmacêutico ativo em análise;
- XV - produtos de degradação: impurezas resultantes de alterações químicas que surgem durante a fabricação ou armazenamento do medicamento (Resolução-RDC nº 58, de 20 de dezembro de 2013);
- XVI - protocolo de validação: documento que descreve as atividades a serem realizadas na validação, incluindo o cronograma, as responsabilidades e os critérios de aceitação para a aprovação de um método analítico;
- XVII - pureza cromatográfica do pico do insumo farmacêutico ativo: comprovação de que não há interferência de excipientes, impurezas e produtos de degradação no pico cromatográfico do insumo farmacêutico ativo (Resolução-RDC nº 58, de 20 de dezembro de 2013);
- XVIII - relatório de validação: documento no qual os registros, resultados e avaliação de um programa de validação são consolidados e sumarizados;
- XIX - reprodutibilidade: expressa a precisão entre laboratórios (estudos colaborativos usualmente utilizados para padronização de metodologia);

XX - revalidação de método analítico: repetição parcial ou total da validação de um método analítico para assegurar que esse continua cumprindo com os requisitos estabelecidos;

XXI - seletividade: refere-se à capacidade do método em avaliar, de forma inequívoca, a resposta produzida por um determinado analito na presença de outros componentes de comportamento similar presentes na amostra, potencialmente relacionados ao fármaco, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz;

XXII - substância química de referência (SQR) / material de referência: substância ou mistura de substâncias químicas com alto grau de pureza e uniformidade, cuidadosamente caracterizada para assegurar sua identidade, qualidade, pureza, teor e potência, incluindo-se substância química de referência caracterizada e substância química de referência farmacopeica;

XXIII - substância química de referência caracterizada (SQC): substância ou mistura de substâncias químicas não estabelecidas por compêndios oficiais, em que a identidade, a qualidade, a pureza, o teor e a potência tenham sido assegurados por um processo de caracterização;

XXIV - substância química de referência farmacopeica (SQF): substância ou mistura de substâncias químicas estabelecida e distribuída por compêndios oficiais, em que a identidade, a qualidade, a pureza, o teor e a potência tenham sido assegurados por um processo de caracterização;

XXV - substância química de trabalho (SQT): substância ou mistura de substâncias químicas utilizada na rotina laboratorial, padronizada a partir de uma substância química de referência farmacopeica ou, na ausência dessa, a partir de uma substância química de referência caracterizada, sendo rastreável à SQR utilizada para a sua padronização;

XXVI - validação analítica: é a avaliação sistemática de um procedimento por meio de estudos experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos;

XXVII - validação parcial: demonstração, por meio de alguns parâmetros de validação, que o método analítico, nas condições em que é praticado, tem as características necessárias para obtenção de resultados com a qualidade exigida; e

XXVIII - verificação de sistema: procedimento que, quando aplicável, deve ser realizado previamente a uma corrida analítica para demonstrar que o sistema está apto para o uso pretendido, sendo que os parâmetros desse procedimento devem ser definidos durante o desenvolvimento e validação do método.

## **CAPÍTULO II DAS DISPOSIÇÕES GERAIS**

Art.4º A validação deve demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina, de forma documentada e mediante critérios objetivos.

Art.5º A utilização de metodologia analítica não descrita em compêndio oficial requer a realização de uma validação analítica completa, conforme parâmetros estabelecidos neste regulamento, levando-se em consideração as condições técnico-operacionais.

Art.6º Os parâmetros a serem considerados para a validação dependem do ensaio a ser realizado e estão definidos no Quadro 1 do anexo I.

Art.7º As metodologias analíticas compendiais devem ter sua adequabilidade demonstrada por meio de um estudo de validação parcial, devendo existir evidências documentadas da adequabilidade nas condições técnico-operacionais do laboratório.

Parágrafo único. A validação parcial deve avaliar, pelo menos os parâmetros de precisão, seletividade e linearidade.

Art.8º No caso de transferência de metodologia entre laboratórios, essa será considerada validada, desde que seja realizado um estudo de validação parcial.

Parágrafo único. Cópia de toda a documentação original da validação da metodologia deverá ser anexada, como prova de que a metodologia foi originalmente validada, conforme disposto em normas e regulamentos específicos aprovados/referendados pela Anvisa.

Art.9º É necessária uma revalidação de método analítico nas seguintes circunstâncias:

- I - alterações na síntese ou obtenção do insumo farmacêutico ativo;
- II - alterações na composição do produto acabado; e
- III - alterações no método analítico.

§1º Os parâmetros de validação a serem avaliados dependem da natureza das alterações.

§2º Outras alterações que possam impactar significativamente no método validado, além das dispostas nos incisos deste artigo, podem requerer parâmetros de uma revalidação de método analítico.

Art. 10. Todos os equipamentos utilizados na validação analítica devem estar calibrados e os analistas devem ser qualificados e adequadamente treinados.

Parágrafo único. É recomendada a realização da verificação de sistema anteriormente a cada corrida analítica.

Art. 11. Os documentos apresentados devem descrever os procedimentos e parâmetros analíticos e resultados com detalhamento suficiente que possibilite a sua reprodução e avaliação estatística.

Art. 12. O relatório de validação deve ser protocolado em via impressa, conforme Resoluções de registro e pós-registro de medicamentos e produtos biológicos, e em mídia eletrônica contendo planilhas em MS-Excel com os resultados dos parâmetros de validação analítica, dispostos individualmente, preferencialmente, conforme modelo disposto nos Quadros 1 a 6b do anexo II.

Art. 13. O não atendimento a qualquer requisito disposto nesta Resolução deverá ser tecnicamente justificado e será objeto de análise pela Anvisa.

### **CAPÍTULO III DAS SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DE REFERÊNCIA**

Art. 14. Deve-se utilizar Substância Química de Referência Farmacopeica (SQF) oficializada pela Farmacopeia Brasileira, preferencialmente, ou por outros compêndios oficialmente reconhecidos pela Anvisa.

Parágrafo único. No caso da indisponibilidade, devidamente comprovada da SQF no mercado, será admitido o uso de Substância Química de Referência Caracterizada (SQC), mediante a apresentação dos dados de caracterização de substância química

Art. 15. Não é admitida a utilização de SQT para fins de validação de método analítico.

### **CAPÍTULO IV DA COMPARAÇÃO DE MÉTODOS**

Art. 16. A comparação de métodos é requerida para a análise de fitoterápicos quando há necessidade de substituição de um método analítico por outro com diferente resposta analítica para a finalidade pretendida.

Art. 17. As análises devem ser efetuadas em número adequado de replicatas a fim de permitir a aplicação de um método estatístico, utilizando os dois métodos de ensaio, em separado, nas mesmas amostras, em uma faixa restrita de concentrações ou em toda faixa de concentrações em que se pretende validar o método.

Art. 18. Deve ser utilizado método estatístico adequado para a comparação dos métodos tais como: testes de hipótese ou intervalo de confiança.

Parágrafo único. Nos casos em que o ativo é uma matriz complexa e o analito não é um componente único, e sim uma classe de substâncias, a fundamentação teórica do método estatístico deve ser apresentada.

Art. 19. Deve ser estabelecido um fator de correlação entre os métodos, sendo que a reprodutibilidade desse fator para diferentes lotes deve ser demonstrada.

## **CAPÍTULO V DOS PARÂMETROS DA VALIDAÇÃO ANALÍTICA**

### **Seção I Da Seletividade**

Art. 20. A seletividade do método analítico deve ser demonstrada por meio da capacidade de identificar ou mensurar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas e componentes da matriz.

Parágrafo único. No caso de métodos cromatográficos, devem ser tomadas as precauções necessárias para garantir a pureza de cada pico, demonstrando que esse é atribuído a um só componente.

Art. 21. Nos ensaios qualitativos, deve ser demonstrada a capacidade do método em obter resultado positivo para a amostra contendo o analito e resultado negativo para o placebo.

§1º Deve ser utilizada a SQR na comparação com a resposta obtida para o analito nos termos do Capítulo III.

§2º Para demonstrar a capacidade de seleção do método, pode ser necessária a aplicação do teste a compostos estruturalmente semelhantes ao analito, passíveis de estarem presentes na amostra, sendo o critério de aceitação a obtenção de resultado negativo.

§3º No caso de ensaios de identificação, pode ser necessária a combinação de dois ou mais procedimentos analíticos para atingir o nível necessário de discriminação.

Art. 22. As determinações do analito de interesse no produto terminado devem discriminar o sinal do analito, ao comparar as seguintes respostas analíticas:

- I - do diluente;
- II - do placebo;
- III - da SQR do analito;
- IV - do produto terminado;
- V - do placebo + SQR do analito; e
- VI - do placebo + SQR do analito + impurezas + produtos de degradação + compostos estruturalmente semelhantes.

§1º Nos casos em que amostras de todos os componentes do medicamento não estão disponíveis para a preparação do placebo, aceita-se que a determinação da seletividade possa ser realizada a partir do método de adição de padrão, no qual devem ser adicionadas quantidades conhecidas da SQR do analito ao medicamento.

§2º Nos casos em que o ativo é uma matriz complexa e não há disponibilidade da matriz isenta de analito, a determinação do inciso V deve ser realizada pelo método de adição de padrão.

§3º Para as amostras constituídas por matrizes complexas, caso se pretenda trabalhar com uma curva de calibração do analito em solvente (não matrizada), as possíveis interferências das substâncias que compõem a matriz na resposta instrumental devem ser investigadas, conforme descrito na Seção III deste capítulo.

§4º Quando o padrão do produto de degradação não estiver disponível ou for desconhecido, deve-se utilizar, em substituição, amostras submetidas a condições de estresse conforme preconizado em legislação específica vigente.

Art. 23. As determinações do analito de interesse na matéria-prima devem considerar as seguintes respostas:

- I - do diluente;
- II - da SQR do analito;
- III - do insumo farmacêutico ativo (IFA); e
- IV - da SQR do analito + produtos de degradação + impurezas + compostos estruturalmente semelhantes.

§1º Nos casos em que o IFA é uma matriz complexa e não há disponibilidade da matriz isenta de analito, a determinação deve incluir a adição de quantidades conhecidas da SQR ao IFA em solução a 50% (cinquenta por cento), para obter a concentração teórica de 100% (cem por cento).

§2º Quando o padrão do produto de degradação não estiver disponível ou for desconhecido, deve-se utilizar, em substituição, amostras submetidas a condições de estresse, conforme preconizado em resolução específica.

## **Seção II Da Linearidade**

Art. 24. A linearidade de um procedimento analítico é a sua capacidade de obter resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra.

Art. 25. Uma relação linear deve ser avaliada em toda a faixa estabelecida para o procedimento analítico.

Art. 26. Para o estabelecimento da linearidade deve-se utilizar no mínimo 5 (cinco) concentrações diferentes para as soluções em, no mínimo triplicata, conforme o caso em estudo.

Art. 27. Todos os cálculos para a avaliação da linearidade devem ser realizados a partir dos dados individuais de concentrações reais, ou seja, de cada valor medido (réplica), devendo atender aos critérios descritos no anexo III desta Resolução.

Art. 28. Para avaliação da linearidade deverão ser apresentados:

- I - gráfico de dispersão dos dados, com a finalidade de comprovação visual da linearidade;
- II - avaliação da associação linear entre as variáveis (coeficiente de correlação de Person);
  - a) o valor mínimo aceito para o coeficiente de correlação de Pearson é 0,990.
- III - Método dos Mínimos Quadrados para estimar a reta de Regressão de Y em X;
- IV - avaliação da igualdade de variâncias (Teste de Cochran);
- V - Método dos Mínimos Quadrados Ponderados deve ser utilizado nos casos que o teste de Cochran conclua que as variâncias são heterocedásticas;
- VI - análise de variância:
  - a) utilizar a ANOVA de Mínimos Quadrados Ordinários quando o modelo for ajustado pelo Método de Mínimos Quadrados Ordinários ou utilizar a ANOVA de Mínimos Quadrados Ponderados quando o modelo for ajustado pelo Método de Mínimos Quadrados Ponderados.

VII - Teste F para avaliar a significância do coeficiente angular:

- a) utilizar o teste F com a tabela ANOVA de mínimos quadrados ordinários quando o modelo foi ajustado pelo Método de Mínimos Quadrados Ordinários ou utilizar o teste F com a tabela ANOVA de mínimos quadrados ponderados quando o modelo foi ajustado pelo método de Mínimos Quadrados Ponderados.

VIII - cálculo do Coeficiente de Determinação:

- a) utilizar a fórmula do coeficiente de determinação para o Modelo de Mínimos Quadrados Ordinários ou do Modelo de Mínimos Quadrados Ponderados, conforme o modelo ajustado;
- b) o coeficiente de determinação deve ser igual ou superior a 0,980; e
- c) para os Mínimos Quadrados Ponderados também faz-se necessário que o coeficiente de correlação ponderado,  $r_{w,r}$ , seja maior ou igual a 0,990.

IX - análise de resíduos.

Parágrafo único. Nos testes estatísticos deverá ser utilizado um nível de significância de 5% (cinco por cento).

Art. 29. Caso seja feita a opção pela utilização de apenas uma concentração de calibração na rotina de análise, durante a validação, os resultados obtidos dessa maneira devem ser comparados àqueles obtidos a partir da curva de calibração para as mesmas soluções.

§1º Caso os resultados não sejam semelhantes, deve ser utilizada, na rotina, a curva de calibração.

§2º Para avaliar a semelhança dos resultados deverá ser utilizado o mesmo critério de aceitação do parâmetro exatidão.

### **Seção III Do Efeito Matriz**

Art. 30. O efeito matriz deve ser determinado por meio da comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas com a SQR do analito em solvente e com a amostra fortificada com a SQR do analito.

Parágrafo único. As curvas devem ser estabelecidas para os mesmos níveis de concentração, utilizando no mínimo, 5 (cinco) concentrações diferentes em, no mínimo, triplicata.

Art. 31. O paralelismo das retas é indicativo de ausência de interferência dos constituintes da matriz e a sua demonstração deverá ser realizada conforme disposto no anexo IV.

Parágrafo único. Deve ser adotado o nível de significância de 5% (cinco por cento) no teste de hipóteses.

### **Seção IV Do Intervalo**

Art. 32. O intervalo, normalmente, é derivado dos estudos de linearidade e depende da aplicação pretendida.

Art. 33. O intervalo deve ser estabelecido para a confirmação de que o procedimento analítico possui aceitáveis graus de linearidade, de precisão e de exatidão quando aplicado a amostras contendo quantidade de analito abrangida dentro ou nos extremos do intervalo estabelecido para o procedimento analítico.

Art. 34. Devem ser considerados, no mínimo, os seguintes intervalos:

I - para teor da substância ativa na matéria-prima ou no produto terminado: normalmente de 80% (oitenta por cento) a 120% (cento e vinte por cento);

II - para uniformidade de conteúdo: normalmente, de 70% (setenta por cento) a 130% (cento e trinta por cento) da concentração testada;

III - para teste de dissolução: o intervalo deve ser estabelecido de -20% (menos vinte por cento) da menor concentração esperada a +20% (mais vinte por cento) da maior concentração esperada a partir do perfil de dissolução; e

IV - para determinação de impurezas: o intervalo deve ser estabelecido do limite de quantificação até 120% (cento e vinte por cento) da concentração no limite da especificação de cada impureza individual.

## **Seção V Da Precisão**

Art. 35. A precisão deve avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado.

Art. 36. A precisão deve ser expressa por meio da repetitividade, da precisão intermediária e da reprodutibilidade.

Art. 37. Nos ensaios quantitativos, a precisão deve ser demonstrada por meio da dispersão dos resultados, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) da série de medições, também conhecido como coeficiente de variação, conforme a fórmula " $DPR=(DP/CMD)\times 100$ ", em que DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

Art. 38. As amostras para avaliação da precisão devem ser preparadas de maneira independente desde o início do procedimento descrito no método.

§1º A utilização de soluções diluídas de uma mesma solução mãe não é aceita.

§2º Quando a avaliação da precisão envolver contaminação de IFA, medicamento ou placebo com substância em quantidade muito baixa, que impossibilite a pesagem direta, poderá ser utilizada uma solução concentrada dessa substância, seguindo-se então o procedimento descrito no método analítico da empresa para extração e diluição da amostra.

§3º No caso de impurezas conhecidas, a amostra deverá ser fortificada com concentrações conhecidas do padrão de impurezas.

§4º No caso de impurezas desconhecidas, a amostra poderá ser avaliada comparando-se a resposta do ativo no limite máximo da especificação estabelecida para a impureza, desde que se considere o mesmo fator resposta para impureza e para o ativo.

Art. 39. A determinação da repetitividade deve obedecer aos seguintes critérios:

I - as amostras devem ser avaliadas sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação dentro de um curto intervalo de tempo, em uma única corrida analítica; e

II - utilizar, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas individualmente preparadas.

§1º Alternativamente, a avaliação pode ser realizada utilizando, no mínimo, 6 (seis) determinações a 100% (cem por cento) da concentração do teste individualmente preparadas.

§2º Em condições de repetitividade, o coeficiente de variação deve tipicamente situar-se abaixo de dois terços dos valores apresentados no Quadro 1 do anexo V, conforme a concentração.

Art. 40. A determinação da precisão intermediária deve obedecer aos seguintes critérios:

- I - expressar a proximidade entre os resultados obtidos da análise de uma mesma amostra, no mesmo laboratório, em pelo menos dois dias diferentes, realizada por operadores distintos;
- II - essa avaliação deve contemplar as mesmas concentrações e número de determinações descritas na avaliação da repetitividade; e
- III - para demonstração da precisão intermediária deve ser utilizado o teste t de student.

Art. 41. A reprodutibilidade expressa a proximidade dos resultados obtidos em laboratórios diferentes.

§1º A reprodutibilidade é aplicável em estudos colaborativos ou na padronização de metodologias analíticas para inclusão dessas em compêndios oficiais, mediante testes estatísticos adequados.

§2º Em condições de reprodutibilidade intralaboratorial, o coeficiente de variação intralaboratorial da média não deve exceder aos valores especificados no Quadro 1 do anexo V.

Art. 42. O valor máximo aceitável para a precisão deve ser definido de acordo com a concentração do analito na amostra conforme Quadro 1 do anexo V.

Parágrafo único. Os critérios contemplados no Quadro 1 do anexo V devem ser atendidos em cada nível de concentração.

Art. 43. Considerando-se a especificação adotada para o produto objeto de avaliação bem como a concentração do analito na amostra, pode ser necessária a utilização de número de replicatas superior àqueles descritos no inciso II do Art. 39.

Parágrafo único. Caso necessário, a avaliação do número de replicatas deve ser realizada por meio da fórmula:

$$N = \frac{(\text{DPR máximo aceitável (\%)} \times Z)^2}{(100-LA)^2}$$

Em que "N" é o número mínimo de replicatas, "LA" é o limite superior ou inferior da especificação adotada para o produto em análise e, "Z" é o valor tabelado da distribuição normal padrão com valor igual a 2,58.

## **Seção VI Da Exatidão**

Art. 44. A exatidão de um método analítico representa o grau de concordância entre os resultados individuais, obtidos pelo método em estudo, em relação a um valor de referência aceito como verdadeiro.

Art. 45. A exatidão deve ser determinada pela aplicação do método analítico proposto, após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do método, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada.

Art. 46. As amostras para avaliação da exatidão devem ser preparadas de maneira independente, desde o início do procedimento descrito no método.

§ 1º A utilização de soluções diluídas de uma mesma solução mãe não é aceita.

§ 2º Quando a avaliação da exatidão envolver contaminação de IFA, medicamento ou placebo com substância em quantidade muito baixa, que impossibilite a pesagem direta, poderá ser utilizado uma solução concentrada desta substância, seguindo-se então o procedimento descrito no método para extração e diluição da amostra.

Art. 47. Para a determinação da exatidão, deve ser utilizada a abordagem mais adequada, de acordo com o método analítico em estudo:

- I - para Insumo Farmacêutico Ativo (IFA):

- a) aplicar a metodologia proposta utilizando substância de pureza conhecida (SQR);
- b) comparar os resultados obtidos com aqueles resultantes de uma segunda metodologia validada, cuja exatidão tenha sido estabelecida; ou
- c) no caso de analito em matriz complexa, em que componentes individuais estejam indisponíveis, realizar análise pelo método de adição de SQR à solução da amostra a 50% (cinquenta por cento), para obter as concentrações teóricas de 80% (oitenta por cento), 100% (cem por cento) e 120% (cento e vinte por cento).

II - para produto terminado:

- a) aplicar a metodologia proposta na análise de uma amostra, na qual quantidade conhecida de SQR foi adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado);
- b) na indisponibilidade de amostras de todos os componentes do medicamento, pode ser realizada a análise pelo método de adição de SQR, no qual quantidades conhecidas de SQR são acrescentadas à solução do produto terminado a 50% (cinquenta por cento), para obter as concentrações teóricas de 80% (oitenta por cento), 100% (cem por cento) e 120% (cento e vinte por cento); ou
- c) comparar os resultados obtidos com aqueles resultantes de uma segunda metodologia validada.

III - para impurezas:

- a) aplicar o método de adição de padrão, no qual quantidades conhecidas de impurezas ou produtos de degradação são acrescentadas ao medicamento ou ao IFA; e
- b) na indisponibilidade de amostras de certas impurezas ou produtos de degradação, pode ser realizada a comparação dos resultados obtidos com um segundo método validado e a utilização do fator resposta do IFA.

Parágrafo único. Em ambos os casos, deve ser especificada a forma de cálculo das impurezas individuais e totais, por percentual de área ou peso, em relação ao analito de interesse.

Art. 48. A exatidão deve ser expressa pela relação percentual de recuperação do analito de concentração conhecida adicionado à amostra ou pela relação entre a concentração média, determinada experimentalmente, e a concentração teórica correspondente, acrescida dos intervalos de confiança, dada pela fórmula abaixo:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

ou

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{CA (amostra adicionada)} - \text{CA (amostra)}}{\text{CTA}} \times 100$$

Em que:

CA = Concentração experimental do analito;

CTA = Concentração teórica do analito adicionado

Art. 49. Devem ser calculados os percentuais dos coeficientes de variação (% CV) para cada concentração, conforme a fórmula a seguir:

$$\% CV = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Média}} \times 100$$

Art. 50. Os percentuais de recuperação e de coeficiente de variação obtidos devem atender aos critérios estabelecidos no Quadro 2 do anexo V.

Art. 51. Considerando-se a especificação adotada para o produto objeto de avaliação bem como a concentração do analito na amostra, pode ser necessária a utilização de número de replicatas superior àqueles descritos no Art. 45.

Parágrafo único. Caso necessário, a avaliação do número de replicatas deve ser realizada por meio da fórmula:

$$N = \frac{(\text{DPR máximo aceitável (\%)} \times Z)^2}{(|100-LA|)^2}$$

Em que "N" é o número mínimo de replicatas, "LA" é o limite superior ou inferior da especificação adotada para o produto em análise e "Z" é o valor tabelado da distribuição normal padrão com valor igual a 2,58.

### **Seção VII Do Limite de Detecção**

Art. 52. Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.

Art. 53. A determinação do limite de detecção poderá ser realizada por meio de método visual, da razão sinal-ruído, baseado na determinação do branco ou em parâmetros da curva de calibração, considerando-se as particularidades do método analítico utilizado.

Art. 54. Para método visual, o limite de detecção é determinado pela análise de amostras de concentrações conhecidas, estabelecendo a menor concentração que o analito pode ser detectado.

Art. 55. Para método que apresenta ruído na linha de base, o limite de detecção pode ser determinado pela razão sinal-ruído.

§1º Os sinais de amostras de baixas concentrações conhecidas do analito são comparados com os sinais produzidos pelo branco.

§2º Uma razão sinal-ruído entre 2:1 ou 3:1 geralmente é considerada aceitável para estimativa do limite de detecção.

Art. 56. O estabelecimento do limite de detecção baseado na determinação do branco poderá ser realizado:

I - para o branco da amostra, conforme a equação a seguir:

$$LD = X + t(n - 1, 1 - \alpha) \cdot s$$

Em que: X é a média dos valores dos brancos da amostra; t é a distribuição de Student, dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança, n é o número de amostras,  $\alpha$  é o nível de significância e s é o desvio-padrão amostral dos brancos da amostra.

II - para o branco da amostra com adição da menor concentração aceitável do analito, conforme equação a seguir:

$$LD = 0 + t(n - 1, 1 - \alpha) \cdot s$$

Em que:  $t$  é a distribuição de Student, dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança e,  $n$  é o número de amostras,  $\alpha$  é o nível de significância e  $s$  é o desvio-padrão amostral dos brancos da amostra, com adição, com  $n-1$  graus de liberdade.

Parágrafo único. Essa metodologia é válida quando os valores de desvio padrão são diferentes de zero.

Art. 57. Para a determinação baseada em parâmetros da curva analítica, o limite de detecção pode ser calculado por:

$$LD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{IC}$$

Em que: IC é a inclinação da curva de calibração,  $\sigma$  é o desvio padrão e pode ser obtido de 3 formas: a) o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação; b) o desvio padrão residual da linha de regressão c) a partir da curva de calibração proveniente da análise de um apropriado número de amostras do branco.

Art. 58. Nos casos em que um valor estimado para o limite de detecção é obtido por cálculo ou extrapolação, essa estimativa deve ser confirmada por análises independentes de um número adequado de amostras preparadas com concentração próxima ou no limite de detecção.

### **Seção VIII Do Limite de Quantificação**

Art. 59. O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas.

Art. 60. Para a determinação deste parâmetro deve ser seguido o mesmo procedimento descrito na Seção VII deste Capítulo, sendo que, a razão sinal/ruído deve ser superior a 10:1.

Art. 61. Para a determinação baseada em parâmetros da curva analítica, o limite de quantificação pode ser calculado por:

$$LQ = \frac{10 \cdot \sigma}{IC}$$

Em que: IC é inclinação da curva de calibração.  $\sigma$  o desvio padrão, que pode ser obtido de 3 formas: a) o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação; b) o desvio padrão residual da linha de regressão c) a partir da curva de calibração proveniente da análise de um apropriado número de amostras do branco.

Art. 62. Nos casos em que um valor estimado para o limite de quantificação é obtido por cálculo ou extrapolação, essa estimativa deve ser confirmada por análises independentes de um número adequado de amostras preparadas com concentração próxima ou no limite de quantificação.

### **Seção IX Da Robustez**

Art. 63. A robustez indica a capacidade de um método analítico em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos.

Parágrafo único. Caso haja susceptibilidade do método a variações nas condições analíticas deliberadas, essas deverão ser controladas por meio de precauções descritas no procedimento.

Art. 64. O impacto das variações propostas deverá ser avaliado pelos resultados obtidos em relação à exatidão do método e, quando aplicável, à avaliação de características inerentes à adequabilidade do método utilizado.

Parágrafo único. Quando houver variações simultâneas o impacto dessas deve ser avaliado pelo teste de Youden ou equivalente, que permite ordenar e indicar o tipo de influência de cada uma das variações nos resultados finais.

Art. 65. Para a determinação da robustez do método devem ser avaliados, no mínimo, os parâmetros descritos na Tabela 1 do anexo VI.

Parágrafo único. A ausência da avaliação de qualquer uma das variações deve ser justificada.

## **CAPÍTULO VI DAS DISPOSIÇÕES TRANSITÓRIAS**

Art. 66. As petições de medicamentos que contenham validações do método analítico protocoladas antes da data de vigência desta Resolução, ou que já se encontram em análise, serão analisadas conforme a Resolução vigente à época do protocolo.

§1º Em caso da necessidade de execução e reapresentação de um ou mais parâmetros da validação, a empresa poderá seguir a Resolução vigente à época do protocolo.

§2º Em caso da necessidade de execução e reapresentação de uma nova validação completa, a empresa deverá seguir esta Resolução.

## **CAPÍTULO VII DAS DISPOSIÇÕES FINAIS**

Art. 67. Documentação e ensaios adicionais podem ser solicitados a qualquer momento pela Anvisa.

Art. 68. Todos os dados relevantes obtidos durante a condução da validação analítica, bem como as fórmulas utilizadas para cálculo, devem ser protocoladas, juntamente com a petição de interesse, para avaliação da Anvisa.

Art. 69. O descumprimento das disposições contidas nesta Resolução constitui infração sanitária, nos termos da Lei nº 6.437, de 20 de agosto de 1977, sem prejuízo das responsabilidades civil, administrativa e penal cabíveis.

Art. 70. Fica revogada a Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 e o anexo I da Resolução RDC nº 31, de 11 de agosto de 2010.

Art. 71. Esta Resolução entra em vigor no prazo de 90 (noventa) dias contados a partir da data de sua publicação.

JARBAS BARBOSA DA SILVA JR.

### **ANEXO I**

**Quadro 1.** Parâmetros a serem considerados na validação analítica.

Parâmetro Avaliado	Identificação	Teste de Impurezas		Teor -dissolução (quantificação) -uniformidade de conteúdo -potência
		Quantitativo	Ensaio Limite	
Exatidão	não	sim	não	sim
Precisão				
Repetitividade	não	sim	não	sim
Precisão Intermediária	não	sim <sup>(1)</sup>	não	sim <sup>(1)</sup>
Seletividade <sup>(2)</sup>	sim	sim	sim	sim

Limite de Detecção	não	não <sup>(3)</sup>	sim	não
Limite de quantificação	não	sim	não	não
Linearidade	não	sim	não	sim
Intervalo	não	sim	não	sim

<sup>(1)</sup>Nos casos em que foi conduzida a reprodutibilidade, não é necessário conduzir a precisão intermediária.

<sup>(2)</sup>Nos casos de ensaios de identificação, pode ser necessária a combinação de dois ou mais procedimentos analíticos para atingir o nível necessário de discriminação.

<sup>(3)</sup>Pode ser necessário em alguns casos.

## ANEXO II

**Quadro 1.** Dados de seletividade.

Condição	Concentração	Tempo	Resultado (%)	degradação (%)	Pureza ou ângulo	Threshold (se aplicável)
Placebo						
Padrão						
Amostra						
Ácida						
Alcalina						
Oxidante						
Calor						
Luz						
Metais						

**Quadro 2.** Dados de linearidade.

	Nível (%)	Concentração	Resposta
1			
1			
1			
2			
2			
2			
3			
3			
3			
4			
4			
4			
5			
5			
5			
6			
6			
6			
7			
7			
7			

8			
8			
8			
9			
9			
9			
10			
10			
10			

**Quadro 3a.** Dados de precisão repetitividade para 6 (seis) determinações a 100% (cem por cento). **Quadro 3b.** Dados de precisão repetitividade para 9 (nove) determinações (baixa, média e alta).

**Quadro 3a**

n°	Resultado
1	
2	
3	
4	
5	
6	
<b>Média</b>	
<b>dpr</b>	

**Quadro 3b**

n°	Resultado	Nível	Recuperação (%)
1 (baixo)			
2 (baixo)			
3 (baixo)			
4 (médio)			
5 (médio)			
6 (médio)			
7 (alto)			
8 (alto)			
9 (alto)			

**Quadro 4a.** Dados de precisão intermediária para 6 (seis) determinações a 100% (cem por cento). **Quadro 4b.** Dados de precisão intermediária para 9 (nove) determinações (baixa, média e alta).

**Quadro 4a**

n°	Resultado
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	
12	
<b>Média</b>	
<b>dpr</b>	

**Quadro 4b**

n°	Resultado	Nível	Recuperação (%)
1 (baixo)			
2 (baixo)			
3 (baixo)			
4 (médio)			
5 (médio)			
6 (médio)			
7 (alto)			
8 (alto)			
9 (alto)			

**Quadro 5.** Dados para exatidão.

	<b>Nível</b>	<b>Concentração teórica</b>	<b>Concentração obtida</b>	<b>Recuperação (%)</b>
BAIXO				
MÉDIO				
ALTO				

Quadro 6a		
Critérios de aceitação		
Parâmetro	Espec.	(%) Var
k'		
R		
TR		
N		
A		
Resultado		

Quadros 6a e 6b. Dados de robustez.

Quadro 6b												
	k'		R		TR		N		A		Resultado	
	Medido	Variação (%)	Medido	Variação (%)								
Inicial												
Estabilidade das Soluções												
Tempo de extração (+)												
Tempo de extração (-)												
pH da fase (+)												
pH da fase (-)												
Temperatura (+)												
Temperatura (-)												
Composição da fase (+)												
Composição da fase (-)												
Fluxo (+)												
Fluxo (-)												
Coluna												
Outra condição												
Outra condição												

### ANEXO III

#### LINEARIDADE

##### 1. Gráfico de dispersão dos dados

Um gráfico de dispersão dos dados, do sinal em função das concentrações do analito, deve ser apresentado previamente ao cálculo do ajuste dos pontos, com a finalidade de comprovação visual da linearidade.

1.1. Os pontos individuais sobre a curva serão referidos como  $(x_1, y_1)$ ,  $(x_2, y_2)$ ,  $(x_3, y_3)$ . . .  $(x_i, y_i)$ . . .  $(x_n, y_n)$ , onde  $n$  representa o número total de pontos.

1.2. A média aritmética dos valores de  $x$  é, chamada de  $\bar{x}$  e a média aritmética dos valores de  $y$  é  $\bar{y}$ . A posição  $(\bar{x}; \bar{y})$  é denominada centroide de todos os pontos.

## 2. Avaliação linear entre as variáveis (coeficiente de correlação de Person)

2.1. O coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) deve ser apresentado, com o objetivo de avaliar uma associação linear entre as variáveis, e calculado conforme abaixo:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\{[\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2][\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2]\}^{1/2}} \quad (1)$$

2.2. O valor mínimo aceito para o coeficiente de correlação de Pearson é 0,990.

2.3. Os resultados para os coeficientes de correlação deverão ser arredondados considerando três casas decimais.

2.4. Uma vez identificada, por meio do gráfico de dispersão e do coeficiente de correlação, uma associação linear entre as concentrações do analito ( $x$ ) e o sinal ( $y$ ), deve-se assumir que a curva de calibração é uma reta da forma:

$$y = a + bx \quad (2)$$

Em que:  $a$  é o intercepto com o eixo  $y$  e  $b$  é o coeficiente angular ou inclinação da reta.

2.5. Os resultados devem ser estimados e avaliados pelo método dos mínimos quadrados.

## 3. Método dos Mínimos Quadrados para estimar a reta de Regressão de Y em X

3.1. Após a avaliação por meio do gráfico de dispersão e da associação linear entre as variáveis,  $r \geq 0,990$ , supõe-se que existe uma relação linear entre o sinal analítico ( $y$ ) e a concentração ( $x$ ).

3.2. Ao se buscar o cálculo da “melhor” reta através dos pontos da curva de calibração, deve-se ter a devida atenção ao fato de que cada um dos pontos está sujeito a erro experimental. Diante dos referidos erros, deve-se assumir que estes estão na variável resposta –  $y$ .

3.3. A reta de regressão é dada por:

A inclinação da reta de mínimos quadrados,

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{[\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2]} \quad (3)$$

O intercepto da reta de mínimos quadrados,

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (4)$$

3.4. As equações deste sistema linear são chamadas de equações normais.

3.5. A reta de regressão estimada deve passar pelo centroide dos pontos,  $(\bar{x}; \bar{y})$ .

3.6. As equações normais também assumem que o erro nos valores de y é constante. Tais dados são referidos como sendo homocedásticos. Isto significa que todos os pontos têm igual peso, quando a inclinação e o intercepto são calculados. Esta suposição é susceptível de ser invalidada na prática.

3.7. Em muitas análises os dados são heterocedásticos, isto é, o desvio padrão dos valores de y aumenta com a concentração da substância a ser analisada, em vez de ter o mesmo valor para todas as concentrações.

#### 4. Avaliação da igualdade de variâncias (Teste de Cochran)

4.1. A fim de avaliar a igualdade das variâncias da variável dependente no modelo ajustado para a curva de calibração, deve-se realizar o teste de hipóteses de Cochran, que testa a homogeneidade das variâncias.

4.2. O teste de Cochran compara a maior variância com a soma das demais.

4.3. As hipóteses a serem testadas são:

$$\begin{cases} H_0: \sigma_{y_1}^2 = \sigma_{y_2}^2 = \sigma_{y_i}^2 \dots = \sigma_{y_n}^2 \\ H_1: \text{pelo menos um dos } \sigma_{y_i}^2 \text{ s diferente,} \end{cases} \quad i = 1, 2, \dots, n$$

A estatística a ser testada é:

$$C = \frac{S_{y_{max}}^2}{\sum_i^n S_{y_i}^2} = \frac{\text{maior var\~ancia em y}}{\text{soma de todas as vari\~ancias}}$$

Em que  $S_{y_{ij}}^2$  representa a variância amostral do i-ésimo sinal, calculado a partir dos seus j-ésimos resultados em triplicata.

$$S_{y_i}^2 = \frac{1}{m-1} \sum_{j=1}^m (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$$

Em que: j representa o j-ésimo resultado para a triplicata i; m representa o número de medidas (réplicas) para a variável resposta y em cada ponto.

4.4. Compara-se o valor calculado C com os valores críticos tabelados  $C_{crítico}$  ao nível de 5% de significância.

Se

$C < C_{crítico}$  aceita-se a hipótese nula

$C \geq C_{crítico}$  rejeita-se a hipótese nula

4.5. Tabela: Valores Críticos para o teste de Homogeneidade de Variâncias de acordo com o Número de medidas (réplicas) e com o Número de Pontos ao Nível de Significância de 5%.

Número de Pontos	N° de medidas (réplicas) para a variável y			
	2	3	4	5
5	0,841	0,684	0,598	0,544
6	0,781	0,616	0,532	0,48
7	0,727	0,561	0,48	0,431
8	0,68	0,516	0,438	0,391
9	0,638	0,478	0,403	0,358
10	0,602	0,445	0,373	0,331
11	0,57	0,417	0,348	0,308
12	0,541	0,392	0,326	0,288
13	0,515	0,371	0,307	0,271
14	0,492	0,352	0,291	0,255
15	0,471	0,335	0,276	0,242
16	0,452	0,319	0,262	0,23
17	0,434	0,305	0,25	0,219
18	0,418	0,293	0,24	0,209
19	0,403	0,281	0,23	0,2
20	0,389	0,27	0,22	0,192

4.6. Em caso de homocedasticidade, deve ser empregado o método dos mínimos quadrados ordinários, conforme as equações 2, 3 e 4.

4.7. Quando da presença de heterocedasticidade, deve ser utilizado o método dos mínimos quadrados ponderados.

## 5. Método dos Mínimos Quadrados Ponderados

5.1. No método dos mínimos quadrados ponderados, aplicados ao ajuste da curva de calibração, os coeficientes da reta de regressão são ponderados pelo inverso da variância de y,  $s_i^2$ , levando em consideração a média harmônica dessa.

5.2. Onde  $s_i^2$  corresponde à variância de  $y_i$ , calculada para os pontos em no mínimo triplicata.

5.3. Se os pontos individuais são assinalados por  $(x_1, y_1), (x_2, y_2), (x_3, y_3) \dots (x_i, y_i) \dots (x_n, y_n)$ , os desvios padrão correspondentes são  $s_1, s_2, s_3 \dots s_i \dots s_n$ .

5.4. Pode-se, em seguida, definir os pesos individuais,  $w_1, w_2, w_3 \dots w_i \dots w_n$ , como sendo:

Pesos:

$$w_i = \frac{s_i^{-2}}{\sum_{i=1}^n s_i^{-2} / n}$$

5.5. A inclinação e o intercepto da linha de regressão ponderada são dados por:

Inclinação ponderada:

$$b_w = \frac{\sum_{i=1}^n w_i x_i y_i - n \bar{x}_w \bar{y}_w}{\sum_{i=1}^n w_i x_i^2 - n \bar{x}_w^2}$$

e Intercepto ponderado:

$$a_w = \bar{y}_w - b \bar{x}_w$$

Nessas equações,  $\bar{y}_w$  e  $\bar{x}_w$  representam as coordenadas do centroide ponderado, através do qual a linha de regressão ponderada deve passar.

Essas coordenadas são dadas, como esperado por:

$$\bar{x}_w = \sum_{i=1}^n w_i x_i / n \quad \text{e} \quad \bar{y}_w = \sum_{i=1}^n w_i y_i / n$$

## 6. Análise de Variância (Anova)

6.1. A análise de variância (Anova) consiste em avaliar se uma determinada reta de regressão estimada (curva de calibração) explica satisfatoriamente a relação existente entre a concentração e o sinal.

6.2. Nesse contexto, deve-se empregar o teste F na análise de variância com o objetivo de testar a significância da estimativa do coeficiente associado à variável independente –x, concentração, e calcular o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) com o objetivo de averiguar o grau de explicação do modelo.

## 7. ANOVA de Mínimos Quadrados Ordinários

$$\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 = \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2 + \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$$

Em que:

$$\text{Soma de Quadrados Total} = \text{SQTot} = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$$

$$\text{Soma de Quadrados da Regressão} = \text{SQReg} = \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2$$

$$\text{Soma de Quadrados dos Resíduos} = \text{SQRes} = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$$

Soma de quadrados totais = Soma de quadrados da Regressão + Soma de quadrados dos Resíduos

$$\text{Quadrado Médio da Regressão} = \text{QMReg} = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{p-1}$$

$$\text{Quadrado Médio dos Resíduos} = \text{QMRes} = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-p}$$

$$\text{Quadrado Médio Total} = \text{QMTot} = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n-1}$$

p é o número de parâmetros do modelo.

## 8. Teste F da ANOVA de Mínimos Quadrados Ordinários

8.1. Tabela de Análise de Variância (Anova)

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F
Regressão	$p-1$	$\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{p-1}$	$\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{p-1} \cdot \frac{p-1}{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}$
Resíduos	$n-p$	$\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$	$\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-p}$	
Total	$n-1$	$\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$	$\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n-1}$	

$$F = \frac{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{p-1}}{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-p}} = \frac{QMReg}{QMRes}$$

8.2. A estatística F testa a significância do coeficiente angular da reta estimada, ou seja, testa a significância da regressão. As hipóteses nula e alternativa a serem testadas são:

$$\begin{cases} H_0: b = 0 \\ H_1: b \neq 0 \end{cases}$$

8.3. Regra de Decisão:

Se  $F_{calculado} \geq F_{(\alpha, 1, n-2)} \Rightarrow$  *rejeita  $H_0$  ao nível de significância adotado*

Em que  $F_{(\alpha, 1, n-2)}$  tem distribuição de probabilidade F de Snedecor com 1 grau de liberdade no numerador e n-2 graus de liberdade no denominador ao nível de significância  $\alpha$ .

8.4. Se o teste concluir pela rejeição da hipótese nula, pode-se inferir que o modelo proposto é adequado para descrever o fenômeno.

## 9. Coeficiente de determinação para Mínimos Quadrados Ordinários

9.1. O coeficiente de determinação é definido como sendo:

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} = \frac{SQReg}{SQTot}$$

9.2. O coeficiente de determinação também pode ser representado como sendo o quadrado do coeficiente de correlação.

9.3. O coeficiente de determinação deve ser igual ou superior a 0,980 ( $R^2 \geq 0,980$ ).

9.4. Os resultados para os coeficientes de determinação deverão ser arredondados considerando três casas decimais.

## 10. ANOVA de Mínimos Quadrados Ponderados

10.1. Se, após a realização do teste de homogeneidade de variâncias, for constatada a heterocedasticidade, deve-se adotar o método dos mínimos quadrados ponderados -MQP.

10.2. A análise de variância para os MQP consiste em:

$$\sum_{i=1}^n w_i (y_i - \bar{y})^2 = \sum_{i=1}^n w_i (\hat{y}_i - \bar{y})^2 + \sum_{i=1}^n w_i (y_i - \hat{y}_i)^2$$

Soma de Quadrados Total Ponderada =  $SQ_{Tot_w} = \sum_{i=1}^n w_i (y_i - \bar{y})^2$

Soma de Quadrados da Regressão Ponderada =  $SQ_{Reg_w} = \sum_{i=1}^n w_i (\hat{y}_i - \bar{y})^2$

Soma de Quadrados dos Resíduos Ponderada =  $SQ_{Res_w} = \sum_{i=1}^n w_i (y_i - \hat{y}_i)^2$

Soma de Quadrados Total Ponderada = Soma de quadrados da Regressão Ponderada + Soma de quadrados dos Resíduos Ponderada

Quadrado Médio da Regressão Ponderado =  $QM_{Reg_w} = \frac{\sum_{i=1}^n w_i (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{p-1}$

Quadrado Médio dos Resíduos Ponderado =  $QM_{Res_w} = \frac{\sum_{i=1}^n w_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-p}$

Quadrado Médio Total Ponderado =  $QM_{Tot_w} = \frac{\sum_{i=1}^n w_i (y_i - \bar{y})^2}{n-1}$

Em que p é o número de parâmetros do modelo.

## 11. Teste F da ANOVA de Mínimos Quadrados Ponderados

### 11.1. Tabela de Análise de Variância (Anova)

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F
Regressão	$p - 1$	$\sum_{i=1}^n w_i (y_i - \bar{y})^2$	$\frac{\sum_{i=1}^n w_i (y_i - \bar{y})^2}{p - 1}$	$\frac{\sum_{i=1}^n w_i (y_i - \bar{y})^2}{p - 1} \cdot \frac{\sum_{i=1}^n w_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n w_i (y_i - \hat{y}_i)^2}$
Resíduos	$n - p$	$\sum_{i=1}^n w_i (y_i - \hat{y}_i)^2$	$\frac{\sum_{i=1}^n w_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - p}$	
Total	$n - 1$	$\sum_{i=1}^n w_i (y_i - \bar{y})^2$	$\frac{\sum_{i=1}^n w_i (y_i - \bar{y})^2}{n - 1}$	

$$F_w = \frac{\frac{\sum_{i=1}^n w_i (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{p - 1}}{\frac{\sum_{i=1}^n w_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - p}} = \frac{QM_{Reg_w}}{QM_{Res_w}}$$

11.2. A estatística  $F_w$  testa a significância do coeficiente angular da reta estimada, ou seja, testa a significância da regressão. As hipóteses nula e alternativa a serem testadas são:

$$\begin{cases} H_0: b_w = 0 \\ H_1: b_w \neq 0 \end{cases}$$

### 11.3. Regra de Decisão:

Se  $F_{w_{calculado}} \geq F_{(\alpha, 1, n-2)} \Rightarrow$  rejeita  $H_0$  ao nível de significância adotado

Em que  $F_{(\alpha,1,n-2)}$  tem distribuição de probabilidade F de Snedecor com 1 grau de liberdade no numerador e n-2 graus de liberdade no denominador ao nível de significância  $\alpha$ .

11.4. Se o teste concluir pela rejeição da hipótese nula, pode-se inferir que o modelo proposto é adequado para descrever o fenômeno.

## 12. Coeficiente de determinação para Mínimos Quadrados Ponderados

12.1. O coeficiente de determinação ponderado é definido como sendo:

$$R_w^2 = \frac{\sum_{i=1}^n w_i (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n w_i (y_i - \bar{y})^2} = \frac{SQReg_w}{SQTot_w}$$

12.2. O coeficiente de determinação ponderado deve ser igual ou superior a 0,980.

12.3. O coeficiente de determinação ponderado também pode ser representado como sendo o quadrado do coeficiente de correlação ponderado, que é dado por:

$$r_w = \frac{\sum_i w_i \cdot \sum_i w_i x_i y_i - \sum_i w_i x_i \cdot \sum_i w_i y_i}{\sqrt{\sum_i w_i \cdot \sum_i w_i x_i^2 - (\sum_i w_i x_i)^2} \cdot \sqrt{\sum_i w_i \cdot \sum_i w_i y_i^2 - (\sum_i w_i y_i)^2}}$$

12.4. Para os mínimos quadrados ponderados também se faz necessário que o coeficiente de correlação ponderado,  $r_w$ , seja maior ou igual a 0,990. ( $r_w \geq 0,990$ )

12.5. Os resultados para os coeficientes de determinação deverão ser arredondados considerando três casas decimais.

## 13. Análise de Resíduos

13.1. A qualidade do ajuste da curva de calibração e a sua linearidade também deverão ser avaliadas por meio da inspeção visual do gráfico de resíduos gerados pela regressão.

13.2. Os pontos no gráfico de resíduos deverão estar aleatoriamente distribuídos ao redor do eixo x, não apresentando nenhum comportamento ou tendência funcional.

## ANEXO IV

### EFEITO MATRIZ

1. Para avaliação do efeito matriz, deve ser aplicado o teste apresentado a seguir, que realiza a comparação dos coeficientes angulares das curvas de calibração obtidas com o padrão do analito no solvente e com a amostra fortificada com o padrão.

2. Nesta abordagem, aplica-se um teste de hipóteses para identificar se as curvas de calibração possuem inclinações estatisticamente diferentes.

3. Para cada curva de calibração, será ajustada uma equação de regressão:

$$y_1 = a_1 + b_1 x_1 + \varepsilon \quad (5)$$

$$y_2 = a_2 + b_2 x_2 + \varepsilon, \quad (6)$$

Em que:

$y_1$  corresponde ao sinal analítico para a curva de calibração obtida com o padrão em solvente;

$y_2$  corresponde ao sinal analítico para a curva de calibração obtida com a amostra fortificada com padrão;

$x_1$  corresponde às concentrações do padrão em solvente (grupo 1);

$x_2$  corresponde às concentrações do analito nas amostras fortificadas com padrão (grupo 2);

$a_1$  corresponde ao intercepto da curva de calibração obtida com o padrão em solvente;

$a_2$  corresponde ao intercepto da curva de calibração obtida com a amostra fortificada com padrão;

$b_1$  corresponde à inclinação da curva de calibração obtida com o padrão em solvente;

$b_2$  corresponde à inclinação da curva de calibração obtida com a amostra fortificada com padrão;

4. Os erros  $\varepsilon$  são independentes e identicamente distribuídos como uma distribuição normal com média 0 e variância  $\sigma^2$ ,  $N(0, \sigma^2)$ .

#### 5. **Teste de paralelismo.**

5.1. O teste de paralelismo compara as inclinações das retas ajustadas segundo as equações 5 e 6 definidas acima.

5.2. A hipótese apropriada para comparar os coeficientes angulares (inclinações) é dada por:

$$\begin{aligned} H_0: b_1 &= b_2 \\ H_1: b_1 &\neq b_2 \end{aligned}$$

5.3. Quando  $H_0$  é verdadeira, as retas de regressão tornam-se:

$$\begin{aligned} y_1 &= a_1 + b_1 x + \varepsilon \\ y_2 &= a_2 + b_1 x + \varepsilon \end{aligned}$$

5.4. A Estatística do Teste é:

$$T = \frac{\bar{b}_1 - \bar{b}_2}{S_{\bar{b}_1 - \bar{b}_2}}$$

Em que:

$\bar{b}_1$  é a estimativa de  $b_1$ , usando as  $n_1$  observações do grupo 1;

$\bar{b}_2$  é a estimativa de  $b_2$ , usando as  $n_2$  observações do grupo 2;

$S_{\bar{b}_1 - \bar{b}_2}$  é a estimativa do desvio-padrão da diferença entre os coeficientes angulares dos modelos. Este desvio-padrão é igual à raiz quadrada da seguinte variância:

$$S_{\bar{b}_1 - \bar{b}_2}^2 = S_{\varepsilon, y/x}^2 \left[ \frac{1}{(n_1 - 1)S_{x_1}^2} + \frac{1}{(n_2 - 1)S_{x_2}^2} \right],$$

Em que:

$$S_{P,y/x}^2 = \frac{(n_1 - 2)S_{y/x_1}^2 + (n_2 - 2)S_{y/x_2}^2}{n_1 + n_2 - 4},$$

Em que:

$S_{y/x_1}^2$  é o quadrado médio do resíduo para o grupo 1;

$S_{y/x_2}^2$  é o quadrado médio do resíduo para o grupo 2;

$S_{x_1}^2$  é a variância dos X para o grupo 1;

$S_{x_2}^2$  é a variância dos X para o grupo 2.

5.5. A estatística de teste T sob as suposições usuais de regressão terá distribuição t de Student com  $n_1 + n_2 - 4$  graus de liberdade quando  $H_0$  for verdadeira.

5.6. Deve ser adotado o nível de significância de 5% no teste de hipóteses.

5.7. Cumpre salientar que  $\bar{b}_1$ ,  $\bar{b}_2$ ,  $S_{y/x_1}^2$  e  $S_{y/x_2}^2$  são definidas conforme as definições apresentadas no anexo III desta norma.

## ANEXO V

**Quadro 1.** Valores de DPR de acordo com a concentração do analito na amostra para fins de avaliação da precisão do método.

Concentração do analito na amostra (C)	DPR máximo aceitável (%)
100 g/Kg ≤ C < 1000 g/Kg	2
1000 mg/Kg ≤ C < 10000 mg/Kg	2,7
1000 mg/Kg ≤ C < 10000 mg/Kg	3,7
100 mg/Kg ≤ C < 1000 mg/Kg	5,3
10 mg/Kg ≤ C < 100 mg/Kg	7,3
1000 mg/Kg ≤ C < 10000 mg/Kg	10
100 mg/Kg ≤ C < 1000 mg/Kg	15
10 mg/Kg ≤ C < 100 mg/Kg	20
1 mg/Kg ≤ C < 10 mg/Kg	30
C < 1mg/Kg	35

**Quadro 2.** Valores percentuais de recuperação e de coeficiente de variação de acordo com a concentração do analito na amostra para fins de avaliação da exatidão do método.

Concentração do analito na amostra (C)	% Recuperação	Coeficiente de Variação (% CV) máximo aceitável
--	---------------	---

100 g/Kg ≤ C < 1000 g/Kg	98-102	2,0
1000 mg/Kg ≤ C < 10000 mg/Kg	98-102	2,7
1000 mg/Kg ≤ C < 10000 mg/Kg	97-103	3,7
100 mg/Kg ≤ C < 1000 mg/Kg	95-105	5,3
10 mg/Kg ≤ C < 100 mg/Kg	90-107	7,3
1000 mg/Kg ≤ C < 10000 mg/Kg	80-110	10
100 mg/Kg ≤ C < 1000 mg/Kg	80-110	15
10 mg/Kg ≤ C < 100 mg/Kg	80-110	20
1 mg/Kg ≤ C < 10 mg/Kg	70-110	30
C < 1mg/Kg	50-120	35

## ANEXO VI

**Tabela 1.** Parâmetros para a avaliação da robustez do método.

Preparo das Amostras	Estabilidade das soluções analíticas
	Tempo de extração
Espectrofotometria	Variação do pH da solução
	Diferentes fabricantes de solventes
Cromatografia Líquida	Variação do pH da fase móvel
	Variação na composição da fase móvel
	Diferentes lotes ou fabricantes de colunas
	Temperatura
Cromatografia Gasosa	Fluxo da fase móvel
	Diferentes lotes ou fabricantes de colunas
	Temperatura
Outras técnicas analíticas	Velocidade do gás de arraste
	As variações a serem testadas deverão ser avaliadas criticamente e seus resultados deverão ser apresentados