



Universidade do Estado do Rio De Janeiro
Centro de Tecnologia e Ciências
Instituto de Química

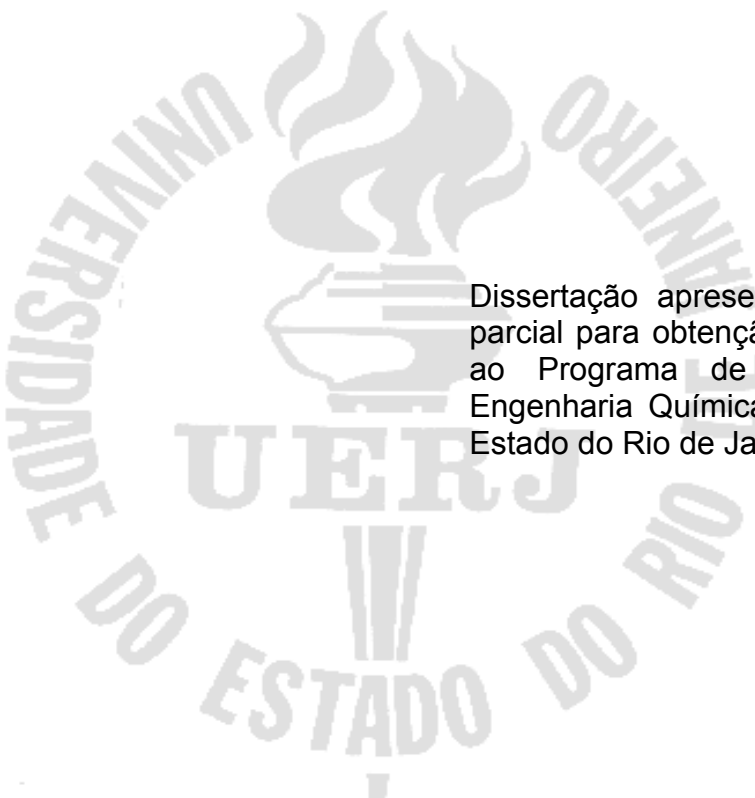
Alaíde Aline Xavier Leal

**Validação de métodos analíticos - estudos de casos relevantes de
atividades dos laboratórios de controle de qualidade de vacinas**

Rio de Janeiro
2007

Aláide Aline Xavier Leal

Validação de métodos analíticos - estudos de casos relevantes de atividades dos laboratórios de controle de qualidade de vacinas



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadores: Prof. Dr. Aderval Severino Luna
Prof^a. Dr^a. Cristiane Assumpção Henriques

Rio de Janeiro
2007

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDESIRIUS/BIBLIOTECA CTC/Q

L435 Leal, Alaíde Aline Xavier.
Validação de métodos analíticos : estudos de casos relevantes de atividades dos laboratórios de controle de qualidade de vacinas / Alaíde Aline Xavier Leal.- 2007.
Xi, 101 f.

Orientador : Aderval Severino Luna.
Orientador : Cristiane Assumpção Henriques.
Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química

1. Laboratórios – Controle de qualidade – Teses. 2. Vacinas – Análise - Teses. I. Luna, Aderval Severino. II. Henriques, Cristiane Assumpção. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Química. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. III. Título.

CDU 542.1

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese.

Assinatura

Data

Alaíde Aline Xavier Leal

Validação de métodos analíticos - estudos de casos relevantes de atividades dos laboratórios de controle de qualidade de vacinas

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovado em 31 de janeiro de 2007

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Aderval Severino Luna (Orientador)
Instituto de Química da UERJ

Prof^a. Dr^a. Cristiane Assumpção Henriques (Orientadora)
Instituto de Química da UERJ

Dr^a. Márcia Arissawa, FIOCRUZ/Bio-Manguinhos
FIOCRUZ/ Bio-Manguinhos

Prof. Dr. Marco Antonio Gaya de Figueredo
Instituto de Química da UERJ

Prof. Dr. Ricardo Queiroz Aucélio
PUC-RJ

Rio de Janeiro
2007

AGRADECIMENTOS

À Bio-Manguinhos por ter investido nesse assunto de validação analítica com treinamentos, consultorias e congressos que foram extremamente importantes para esse trabalho.

Ao Laboratório de Metrologia e Validação do Departamento de Garantia da Qualidade por me atribuir a função de validar métodos analíticos dos laboratórios de controle de Bio-Manguinhos e por me incentivar no mestrado.

Aos funcionários do Setor de Validação Analítica do Laboratório de Metrologia e Validação por me auxiliarem no trabalho de validação analítica.

Ao Setor de Calibração – Metrologia Química do Laboratório de Metrologia e Validação por participar na execução dos ensaios de validação.

Ao Laboratório de Controle de Qualidade Físico-Químico de Bio-Manguinhos por participar na execução dos ensaios de validação.

À Divisão de Controle em Processo do Departamento de Vacinas Bacterianas por participar na execução dos ensaios de validação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UERJ por me proporcionar essa chance de participar de um curso de mestrado.

Aos meus orientadores pela paciência e compreensão durante o curso.

Aos membros da banca avaliadora dessa dissertação por terem aceito o convite.

RESUMO

LEAL, Alaíde Aline Xavier. *Validação de métodos analíticos - estudos de casos relevantes de atividades dos laboratórios de controle de qualidade de vacinas*. 2007. 101 f. (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

A validação dos métodos de análises em situações fora da rotina, em P&D – pesquisa e desenvolvimento, pode tornar-se um processo de difícil solução, em oposição àquelas de rotina, onde as concentrações são conhecidas. Nesta última situação, o método analítico é validado e aprovado com simplicidade. Apesar dos elementos de qualidade básicos para análises em P&D serem os mesmos adotados nas análises de rotina, fatores como o comportamento imprevisível da amostra, a composição desconhecida da matriz e interdependência com o analito, mesmo a incerteza a respeito da escolha do método instrumental, requer uma atenção renovada nos elementos de qualidade existentes. A razão pode ser atribuída à imprevisibilidade do procedimento analítico e a extensão do esforço adicional dos elementos de qualidade. As incertezas das análises em P&D requerem uma cuidadosa consideração do problema, assim como a disponibilidade de técnicas analíticas. Ao mesmo tempo, devem-se observar o planejamento e organização do trabalho, a supervisão do desenvolvimento analítico e a adequação dos aspectos – técnico e organizacional - no trabalho de P&D, a definição de responsabilidades e a competência do corpo técnico. A garantia da qualidade nas indústrias farmacêuticas é estabelecida pelo desenvolvimento de especificações apropriadas para matérias-primas, produtos intermediários e produtos finais. A importância de especificações adequadas foi estabelecida e exemplos foram dados no desenvolvimento de especificação típica para produtos farmacêuticos, tais como a vacina e matéria prima. Isto incluiu uma discussão dos tipos de parâmetros que precisam ser controlados e uma indicação dos valores numéricos ou faixas esperadas para muitos materiais utilizados. A metrologia analítica que necessita ser aplicada para demonstrar a observância com as especificações foi discutida, com as implicações de desempenho do método para diferenciar variações na qualidade do produto e a simples variabilidade analítica. Esse trabalho foi escrito para laboratórios, com a finalidade de dar um suporte na implementação da validação de métodos analíticos e introduzir o conceito de incerteza da medida nas análises de rotina. O objetivo foi fornecer de uma maneira compreensível e prática a metodologia dos cálculos das medidas de incerteza baseados principalmente em dados de controle de qualidade e de validação já existentes. Exemplos práticos retirados diretamente do Laboratório de Metrologia e Validação, FIOCRUZ / Bio-Manguinhos, foram apresentados. Entretanto, o tratamento usado neste trabalho é genérico e pode ser aplicável a outros laboratórios químicos.

Palavras-chave: Ensaio. Validação. Incerteza.

ABSTRACT

Contrary to routine analysis, where the sample matrix and concentration range of the analyte are known, the analytical method has been validated – the method is fit-to-purpose – analysis in non-routine situation and in R&D – research and development – may be a tortuous problem to solve. Although many basic quality elements are the same as in routine analysis, unknown factors such as unpredictable behavior of the sample, unknown composition of the matrix and interdependence with the analyte, but (due to the unpredictability of the analytical procedure and extent of effort) also additional organizational quality elements, even uncertainty about the choice of the instrumental method. The uncertainties in non-routine analysis and R&D require careful consideration of the problem, requiring available analytical techniques, planning and organization of work, supervision of the analytical progress and adequate aspects – both technical and organizational – or non-routine and R&D work and define responsibility and competences of the personnel. Assessment and assurance of quality within the field of pharmaceutical manufacture is established by the development of appropriate specifications for raw materials and products. The importance of suitable specifications was established and examples were given for the development of a typical specification for a pharmaceutical drug substance like as vaccine or raw material. This included discussion of the types of parameters which needed to be controlled and an indication of the numerical values or ranges expected for most materials. The analytical metrology which needs to be applied to demonstrate compliance with the specification were discussed, along with the implications of method performance necessary in order to distinguish between variations in product quality and simple analytical variability. This work is written for analytical laboratories, in order to give support to the implementation of the validation of analytical methods and the concept of measurement uncertainty for routine work. The aim is to provide a practical, understandable and common way of performing measurement uncertainty calculation, based mainly on preexisting quality control and validation data. Practical examples taken directly from the Laboratório de Validação de Métodos, FIOCRUZ / Bio-Manguinhos were presented and explained. However, the approach is very general and should be applicable to most testing laboratories in chemical field.

Keywords: Methods. Validation and uncertainty.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Classificação baseada na aplicação do método (USP 27, 2003)
- Tabela 2: Parâmetros de avaliação de acordo com a categoria do método (USP 27, 2003)
- Tabela 3: Critério de aceitação para exatidão (AOAC, 2000)
- Tabela 4: Critério de aceitação para precisão (AOAC, 2000)
- Tabela 5: Estrutura dos dados para o delineamento com qualquer número de tratamentos e repetições iguais (RANGEL, 2004)
- Tabela 6: Modelo geral de análise de variância (ANOVA) (RANGEL, 2004)
- Tabela 7: Classificação dos métodos cromatográficos em coluna (SKOOG *et. al.*, 2002)
- Tabela 8: Resultados da especificidade do estudo de caso 4.1 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 150/2005, 2005)
- Tabela 9: Resultados de equivalência e precisão do estudo de caso 4.1 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 150/2005, 2005)
- Tabela 10: Resultados dos limites de quantificação e de detecção do estudo de caso 4.1 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 150/2005, 2005)
- Tabela 11: Resultados de precisão e equivalência do estudo de caso 4.2 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 89/2005, 2005)
- Tabela 12: Resultado de linearidade do estudo de caso 4.2 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 89/2005, 2005)
- Tabela 13: Resultados do limite de quantificação do estudo de caso 4.2 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 89/2005, 2005)
- Tabela 14: Resultados de exatidão do estudo de caso 4.2 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 89/2005, 2005)
- Tabela 15: Resultados da especificidade no estudo de caso 4.2 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 89/2005, 2005)
- Tabela 16: Resultados das estimativas de incerteza do estudo de caso 4.2 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 89/2005, 2005)
- Tabela 17: Resultado da linearidade do estudo de caso 4.3 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 971/2005, 2005)
- Tabela 18: Resultados de exatidão do estudo de caso 4.3 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 971/2005, 2005)
- Tabela 19: Resultados de precisão e de equivalência do estudo de caso 4.3 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 971/2005, 2005)
- Tabela 20: Estimativa de incerteza do estudo de caso 3.3 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 971/2005, 2005)

Tabela 21: Condições e resultados das medidas de pH da amostra de vacina do estudo de caso 4.4 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 2281/2004, 2005)

Tabela 22: Cálculos para a construção do gráfico de controle das amplitudes para a amostra de vacina no estudo de caso 4.4 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 2281/2004, 2005)

Tabela 23: Cálculos para a construção do gráfico de controle das médias para a amostra de vacina do estudo de caso 4.4 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 2281/2004, 2005)

Tabela 24: Condições e resultados das medidas de pH da solução tampão pH 7 do estudo de caso 4.4 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 2281/2004, 2005)

Tabela 25: Cálculos para a construção do gráfico de controle das amplitudes para a solução tampão pH 7 do estudo de caso 4.4 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 2281/2004, 2005)

Tabela 26: Cálculos para a construção do gráfico de controle das médias para a solução tampão pH 7 do estudo de caso 4.4 (PROTOCOLO 2281/2004, 2005)

Tabela 27: Condições e resultados das medições de pH para a água ultrapura do estudo de caso 3.4 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 2281/2004, 2005)

Tabela 28: Cálculos para a construção do gráfico de controle das amplitudes para a água ultrapura do estudo de caso 4.4 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 2281/2004, 2005)

Tabela 29: Cálculos para a construção do gráfico de controle das mM para a água ultrapura do estudo de caso 4.4 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 2281/2004, 2005)

Tabela 30: Estimativa de incerteza para a amostra de vacina do estudo de caso 4.4 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 2281/2004, 2005)

Tabela 31: Estimativa de incerteza para a solução tampão pH 7 do estudo de caso 4.4 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 2281/2004, 2005)

Tabela 32: Estimativa de incerteza para a água ultrapura do estudo de caso 4.4 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 2281/2004, 2005)

Tabela 32: Estimativa de incerteza para a água ultrapura do estudo de caso 4.4 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 2281/2004, 2005)

Tabela 34: Resumo dos resultados do Laboratório na participação de ensaios de proficiência em medição de pH do estudo de caso 4.4 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 2281/2004, 2005)

Tabela 35: Resultados de precisão, repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial do estudo de caso 4.5 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 913/2005, 2005)

Tabela 36: Resultados de repetitividade do sistema do equipamento novo (I) do estudo de caso 3.5 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 913/2005, 2005)

Tabela 37: Resultados de repetitividade do equipamento antigo (II) referentes à primeira validação do estudo de caso 4.5 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 913/2005, 2005)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Representação da curva gaussiana de uma distribuição normal (KATEMAN, 1981)
- Figura 2: Gráfico de controle das médias de Shewart (HIRATA, 2002)
- Figura 3: Gráfico de controle das amplitudes (HIRATA, 2002)
- Figura 4: avaliação da conformidade do resultado final com a o limite de especificação de um método (EURACHEM, QUAM:2000)
- Figura 5: (a) Curva de calibração. (b) Cromatogramas contendo substâncias, com massas molares diferentes, eluindo em tempos distintos (SKOOG *et. al.*, 2002).
- Figura 6: Reação de formação do complexo corado – polissacarídeo, orcinol e furfural (FRASCH *et. al.*2000).
- Figura 7: Contribuição das incertezas do estudo de caso 4.3 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 971/2005, 2005).
- Figura 8: Diagrama de uma célula para medida de pH (SKOOG *et. al.*, 2002).
- Figura 9: Gráfico de controle das amplitudes para a amostra de vacina (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 2281/2004, 2005).
- Figura 10: Gráfico de controle das médias para a amostra de vacina (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 2281/2004, 2005).
- Figura 11: Gráfico de controle das amplitudes para a solução tampão pH 7 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 2281/2004, 2005).
- Figura 12: Gráfico de controle das médias para a solução tampão pH 7 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 2281/2004, 2005).
- Figura 13: Gráfico de controle das amplitudes para a água ultrapura (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 2281/2004, 2005).
- Figura 14: Gráfico de controle das médias para a água ultrapura (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 2281/2004, 2005)

SUMÁRIO

OBJETIVO	12
1 VALIDAÇÃO ANALÍTICA	14
1.1 Conceituação	14
1.2 Histórico	15
1.3 Regulamentações	16
2 METODOLOGIA	18
2.1 Planejamento	18
2.2 Documentação de validação analítica	19
2.3 Características de desempenho do método	20
2.3.1 Especificidade e seletividade	21
2.3.2 Faixa de aplicação e linearidade.....	22
2.3.3 Limite de detecção e limite de quantificação	24
2.3.4 Exatidão	26
2.3.5 Precisão	27
2.3.6 Robustez	30
2.4 Estatística aplicada a validação de métodos	31
2.5 Estimativa de incerteza	40
2.5.1 Procedimento prático de avaliação da incerteza de métodos analíticos	45
3 ESTUDOS DE CASOS	51
3.1 Validação do controle da eliminação do ADH no concentrado do polissacarídeo ativado durante as diafiltrações usando o método de filtração em gel	51
3.1.1 Introdução	51
3.1.2 Cromatografia de exclusão por tamanho.....	55
3.1.3 Controle da eliminação do ADH no concentrado do polissacarídeo ativado durante as diafiltrações usando o método de filtração em gel	55
3.1.4 Ensaio e resultados	56
3.2 Validação e estimativa da incerteza do método de determinação de fósforo por colorimetria	61
3.2.1 Introdução	61
3.2.2 Determinação de fósforo por colorimetria.....	62

3.2.3	Ensaio e resultados	63
3.3	Validação e estimativa da incerteza do método de determinação do polissacarídeo por colorimetria.....	69
	..69	
3.3.1	Determinação de polissacarídeo por colorimetria	69
3.3.2	Ensaio e resultados	70
3.4	Validação retrospectiva e estimativa da incerteza na medida do pH em água ultrapura	75
3.4.1	Determinação de pH.....	75
3.4.2	Determinação do pH da água ultrapura.....	76
3.4.4	Ensaio e resultados	77
3.5	Revalidação do método analítico de determinação de pH	94
3.5.1	Introdução	94
3.5.2	Ensaio e resultados	94
4	CONCLUSÕES	98
5	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	99
	REFERÊNCIAS.....	101
	ANEXOS	107

OBJETIVO

O laboratório, ao empregar métodos de controle de qualidade de qualquer matéria-prima, produto intermediário ou produto final, deve se basear em regulamentações emitidas por organismos de normalização, que são organizações reconhecidas na sua área de atuação, ou em periódicos. Conseqüentemente, ele deve demonstrar que tem condições de operar de maneira adequada estes métodos normalizados, dentro das condições específicas de suas instalações, antes de implantá-los. Nesse trabalho foi exemplificada experimentalmente, através de cinco estudos de caso, a avaliação de dados para verificação da capacidade do laboratório de reproduzir o método analítico, ilustrando-os a com demonstração da seqüência do planejamento e parâmetros necessários à validação.

Dos cinco estudos de caso, três vieram de uma empresa européia, através de uma transferência de tecnologia de produção de vacinas, para a fábrica em questão, portanto tratam-se de métodos já validados e dois deles já tinham sido publicados em farmacopéias. Validar um resultado significa que o procedimento, que incluiu desde as condições de operação do equipamento até toda a seqüência analítica, seja aceito como correto. Para tanto, é importante enfatizar que qualquer alteração de métodos normalizados, publicados ou transferidos implica em revalidar o método para que os laboratórios demonstrem que os métodos utilizados por eles conduzem a resultados confiáveis, que garantam qualidade, idoneidade e credibilidade de seus produtos ou serviços. Como os métodos normalizados são métodos validados, não foi necessário realizar o processo completo de validação, já que não ocorreram alterações significativas dos mesmos.

A escolha dos estudos de casos, dentre todos os métodos já validados na fábrica, baseou-se nos problemas que eles apresentaram durante a validação para os quais foram sugeridas soluções. Para todas as validações foram elaborados os planos de ensaio e a seguir foram verificadas as características de desempenho dos equipamentos e dos analistas, a compatibilidade dos equipamentos ao método e a estimativa de incerteza. Para cada tipo de estudo de caso, de acordo com a sua complexidade, natureza, disponibilidade de matéria-prima e reagentes, foram aplicados critérios de aceitação de validação, considerações para estimativa de incerteza e tipos de planos de ensaio diferentes.

O primeiro estudo de caso exemplificou uma revalidação de uma análise qualitativa a qual teve como finalidade verificar a adequação de cada equipamento disponível na execução do método. O segundo e o terceiro estudo de casos demonstraram a importância do treinamento dos analistas antes da execução do ensaio, a necessidade da interpretação e da utilização correta dos certificados de calibração dos instrumentos e também a capacidade de cada equipamento disponível. Para o terceiro estudo de caso o plano de ensaio foi elaborado abordando apenas três análises completas com padrão certificado, ou

seja, o número de repetições foi menor e a conclusão da validação foi mais rápida. Para o quarto estudo de caso, aplicou-se a validação retrospectiva, com base na exemplificação de um método analítico cujos resultados de rotina puderam ser aproveitados; posteriormente foram construídos os gráficos de controle para verificar o desempenho do método. Neste caso foi possível observar a falta de sensibilidade da análise aos tipos de amostras diferentes. No quinto estudo de caso, aplicou-se um plano de ensaio com poucas análises utilizando padrões certificados, pois a revalidação teve como motivo a introdução de um instrumento novo no laboratório. Para tanto verificou-se a conformidade do medidor e o treinamento dos analistas.

Todos os métodos possuíam procedimento operacional padrão, plano de ensaio para validação, instrumentos referentes calibrados, vidrarias calibradas, o que possibilitou a estimativa de incerteza.

As análises de equivalência, utilizando os testes estatísticos como t de Student, Fisher e análise da variância (ANOVA), além das estimativas de incerteza tornaram o processo de validação de métodos analíticos mais objetivo, fácil de demonstrar e implementar.

1 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

1.1 Conceituação

A validação de métodos analíticos é definida por inúmeras agências reguladoras e pode-se dizer que este conceito continua evoluindo. Seguem-se a transcrição de algumas definições:

“Processo pelo qual é estabelecido através de estudos de laboratório, que os parâmetros analíticos do método alcançam os requisitos específicos para as aplicações analíticas pretendidas” (USP 27, 2003).

“Demonstrar que o método é adequado ao uso pretendido” (NBR ISO/IEC 17025:2005).

“Confirmar que tem competência para aplicar o método de modo apropriado, que o mesmo atinge o pretendido e que opera bem sob as condições normais de uso” (INMETRO DOQ-CGCRE-008:2003).

“Validação é o processo de definir uma exigência analítica e confirmar que o método sob investigação tem capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer” (EURACHEM, 1998).

“A validação de um método estabelece, através de estudos sistemáticos de laboratório, que o método é adequado à finalidade, isto é, suas características de desempenho são capazes de produzir resultados correspondentes às necessidades de problema analítico” (ANVISA, 2004).

Dentro de um conceito geral, um método analítico pode ser validado intralaboratorialmente ou interlaboratorialmente. O primeiro método, chamado de validação no laboratório, consiste em executar as etapas de validação dentro de um único laboratório, seja para validar um método novo que tenha sido desenvolvido localmente ou para verificar que um método adotado de outras fontes está bem aplicado. O segundo tipo, chamado de validação completa, envolve todas as características de desempenho e um estudo interlaboratorial que é utilizado para verificar como a metodologia se comporta com uma determinada matriz em vários laboratórios, estabelecendo a reprodutibilidade da metodologia e a incerteza expandida associada à metodologia como um todo. No caso de validação no laboratório de métodos retirados de fontes normativas ou publicadas, chama-se de revalidação do método (LANÇAS, F. M. 2004).

A revalidação não acontece somente nesse momento, mas também quando há entrada de um analista, equipamento, ou fornecedor novo no laboratório. Recomenda-se a revalidação a cada dois anos caso não haja nenhuma alteração das condições do método (BARROS, C. B. & HIRATA, Y. S. 2004).

A validação de métodos é o processo de estabelecimento das características de desempenho e suas limitações, da identificação dos fatores de variabilidade e de sua extensão, que podem alterar essas características. É, portanto o processo de verificação se um método é adequado ao uso. Tornar um método analítico válido para uso é padronizar a sua execução, visando garantir que o mesmo seja realizado sempre com a obtenção de resultados compatíveis com as especificações do produto para a segura utilização das informações geradas (SILVA, A. & CARVALHO, M. 2004).

Como pré-requisitos de validação, todos os equipamentos analíticos e instrumentos em questão são submetidos a uma prévia calibração e ajuste, se necessário, ou qualificação quando aplicável. Padrões de referência, com pureza documentada, devem ser usados no transcorrer do estudo de validação. Toda vidraria utilizada deve ser classe A e é desejável que os materiais volumétricos sejam certificados individualmente. Os analistas de laboratório devem ser treinados nas técnicas analíticas para realizar as tarefas de validação (NICOLÓSI, M. 2003).

1.2 Histórico

A importância da validação em análise química tornou-se mais acentuada a partir da constatação, na década de setenta, da enorme variabilidade de resultados obtidos em análise toxicológica de amostras submetidas a estudos interlaboratoriais por órgãos do governo americano (LANÇAS, F. M. 2004).

A partir de iniciativas de instituições do governo americano, como Food and Drug Administration (FDA) e a Environment Protection Agency (EPA), e a partir de resultados de estudo para assegurar a integridade dos dados laboratoriais, criou-se o sistema denominado ISO/IEC-25 (HUBER, 1999).

O principal objetivo dessa organização foi a padronização das exigências a serem seguidas pelos laboratórios a fim de demonstrarem competência na realização dos serviços, assim como tornarem os resultados internacionalmente aceitos e passíveis de reprodução em outros laboratórios (HUBER, 1999).

A partir dessas normas, cada país estabeleceu seu próprio programa para assegurar a qualidade de serviços, entretanto sempre em concordância com as normas da International Standardization Organization e da International Electrotechnical Commission (ISO/IEC25). Esses programas de garantia de qualidade visaram implementar ações sistemáticas necessárias para prover um serviço de adequada confiabilidade de maneira a satisfazer sua finalidade. A garantia da qualidade e o controle de qualidade se relacionam aos procedimentos executados no laboratório para garantir o controle do sistema de medidas. Esses programas introduziram novos conceitos visando à uniformização do

procedimento dos laboratórios envolvidos em programas de garantia de qualidade (HUBER, L. 1999).

1.3 Regulamentações

Uma forte infra-estrutura internacional de medições tem sido implementada com a finalidade de eliminar as barreiras técnicas entre os países, já que há necessidade progressiva de harmonização das diferenças entre os conceitos básicos de qualidade de tratamentos de dados analíticos a serem comparados. Para atingir este processo de reconhecimento mútuo, em nível internacional, devem ser observados requisitos legais, de certificação e de acreditação, para a medição uma vez efetuada ser aceita em qualquer país. As normas internacionais e sistemas da qualidade requerem a validação de métodos analíticos e a documentação do trabalho de validação, para a obtenção de resultados confiáveis e adequados ao uso pretendido. Portanto, existem fortes razões legais, técnicas e comerciais, que justificam a validação de métodos analíticos. Os métodos analíticos usados para avaliação da qualidade de produtos, tais como: farmacêuticos, alimentícios, cosméticos, agro-químicos, estão sujeitos a vários requisitos legais e normativos. Segundo do documento gerado pelo Committee of the Good Manufacturing Practice (cGMP), os métodos de ensaios usados para avaliar a conformidade destes produtos com especificações estabelecidas devem atingir padrões adequados de exatidão, precisão e confiabilidade (BRITO *et. al.*, 2003).

Com objetivo de prover e facilitar o desenvolvimento de validação de métodos analíticos para utilização e harmonização dos conceitos de validação de métodos analíticos nos programas de segurança da garantia da qualidade, grupos internacionais técnicos publicaram documentos, guias e recomendações para serem seguidos como por exemplo: a International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), uma organização não governamental internacional dedicada ao avanço da química, redigiu um documento técnico, um guia para validação de métodos analíticos utilizado pela ISO. Já a norma ISO/IEC 17025, uma norma específica para laboratórios de ensaio e de calibração apresenta um item de validação de métodos como um dos requisitos técnicos importantes na qualidade assegurada dos laboratórios, a United State Pharmacopeia (USP), um compêndio reconhecido pelo U.S. Federal Food, Drug and Cosmetic Act, contém capítulos de validação de métodos analíticos e ensaios de conformidade do sistema, o grupo de trabalho EURACHEM desenvolveu os documentos *The Fitness for Purpose of Analytical Methods* e *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement* utilizado como guia na validação e na estimativa de incerteza de métodos analíticos (RIBANI *et. al.*, 2004).

No Brasil, para a indústria farmacêutica, há duas agências verificadoras de competência de laboratórios de ensaios: a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e qualidade Industrial (INMETRO). Estes órgãos disponibilizam guias para procedimento de validação de métodos analíticos como Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos do INMETRO (DOQ-CGRE-008) que reuniu as principais normas, a fim de auxiliar os laboratórios na tarefa de demonstrar que um método de ensaio químico, nas condições em que é praticado, tem as características necessárias para a obtenção de resultados com a qualidade exigida e o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos (Resolução RE nº 899) proporciona aos laboratórios analíticos, orientações sobre a melhor prática para o desenvolvimento de ensaios analíticos químicos e biológicos, sejam eles qualitativos e quantitativos, de rotina ou pesquisa. Esses documentos ressaltaram a importância da qualidade analítica dos resultados como um dos instrumentos fundamentais para proteção e promoção da saúde da população (RIBANI *et. al.*, 2004)

A Associação Brasileira de normas Técnicas (ABNT), uma das agências normativas associadas à ISO, elaborou uma Norma Brasileira (NBR) - Requisitos gerais para a competência de ensaio e calibração (ABNT NBR ISO/IEC 17025) como resultado da ampla experiência na implementação do ISO/IEC Guide 25. Ela possui todos os requisitos de laboratórios de ensaio e de calibração para atenderem um sistema de gestão, para serem tecnicamente competentes e para produzirem resultados tecnicamente válidos. Essa norma atual incorporou todos os requisitos da ABNT NBR 9001 que são pertinentes ao escopo de serviços e calibração cobertos pelo sistema de gestão do laboratório, porque eles operarão também de acordo com a série ISO 9000 (ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005)

Todos esses órgãos e normas listados acima exigem a validação de métodos analíticos como um requisito fundamental no credenciamento para a qualidade visando demonstrar a competência técnica do laboratório. O que se pode observar é que não há um procedimento normalizado que estabeleça o modo de execução do processo de validação de métodos. Esses documentos são recomendações, portanto deixa os analistas a flexibilidade de adaptá-los de acordo com o método a ser usado (BRITO *et. al.*, 2003).

2 METODOLOGIA

2.1 Planejamento

De acordo com a organização e estrutura do laboratório, o planejamento da validação analítica deve ser elaborado incluindo todos os seus pré-requisitos, desenvolvimentos e conclusões.

No caso de revalidação, os itens básicos que a execução da validação de métodos deve obter são:

- Definição da aplicação, do objetivo e do escopo do método;
- Elaboração do procedimento operacional padrão do método, que é um documento elaborado pelo analista com as etapas de execução do método descritas. Esse documento deve descrever as informações na ordem em que o usuário vai precisar delas. Nele devem constar: objetivo, responsabilidades, campo de aplicação, bibliografias, equipamentos, instrumentos, vidraria, reagentes, cálculos, exemplos de planilhas, critérios de avaliação e o tratamento das possíveis não-conformidades.
- Elaboração de um plano mestre de validação que organiza as atividades relativas à validação, contemplando o planejamento e etapas previstas, apresentando a relação de métodos analíticos a serem validados e respectivo cronograma, e estabelecendo responsabilidades a serem seguidas. Nele constam os procedimentos, equipamentos, responsabilidades e situações relacionadas aos métodos a serem validados;
- Verificação se das características de desempenho do equipamento em função do que é exigido pelo método em estudo, providenciando a elaboração ou revisão da instrução de operação e a qualificação do equipamento;
- Definição dos parâmetros de desempenho e critérios de aceitação da validação;
- Desenvolvimento do protocolo de validação, um plano que descreve o modo de execução a ser adotado e os critérios de aceitação para a validação de um determinado método analítico;
- Qualificação dos insumos, por exemplo, padrões, reagentes e matérias-primas;
- Execução dos experimentos preliminares de validação;
- Ajuste dos parâmetros do método e/ou critérios de aceitação, se necessário;
- Execução de experimentos completos de validação;
- Estimativa de incerteza do método;

- Revisão do procedimento operacional para execução do método, na rotina, se necessário;
- Definição dos critérios de revalidação (por exemplo, mudanças de pessoal, condições ambientais, equipamentos, periodicidade, etc); e
- Definição do tipo e frequência de verificações de controle da qualidade analítica para a rotina (SILVA, A. & CARVALHO, M. 2004).

2.2 Documentação de validação analítica

Uma vez cumpridas todas as etapas do processo de validação, é importante documentar os procedimentos de forma que o método possa ser implementado de maneira clara e sem ambigüidades. A documentação apropriada auxilia na aplicação consistente do método, já que, uma vez implantado o método, ele será sempre executado conforme descrito; caso contrário o desempenho real do método não irá corresponder àquele previsto nos dados de validação. 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.

A sistemática de controle de documentos do laboratório deve permitir a retirada de circulação dos documentos obsoletos e emissão de métodos revisados. As alterações devem ser realizadas somente por pessoas autorizadas.

Cada método analítico e o respectivo produto (matéria-prima, produto intermediário e produto acabado) corresponderão a um protocolo de validação, que deverá possuir objetivo, detalhes do produto, características e especificações do analito, nome do método analítico ou o número do documento que o descreve, plano de validação e critérios de aceitação (NICOLÓSI, M. 2003).

Na elaboração da documentação de validação, as seguintes etapas devem ser seguidas:

- Preenchimento das fichas de ensaio. – geralmente, constam no protocolo matriz. Elas devem ser preenchidas, no exato momento do ensaio, a caneta e com rasuras legíveis;
- Execução dos cálculos estatísticos em planilhas eletrônicas validadas para avaliar os critérios de desempenho do método. O responsável pela validação executa os cálculos e tira as conclusões pertinentes; e
- Elaboração do relatório de validação, que reporta os resultados obtidos, incluindo os critérios de aceitação atingidos e as conclusões. Nele devem estar detalhados, os registros do estudo de validação (massa das amostras, reagentes utilizados, temperatura de análise), os participantes, as documentações técnicas, as

condições de validação, vidrarias, instrumentos e equipamentos utilizados, resultados, observações, critérios de avaliação, não-conformidades, conclusão e declaração de validação (ABNT ISO/IEC 17025:2005).

2.3 Características de desempenho do método

Os métodos são classificados, na Tabela 1, de acordo com as aplicações, enquanto que as características de desempenho – parâmetros de validação – são avaliadas, segundo a Tabela 2.

Tabela 1: Classificação baseada na aplicação do método (USP 27, 2003)

Categoria	Descrição Conforme a Aplicação
I	Métodos analíticos para quantificação de macrocomponentes em matérias primas ou ingredientes ativos em produtos acabados.
II	Métodos analíticos para determinação de impurezas em matérias primas ou componentes de degradação em produtos farmacêuticos acabados.
III	Métodos analíticos para determinação de características físico-químicas em drogas a granel ou em produtos acabados (Exemplo: dissolução, tamanho de partículas, liberação da droga).
IV	Testes de identificação.

Tabela 2: Parâmetros de avaliação de acordo com a categoria do método (USP 27, 2003)

Parâmetro de Validação	Categoria I Ensaio	Categoria II - Ensaio		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Qualitativo		
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Limite de Detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de Quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Faixa	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Sim	-

* pode ser exigido dependendo da natureza do ensaio específico.

2.3.1 Especificidade e seletividade

A especificidade e a seletividade estão relacionadas ao evento da detecção. A especificidade é a capacidade que o método possui de medir exatamente uma substância específica independente da matriz da amostra e de suas impurezas. A especificidade refere-se a um método específico para um único analito e a seletividade refere-se a um método utilizado para vários analitos com capacidade de distinção entre eles. Um método seletivo é composto por uma série de medidas específicas. Nas situações onde o sistema é linear tem-se:

$$y = F * x \quad (1)$$

A medida para o componente k é específica quando apenas os termos $f_{i,k}$ ($i = 1, \dots, n$) são diferentes de zero. Aqui a matriz é chamada de F_{spec} e o valor de y é apenas em função de somente de x_k .

Para um método completamente seletivo, cada coluna da matriz F contém somente um elemento diferente de zero. Trocando-se as colunas pelas linhas, a matriz F passará a possuir todos os elementos diferentes de zero na diagonal. Essa matriz é chamada de F_{sel} . Na prática situações F_{spec} e F_{sel} contém outros elementos diferentes de zero. Esses elementos, entretanto, têm consideravelmente valores numéricos menores do que os valores correspondentes a $f_{i,k}$ ($i = 1, \dots, n$). Elementos indesejáveis diferentes de zero do F_{spec} e F_{sel} podem ser usados para descrições quantitativas de seletividade e especificidade. A fórmula que descreve o número de seletividade ζ_i , para cada coluna i do F_{sel} é:

$$\zeta = \frac{|f_{i,k}|}{\sum_{j < i}^n |f_{j,j}|} \quad (2)$$

Portanto, tanto os testes de especificidade quanto os testes de seletividade são executados para verificar se há interferência na determinação do analito (KATEMAN, G. 1981).

Os testes de especificidade têm como objetivo determinar os componentes que precisam ser analisados na amostra, assim é necessário definir a matriz bem como os possíveis interferentes. Para análise quantitativa (teor) e análise de impurezas, a especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras enriquecidas com quantidades apropriadas de impurezas e de amostras não enriquecidas,

para demonstrar se o resultado do teste é ou não afetado por esses materiais (SILVA, A. & CARVALHO, M. 2004)

Para os testes de seletividade, a matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. Neste caso, podem ser utilizados diversos testes dependendo da disponibilidade do analito, da matriz sem o analito e de amostras de referência nas concentrações de interesse. As ferramentas estatísticas como teste F de homogeneidade de variâncias e o teste t (Student) de comparação de médias podem ser aplicados para avaliação da seletividade. Partindo-se da hipótese em que a matriz não afeta o sinal do analito em níveis de concentração elevados ou acima da faixa, preparam-se dois grupos de amostras de teste, um com a matriz e o outro sem a matriz, ambos os grupos com a concentração do analito idêntica em cada nível de concentração de interesse. Com os valores obtidos nos dois grupos de amostras calcula-se o teste F e compara-se o valor do teste F experimental com o valor do teste F tabelado. Se o valor do teste F calculado for menor que o valor do teste F tabelado, a matriz não tem efeito significativo sobre a precisão do método, caso contrário a matriz interfere na precisão do método. O teste t (Student) deve ser calculado e comparado com o teste t tabelado, caso o valor calculado seja menor que o valor do teste t tabelado, a matriz não tem efeito significativo sobre o ensaio, caso contrário a matriz tem efeito estatisticamente significativo sobre o resultado do ensaio. O teste t de Student pode ser utilizado como fator decisivo caso o teste F calculado tenha um valor maior que o teste F tabelado, porém o teste t sempre deve ser calculado independente do resultado do teste F .

Como o número de amostras paralelas em cada nível de concentração deve ser maior ou igual a 7 (sete), para permitir o uso adequado dos modelos estatísticos e proporcionar uma comparação válida, para revalidação, os dados dos ensaios para avaliação da linearidade e da precisão podem ser aproveitados.

Para métodos em desenvolvimento, a avaliação da seletividade ou especificidade é o primeiro passo para validação (SILVA, A & CARVALHO, M. 2004).

2.3.2 Faixa de aplicação e linearidade

A faixa de aplicação linear é definida como a faixa de concentrações na qual a sensibilidade pode ser considerada constante e são normalmente expressas nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico. Para escolher a faixa de trabalho, em métodos em desenvolvimento, procede-se da seguinte maneira: quando se tem uma amostra específica, a concentração esperada deve se situar no meio da faixa de trabalho e quando a concentração do analito é desconhecida utiliza-se a faixa de trabalho estudada para amostras diversificadas. Os valores medidos têm que estar dentro da faixa de trabalho,

e os valores medidos próximos ao limite inferior da faixa de trabalho devem ser diferente dos brancos dos métodos (BARROS, C. B. & HIRATA, Y. S. 2004).

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Ela é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática. A equação reduzida da linha reta, usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real, é dada pela expressão:

$$y = a + bx \quad (3)$$

onde, a é o coeficiente linear, b é o coeficiente angular, y é o resultado da análise e x é o valor nominal.

O coeficiente de correlação linear r é freqüentemente usado para indicar a adequabilidade da curva como modelo matemático porque estima se os pontos experimentais se ajustam bem a uma reta. Seus valores podem variar de -1 até +1, mas para avaliação de linearidade, um valor maior que 0,90 é, usualmente, requerido. Seu valor r é definido pela seguinte expressão:

$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \hat{x})(y_i - \hat{y})\}}{\sqrt{\left[\sum_i (x_i - \hat{x})^2 \right] \left[\sum_i (y_i - \hat{y})^2 \right]}} \quad (4)$$

O erro padrão estimado $S_{y/x}$, da reta de regressão linear simples, mede o desvio médio entre os valores reais de y_i e os valores estimados de \hat{y} . Ele informa de modo aproximado o quanto grande são os erros de estimativa em relação aos dados da amostra. É medido na unidade de y_i e o que se busca é diminuir o valor desse erro. Assumindo que os desvios são normalmente distribuídos, pode-se dizer então que a 68% de grau de confiança dos pontos plotados, $S_{y/x}$ encontra-se dentro de um desvio padrão variando de -1 até +1:

Sendo os desvios normalmente distribuídos a fórmula de $S_{y/x}$ é obtida da definição da variância da amostra $S_{y/x}^2$, com $n - 2$ graus de liberdade:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \quad (5)$$

O erro padrão existirá sempre que o poder de explicação da reta não for completo. O valor do erro significa então que existem outros fatores que interferem no comportamento de y além da variável x .

Depois de obter o $S_{y/x}$, podemos calcular o desvio padrão do coeficiente angular S_b e o desvio padrão do coeficiente linear S_a :

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \hat{x})^2}} \quad (6) \quad \text{e} \quad S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \hat{x})^2}} \quad (7)$$

Os valores de S_a e S_b são utilizados para estimar os limites de confiança, a 95% de grau de confiança, dos coeficientes angulares e lineares da reta de regressão linear, da seguinte maneira:

$$IC_a = a \pm tS_a \quad (8) \quad \text{e} \quad IC_b = b \pm tS_b \quad (9)$$

O método pode ser considerado como livre de tendências (*unbiased*), ou melhor, livre de erros sistemáticos significativos, se o intervalo de confiança do coeficiente de regressão linear IC_a contiver a origem (INMETRO, DOQ-CGRE-008:2003).

O estudo da linearidade pode ser realizado preparando-se, pelo menos, soluções padrão, em triplicata, em cinco níveis de concentração, mais o branco de solução. Cada uma das soluções padrão deve ser analisada pelo menos três vezes. No caso de revalidação, se possível, aproveita-se a curva analítica do método.

A sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito. Pode ser expressa por b da curva de regressão linear de calibração, e é determinada simultaneamente aos testes de linearidade. A sensibilidade depende da natureza do analito e da técnica de detecção utilizada (BARROS, C. B. & HIRATA, Y. S. 2004).

2.3.3 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção LD é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. O LQ é o menor sinal x que a realmente $1-\alpha$ (nível de

confiança) pode ser considerado como sendo a medição de um analito (KATEMAN, G. 1981).

Se o branco de solução c_0 e a amostra c_i , onde c é a concentração, são analisadas repetidamente, obtém-se os sinais médios das soluções em branco \bar{X}_0 e das amostras \bar{X}_1 . Se a magnitude do sinal x_k é utilizada como critério para presença do componente, a probabilidade α que o sinal observado $x > x_k$ é causado pela leitura da solução branca é:

$$\alpha = \int_{x_k}^{\infty} P_0(x) dx \quad (10)$$

onde, $P_0(x)$ é probabilidade de distribuição de x_0 e $P_1(x)$ é probabilidade de distribuição de x_1 .

A probabilidade β indica que o sinal observado será menor do que x_k e é causado pela amostra c_i é:

$$\beta = \int_0^{x_k} P_1(x) dx \quad (11)$$

onde, α é probabilidade do erro tipo I e β é probabilidade de erro tipo II.

Se $P_0(x) = P_1(x)$ e $\alpha = \beta$, então x_k é o ponto de intersecção de duas probabilidades de distribuição.

Portanto, seguindo esse raciocínio, o LD pode ser definido:

$$x = \bar{X}_0 + k\sigma_0 \quad (12)$$

onde, \bar{X}_0 é a média dos sinais das soluções em branco, σ_0 é o desvio padrão da probabilidade de distribuição de $P_0(x)$ de x_0 e k o fator fixado por $P_0(x)$, referente ao valor de $1-\alpha$.

A concentração derivada do sinal de x é:

$$c = \frac{\bar{X}_0 + k\sigma_0}{S} \quad (13)$$

onde S , é a sensibilidade, ou seja, o coeficiente angular da reta de regressão linear e k pode ser obtido por vários meios.

Quando a probabilidade de distribuição de x_0 é conhecida com confiança suficiente e provada por ser gaussiana, α e k são tabelados. Para validação de métodos, utiliza-se, na

maioria dos casos, o valor de α igual a 0,0013 ($1 - \alpha = 99,87\%$) para um k igual a três (KATEMAN, G. 1981).

O LD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica. Para testes qualitativos em *kits* o método visual é o ideal. Para testes em que o branco dá um sinal ou em equipamento ruído, o cálculo pode ser feito verificando a resposta do ruído de fundo usando a solução branca e calculando seu desvio padrão. O desvio padrão multiplicado-se por três é uma estimativa da incerteza da detecção.

Para testes em que a solução branco não dá nenhum tipo de resposta, o limite de detecção é determinado diluindo-se as concentrações do primeiro ponto da curva de calibração até o zero, geralmente, são sete soluções. Portanto ele é obtido, multiplicando-se o desvio padrão do coeficiente linear por três e dividindo pelo coeficiente angular.

O limite de quantificação LQ ou limite de determinação é o menor valor determinado, em confiabilidade de precisão e exatidão aceitáveis, para aquela condição analítica. Para se obter o LQ utiliza-se o mesmo procedimento da determinação do limite de detecção e multiplica o desvio padrão determinado por dez.

A diferença entre os limites LD e LQ é a ordem de grandeza das incertezas associadas.

Na verdade existem outras estimativas, o importante é selecionar a mais coerente com a especificação do método e reproduzir uma resposta com precisão. O limite de detecção deve está na mesma unidade que o resultado final do método (SILVA, A & CARVALHO, M. 2004).

2.3.4 Exatidão

A exatidão definida como o grau de concordância ou a compatibilidade entre os resultados individuais encontrados e um valor de referencia, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos. Normalmente, a exatidão é a diferença (erro ou tendência) entre a média \bar{X} de um grupo de resultado e valor aceito como verdadeiro \hat{x} (INMETRO, DOQ-CGRE-008:2003).

Além de ensaios de recuperação, pode-se obter avaliação da exatidão por comparação com outro método equivalente de exatidão conhecida e por programas interlaboratoriais.

Além do erro relativo, uma outra ferramenta a ser utilizada nessa avaliação é a reta de regressão linear, ou seja, através do estudo de linearidade pela curva de regressão linear. Nesse caso, coloca-se no eixo y a concentração obtida do analito e no eixo x a

concentração nominal. Calculando os coeficientes angulares e lineares com seus intervalos de confiança, obtém-se a análise da exatidão pois, o IC_a deverá conter o um e o IC_b deverá conter o zero de origem (BARROS, C. B. & HIRATA, Y. S. 2004).

Na Tabela 3 estão listados os critérios de aceitação para exatidão, recomendados pela AOAC 2000, de acordo com a ordem grandeza da análise:

Tabela 3: Critério de aceitação para exatidão (AOAC, 2000)

Concentração	Concentração Fracional	Recuperação média %
100%	1,0	98 – 102
10%	0,1	98 – 102
1%	0,01	97 – 103
0,1%	0,001	95 – 105
0,01%	0,0001	90 – 107
1 mg/L	0,000001	80 – 110
10 µg/L	0,00000001	60 – 115

2.3.5 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra, onde as duas formas mais comuns de expressá-la são pelo desvio padrão S e o desvio padrão relativo ou coeficiente de variação CV definidos pelas equações:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \hat{x})^2}{(n-1)}} \quad (14)$$

e

$$CV = \frac{S}{x} * 100 \quad (15)$$

onde, S é expresso na unidade de medida da amostra e CV em percentagem.

A precisão, podendo ser descrita qualitativamente e quantitativamente, é a medida da dispersão dos resultados, quando um procedimento analítico é repetido para uma amostra. Essa dispersão de resultados pode ser causada por muitas fontes. É comum descrever a precisão apenas para fontes de erros aleatórios resultantes a valores que não pertencem a uma distribuição normal. Antes da análise da precisão, deve-se avaliar a distribuição dos dados, que não sendo normal, o ensaio deve ser repetido.

2.3.5.1 Repetitividade

Repetitividade é a precisão intra-corrída, ou seja, o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas, efetuadas sob as mesmas condições de medição. Todas as medições com o mesmo procedimento; mesmo analista; mesma instrumentação, dentro de um curto período de tempo. A repetitividade pode ser determinada por meio da análise de padrões, material de referência ou adição ao branco de várias concentrações da faixa de trabalho. A partir do desvio padrão dos resultados dos ensaios sob condição de repetitividade S_r , calcula-se o limite de repetitividade r , definido pela fórmula 16, que capacita o analista a decidir se a diferença entre análises duplicatas de uma amostra é significativa para um nível de confiança de 95%.

$$r = 2,8 * S_r \quad (16)$$

Sugerem-se no mínimo seis repetições independentes para avaliação da repetitividade (INMETRO, DOQ-CGRE-008:2003).

2.3.5.2 Reprodutibilidade intralaboratorial

Mais conhecida como precisão intermediária, a reprodutibilidade intralaboratorial é a precisão intercorridas, ou seja, refere-se à concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de dois dias diferentes com analistas diferentes. Existem vários métodos para determinação e controle desse parâmetro de qualidade, como por exemplo, por meio de gráfico de controle de amplitude, que poderão ser aplicados para replicatas de amostra e para padrões estáveis ao longo do tempo. A partir do desvio padrão ponderado obtido sob condições de reprodutibilidade intralaboratorial S_R , definido pela equação 17, é possível calcular o limite de reprodutibilidade R , definido pela equação 18, o qual permite ao analista decidir se a diferença entre os valores da duplicata das amostras analisadas sob condições de reprodutibilidade é significativa (INMETRO, DOQ-CGRE-008:2003).

$$S_R = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2} \quad (17)$$

onde: S_R é o desvio padrão ponderado; t é o total de amostras ensaiadas; n é total de ensaios por amostra; k é o número da amostra j , $k=1$; y_{jk} é o valor do resultado k para amostra j ; e \bar{y}_j é a média aritmética das amostras j .

$$R = 1,96 * S_R * \sqrt{t} \quad (18)$$

De acordo com ISO 5725-5:1994, um número mínimo de análises é exigido para uma boa estimativa de precisão intermediária, ou seja:

$$k(n-1) > 15 \quad (19)$$

2.3.5.3 Reprodutibilidade interlaboratorial

Reprodutibilidade interlaboratorial, ou seja, o grau de concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos. 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 através de comparação interlaboratorial. Ela é geralmente avaliada nos ensaios de proficiência entre laboratórios (INMETRO, DOQ-CGRE-008:2003).

Na Tabela 4 estão listados os critérios de aceitação para precisão, recomendados pela AOAC 2000, de acordo com a ordem grandeza da análise:

Tabela 4: Critério de aceitação para precisão (AOAC, 2000)

Concentração	Concentração Fracional	CV _r %	CV _R %
100%	1,0	1,0	2,0
10%	0,1	1,5	2,8
1%	0,01	2,0	4,0
0,1%	0,001	3,0	5,7
0,01%	0,0001	5,0	8,0
1 mg/L	0,000001	10	16
10 µg/L	0,00000001	20	32

Na validação analítica é normal a comparação entre analistas, tempo (dias), metodologias e equipamentos, chamados de fatores. Geralmente essas análises são

realizadas com os dados de precisão. Dentre diversas ferramentas estatísticas utilizadas para avaliação da equivalência de ensaios, levando-se em consideração um fator por vez (estatística univariada), existem três maneiras de comparar grupos de ensaios. Nessas condições, por testes de hipóteses, de acordo com o número de grupos k : teste F e teste t Student, para $k = 2$; e análise da variância para $k > 2$ (BARROS, C. B. & HIRATA, Y. S. 2004).

2.3.6 Robustez

A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este apresenta em face de pequenas variações. Um método diz-se robusto se revelar ser praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando este está sendo executado (BARROS, C. B. & HIRATA, Y. S. 2004).

Para avaliar a robustez de um método de ensaio precisa-se recorrer a análises que permitam ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações, como, por exemplo, na otimização e no planejamento de experimentos.

A robustez é considerada nos primeiros passos do desenvolvimento do método, mas para revalidação ela não se aplica.

2.4 Estatística aplicada a validação de métodos

Nesse capítulo serão apresentadas as ferramentas estatísticas mais aplicáveis na validação de métodos analíticos. Antes de verificar qualquer parâmetro analítico, analisa-se num conjunto de dados se há algum valor inconsistente com outros membros da série de dados. Essa avaliação de valores dispersos pode identificar causas assinaláveis e problemas na análise.

A ferramenta estatística utilizada foi o Gráfico de Box que identifica *outlier* ou extremos em uma determinada distribuição que independe do número de dados dentro do conjunto. No Gráfico de Box aplica-se o *percentil* que são medidas de posição, onde n é número de casos, p é o valor percentual dividido por 100 (por exemplo, $50/100 = 0.5$, para mediana) e $X_{(n+1)p}$ é o método para o cálculo de *percentil*. Para essa avaliação:

a) Coloca-se os valores em ordem crescente.

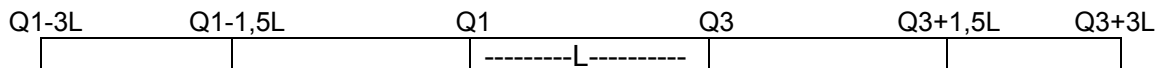
b) Identifica-se $n =$ número de medições.

c) Calcula-se $(n+1)p = j+g$ (20) para $p=0,25$ (primeiro quartil - Q1) e para $p=0,75$ (terceiro quartil - Q3). Onde j será o número inteiro correspondente a ordem crescente e o g será a parte fracionária utilizando-se apenas no cálculo do percentil.

d) Calcula-se o primeiro e o segundo percentil = $(1-g)x_j + g(x_{j+1})$ (21), onde x_j é o j ésimo termo e o x_{j+1} é o j ésimo + 1 termo.

e) Subtrai-se o quartil superior (Q3) do quartil inferior (Q1) = L .

Os valores que estiverem no intervalo de $Q3+1,5L$ (22) e $Q3+3L$ (23) e no intervalo $Q1-1,5L$ (24) e $Q1-3L$ (24) , serão considerados *outlier* podendo, portanto ser aceitos na população com alguma suspeita. Já os valores que forem maiores que $Q3+3L$ e menores que $Q1-3L$ deverão ser considerados suspeitos de pertencer à população, sendo investigada a origem da dispersão. Tais pontos serão chamados de extremos.



Os limites para rejeição dentro dos critérios, são:

a) $n < 10\%$ de rejeição: os valores são rejeitados sem problemas.

b) $10\% < n \leq 20\%$ de rejeição: avaliação dos resultados pelo responsável.

c) $n > 20\%$: não aceitável todo conjunto deve ser rejeitado.

Dentro desses limites de rejeição, ao rejeitar os *outliers*, verifica-se, novamente, a distribuição dos dados e persistindo a não-normalidade dos mesmos, recomenda-se repetir o ensaio.

Em seguida, a normalidade da distribuição dos dados deverá ser investigada. Nos ensaios físico-químicos, geralmente, todas as distribuições são normais. Essa verificação é a maneira que os resultados se apresentam em forma de sino. Para uma distribuição normal, de média da população (μ) e de desvio padrão da população (σ), um intervalo da média da população $\pm n$ vezes o desvio padrão ($\mu \pm n\sigma$), contém uma porcentagem conhecida dos valores da população, qualquer que seja o valor de n , inteiro ou fracionário. Em outras palavras, essa equação representa a probabilidade de localizar um elemento da população em um intervalo em torno de μ . Na Figura 1, as amostras podem ser descritas como uma curva gaussiana, que é caracterizada pela posição da média mais a metade da curva, proporcional ao desvio padrão. (KATEMAN, G. 1981).

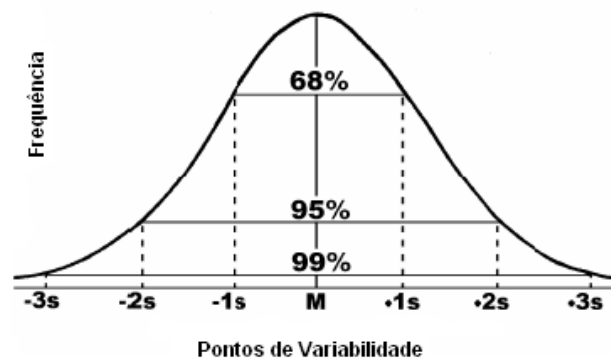


Figura 1: Representação da curva gaussiana de uma distribuição normal (KATEMAN, G. 1981)

A verificação da normalidade é um procedimento não-compulsório, mas é uma recomendação essencial para garantia de certas inferências. O teste estatístico que quantifica de forma objetiva a distribuição de dados é o *Shapiro-Wilk* e para maior confiabilidade, o número de valores tem que variar de $3 < n < 50$ com um nível de significância de 5%.

Na aplicação dessa ferramenta estatística:

- a) Ordena-se os valores em ordem crescente
- b) Forma-se subtrações: $(x_{(n+1)-i} - x_i)$ (26), conforme n seja para ou ímpar.
O índice i varia 1 a $n/2$ ou de 1 a $n+1/2$, conforme n seja para ou ímpar.
- c) Forma-se os produtos: $a_i(x_{(n+1)-i} - x_i)$ (27).
- d) Calcula-se a soma: $SW = \sum (x_i - x_m)^2$ (28).
- e) Calcula-se a razão: $W = SW^2/SQT$ (29).
- f) Compara-se o valor de W com o valor de W_s (95%) fornecido na tabela estatística.

Se $W > W_s$, rejeita-se a hipótese de não-normalidade, agora se $W < W_s$, aceita-se a hipótese de não-normalidade, a partir daí avalia-se a discrepância dos resultados e repete-

se o ensaio. Em ensaios robustos, ou seja, repetitivos, certamente obtém-se os mesmos valores, portanto não se aplica a distribuição normal porque não há dispersão.

Depois, aplicam-se ferramentas estatísticas triviais para todos os parâmetros analíticos assim como a média aritmética \bar{x} que é o resultado da soma de valores dividida pelo número de valores de n observações independentes. Representa a tendência central mais comum, dado pela fórmula:

$$\bar{x} = \left(\frac{1}{n}\right) \sum x_i \quad (30)$$

Outra ferramenta muito utilizada é a variância s^2 que é uma medida de dispersão, ou seja, a soma dos desvios quadráticos das observações de sua média aritmética dividida pelo número de observações menos um.

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum (x_i - \bar{x})^2 \quad (31)$$

Já o desvio padrão s é a raiz quadrada positiva da variância ($s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$) (32). Ele supera um sexto da amplitude e é inferior a um terço da mesma ($R/6 < s < R/3$),

portanto, pode ser estimado através da amplitude ($s = \frac{R}{d_2}$) (33) onde d_2 é um fator tabelado

e R é a amplitude, ou seja, a diferença entre o maior e o menor valor de um conjunto de observações. É uma medida de dispersão, ou seja, largura da distribuição normal.

O coeficiente de variação $CV\%$ é o desvio padrão relativo, ou seja, a razão percentual entre o desvio padrão e a média de uma amostra que nos permite comparar duas distribuições diferentes. É definido pela fórmula:

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (34)$$

Os testes de hipóteses ou de significância são ferramentas estatísticas que permitem fazer comparações e interpretações objetivas a partir de dados experimentais. No entanto, pelo fato de se basear em amostras, nunca se pode assegurar que a decisão seja absolutamente correta. As chamadas hipóteses nulas H_0 possuem uma afirmação que é verificada através dos testes. Neste contexto, as seguintes regras são válidas:

- H_0 é sempre uma afirmação (positiva), como por exemplo, $H_0: \bar{X} = \mu$;
- Toda hipótese nula tem uma hipótese alternativa (H_1) que é confirmada se a hipótese nula é rejeitada. Como por exemplo: $H_1: \bar{X} \neq \mu$; $H_1: \bar{X} < \mu$; e $H_1: \bar{X} > \mu$;

- Cada teste tem validade somente para um certo nível de confiança (p), definido para análise. Assim, o teste tem um nível de significância (α), sendo $\alpha = 1 - p$. Geralmente, para validação e revalidação de métodos, usa-se um nível de confiança de 0,95 e $\alpha = 0,05$. O nível ou grau de confiança ($1 - \alpha = p$) é comumente expresso como valor percentual equivalente que é a probabilidade do intervalo de confiança conter o verdadeiro valor do parâmetro populacional. Para métodos analíticos, a probabilidade mais utilizada é de 95% ou grau de confiança mais utilizado é de 0,05 (1-0,95).
- A não rejeição da hipótese nula não indica que ela seja verdadeira. Ou seja, para aquele nível de confiança, não há diferença estatisticamente significativa;
- Todo teste estatístico pode resultar em um erro de julgamento, pois o nível de confiança nunca é de 100%. São dois os tipos de erros possíveis: o tipo I ou erro α que é a rejeição da hipótese nula quando ela é verdadeira; e o tipo II ou erro β que é a não rejeição da hipótese nula quando ela não é verdadeira.

Quando o teste pretende verificar se um determinado resultado é maior que, ou menor que o valor aceito, por exemplo, o teste deve ser monocaudal, com o valor integral de α deslocado para a direita ou para esquerda na curva gaussiana, respectivamente. Agora, quando o teste pretende verificar se um determinado resultado é igual a, ou diferente do valor aceito, por exemplo, o teste deve ser bicaudal, uma vez que a diferença entre os dois valores pode estar em um lado ou outro da curva gaussiana, representada abaixo.

As variâncias S^2 de dois grupos, com seus respectivos graus de liberdade ($\nu_1 = n_1 - 1$ e $\nu_2 = n_2 - 1$), podem ser comparadas por meio do Teste F, proposto por Snedecor, em 1934, em homenagem a Fisher, onde:

$$F = \frac{S_{maior}^2}{S_{menor}^2} \quad (35)$$

onde F é a razão entre a maior variância e a menor variância.

Para encontrar o F crítico (F_c), consulta-se a tabela de distribuição de F , de acordo com os graus de liberdade e o nível de confiança. O F calculado deve ser comparado com F_c . Comparando-se os testes de hipótese: $H_0: S_1^2 = S_2^2$ e a $H_1: S_1^2 \neq S_2^2$. Para o $F > F_c$, rejeita-se a H_0 , onde para o nível escolhido, a diferença entre as variâncias é significativa.

As médias são comparadas através de teste t Student. Os três tipos, apresentados, pressupõem uma distribuição normal dos valores da população:

- Média de uma amostra com valor padrão, onde:

$$H_0: \bar{X} = \mu \text{ onde, } t_{calc} = \frac{\bar{X} - \mu}{\frac{S}{\sqrt{n}}} \quad (36) \text{ para } n - 1 \text{ graus de liberdade;}$$

- Média de duas séries de dados independentes, onde:

$$H_0: \bar{X}_1 - \bar{X}_2 = d = 0 \text{ e a } H_1: S_1 \neq S_2 \text{ onde, } t_{calc} = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sqrt{\left(\frac{S_1^2}{n_1}\right) + \left(\frac{S_2^2}{n_2}\right)}} \quad (37)$$

para o menor entre $n_1 - 1$ e $n_2 - 1$ graus de liberdade; e

- Média de duas séries de dados emparelhados, onde:

$$H_0: \bar{d} = 0 \text{ onde, } \bar{d} \text{ é a média das diferenças entre os pares } t_{calc} = \frac{\bar{d} \sqrt{n}}{S_d} \quad (38) \text{ para números}$$

pares -1 de graus de liberdade (BARROS, C. B. & HIRATA, Y. S. 2004).

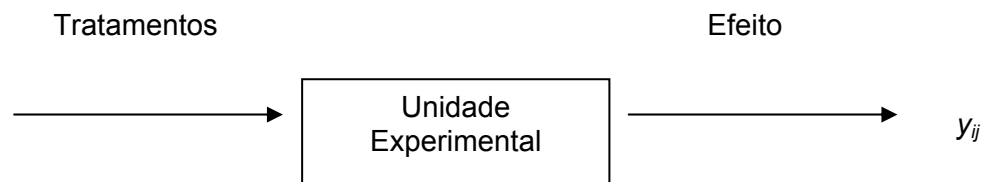
O parâmetro do teste t_{calc} deve ser comparado com o t crítico (t_c), encontrado na tabela de distribuição de t de Student, para o número de graus de liberdade especificado para cada caso e para o nível de significância α escolhido para avaliação.

Se $t_{calc} < t_c$, não rejeita-se a hipótese nula, indicando que, para o nível de significância escolhido, a diferença não é suficientemente grande para rejeitar a hipótese nula.

Se $t_{calc} > t_c$, rejeita-se a hipótese nula, indicando que, para o nível de significância escolhido, a diferença entre as médias é significativa.

A análise de variância, conhecida como ANOVA, possibilita separar e estimar as diferentes causas de variação para mais de dois grupos de comparação ou seja, verifica se as médias de dois ou mais grupos são diferentes.

Considerando esquematicamente um experimento, tem-se:



onde y_{ij} são as observações numéricas referente a uma variável resposta sobre as n unidades experimentais. As observações y_{ij} podem ser acomodadas numa estrutura conforme a que é apresentada na Tabela 5:

Tabela 5: Estrutura dos dados para o delineamento com qualquer número de tratamentos e repetições iguais (RANGEL, C. 2004).

Tratamentos	Repetições				Totais de Tratamentos	Médias de Tratamentos
	1	2	...	r		
1	y_{11}	y_{12}	...	y_{1r}	$y_{1.}$	$\bar{y}_{1.}$
2	y_{21}	y_{22}	...	y_{2r}	$y_{2.}$	$\bar{y}_{2.}$
⋮	⋮	⋮	y_{ij}	⋮	⋮	⋮
t	y_{t1}	y_{t2}	...	y_{tr}	$y_{t.}$	$\bar{y}_{t.}$
					$y_{..}$	$\bar{y}_{..}$

Na Tabela 5, y_{ij} denota a observação da j -ésima repetição do tratamento i , onde $i = 1, 2, \dots, t$ é o índice de tratamento; $j = 1, 2, \dots, r$ é o índice de repetição. Os totais dos tratamentos são designados $y_{i.}$, em que o índice $i.$ (i ponto) significa que as repetições j do tratamento foram somadas. Da mesma forma, $\bar{y}_{i.}$ representa a média ($y_{i.}/r$) do tratamento

i. O total geral é:

$$y_{..} = \sum y_{ij} \quad (39)$$

e a média geral é

$$\bar{y}_{..} = \sum y_{ij} / rt = y_{..} / rt. \quad (40)$$

No delineamento casual a variação total é decomposta em duas partes: a variação entre os tratamentos e a variação entre as unidades experimentais com o mesmo tratamento.

Comprova-se algebricamente que:

$$\sum_i \sum_j (y_{ij} - \bar{y}_{..})^2 = r \sum_i (\bar{y}_{i.} - \bar{y}_{..})^2 + \sum_i \sum_j (y_{ij} - \bar{y}_{i.})^2 \quad (41)$$

O termo $\sum (y_{ij} - \bar{y}_{..})^2$ é chamado soma dos quadrados totais *SQ Total*. Representa a variação de todas as observações em torno da média geral.

O termo $r \sum (\bar{y}_{i.} - \bar{y}_{..})^2$ é chamado soma dos quadrados dos tratamentos *SQ Tratamentos* ou *SQT*. Representa a variação das médias dos tratamentos em torno da média geral ou a variação entre os tratamentos ou devida a tratamentos.

Enfim, o termo $\sum (y_{ij} - \bar{y}_{i.})^2$ é chamado soma dos quadrados do erro experimental *SQ Erro* ou *SQE* que representa a variação dentro dos tratamentos, isto é, a variação entre as unidades experimentais com o mesmo tratamento, ou a variação devida ao erro experimental, que não é de responsabilidade dos tratamentos.

Os três termos têm, respectivamente, $(rt - 1)$, $(t - 1)$ e $t(r - 1)$ graus de liberdade, de forma que $(rt - 1) = (t - 1) + t(r - 1)$.

Ainda que essas somas dos quadrados possam ser obtidas pelas equações dadas, é preferível usar equações transformadas, mais adaptadas aos procedimentos computacionais:

$$\text{SQ Total} = \sum y_{ij}^2 - \frac{y_{..}^2}{rt} \quad (42)$$

$$\text{SQ Tratamentos} = \text{SQT} = \frac{\sum y_{i.}^2}{r} - \frac{y_{..}^2}{rt} \quad (43)$$

$$\text{SQ Erro Experimental} = \text{SQE} = \text{SQ Total} - \text{SQT} \quad (44)$$

A soma dos quadrados para erro experimental, mesmo que possa ser calculada diretamente, é determinada mais facilmente por subtração. Isto, como decorrência da equação geral de subdivisão da soma dos quadrados total. Por esta razão o erro experimental é também denominado resíduo ou discrepância.

O termo $y_{..}^2/rt$ é o fator de correção, *FC*. A análise de variância é estruturada numa tabela especial denominada tabela da análise de variância. A Tabela 6 é o modelo geral para a análise da variância de um experimento conduzido no delineamento casual.

Tabela 6 – Modelo geral de análise de variância (ANOVA) – (RANGEL, C. 2004)

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos (Entre tratamentos)	t - 1	SQT	QMT	$\frac{QMT}{QME}$
Erro Experimental (Dentro dos tratamentos)	t(r - 1)	SQE	QME	
Total	rt - 1	SQ Total		

Após o cálculo das somas dos quadrados, calculam-se os quadrados médios QM_T , para tratamentos e QM_E para o erro experimental, dividindo as somas dos quadrados pelos respectivos graus de liberdade.

A hipótese nula H_0 que se formula é de que não há diferença entre as médias dos tratamentos ($H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_t$). Outras maneiras de formular a hipótese nula são as seguintes: não há diferença entre os efeitos dos tratamentos ou os efeitos de tratamentos são nulos ($H_0: \tau_i = 0$), ou a variância dos efeitos dos tratamentos é igual a zero ($H_0: \sigma_\tau^2 = 0$). O teste da hipótese de nulidade é dado por:

$$F = \frac{QMTratamentos}{QMErroExperimental} \quad (45)$$

O F calculado é comparado com o dado na tabela de distribuição F para $(t - 1)$ e $t(r - 1)$ graus de liberdade, respectivamente, de tratamentos e do erro experimental. Se for maior que o dado para o nível 5%, a diferença é dita significativa ($p < 0,05$); será muito significativa quando F calculado for maior do que o dado para o nível 1% ($p < 0,01$). No caso de F calculado ser menor do que o tabelado, não há diferença significativa entre os tratamentos.

O teste F é essencialmente a comparação da variância das médias dos tratamentos com a variância do erro experimental. O erro experimental representa a variação aleatória entre as unidades experimentais com o mesmo tratamento, acrescida das variações de erros de técnicos cometidos durante a condução do experimento. Se a variação entre as médias dos tratamentos for semelhante à variação do erro experimental, a relação será aproximadamente igual à unidade. Neste caso, a diferença entre as médias não será significativa e poderá ser atribuída à variação de amostragem. Para que a diferença entre as médias tenha significância estatística, o valor F calculado deverá ser bem maior do que a unidade. Quando isto sucede, a variação entre as médias dos tratamentos incluirá, além da variação do erro experimental, uma variação devida ao efeito intrínseco dos tratamentos.

Para tanto a avaliação de precisão pode de ser feita por ANOVA, ou seja:

- o S_{entre}^2 corresponde a variância de repetitividade; e
- o S_{entre}^2 corresponde a variância de reprodutibilidade interlaboratorial.

Outras ferramentas que avalias se um processo de medida está sob controle estatístico são os gráficos de controle que permitem perceber quando os resultados analíticos passam a ser afetados por uma causa especial de erro; nesse momento, é necessário procurar, identificar e eliminar a causa especial, para que não se torne uma fonte de erro sistemático permanente.

A carta de controle é a representação gráfica, na qual os valores estão apresentados sequencialmente. No controle de um procedimento analítico, a distribuição normal de freqüência dos resultados normalmente obedece ao modelo gaussiano ou normal, portanto o gráfico empregado para fins de controle de estabilidade de um processo analítico requer o estabelecimento das condições de processo sob controle, ou a certeza de que os resultados são afetados somente por erros aleatórios inerente ao processo e o conhecimento das características do método nessas condições, em termos da média e dispersão dos resultados.

Por meio de repetições, os resultados devem ser distribuídos em vários subgrupos k , cada um com um número definido de dados n , de preferência constante. Em cada subgrupo,

é possível calcular a média \bar{x} e a dispersão dos resultados usualmente calculada como amplitude R . Para um conjunto de subgrupos é possível calcular a média das médias ou a grande média $\bar{\bar{x}}$ e a média das amplitudes \bar{R} (MONTGOMERY, D. C. 2004).

As repetições dentro de um subgrupo devem ser independentes, incluindo todas as fontes de variação aleatória possíveis, tais como: temperatura ambiente, analista, variação de corrente elétrica, equipamentos e outros. O material padrão a ser analisado deve ser disponível em quantidade suficiente para durar não só o tempo de estudo inicial, mas também um período relativamente longo de controle, sendo desejável que permaneça seis meses ou mais sem perder as características.

As figuras 2 e 3 mostram uns típicos gráficos de controle das médias e das amplitudes para o monitoramento da exatidão e da precisão do método, respectivamente. Cada um desses parâmetros tem os seus valores médios representados no eixo vertical e a seqüência das ocasiões de análise no eixo horizontal.

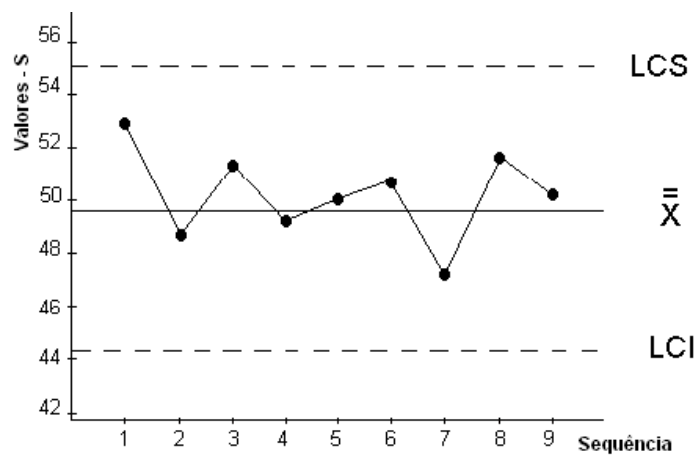


Figura 2: Gráfico de controle das médias de *Shewart* (HIRATA, Y. S. 2002)

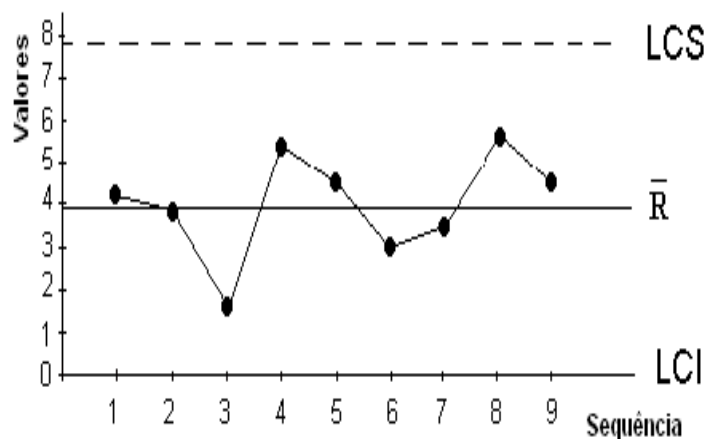


Figura 3: Gráfico de controle das amplitudes (HIRATA, Y. S. 2002)

Cada um deles tem uma linha central, \bar{x} e \bar{R} , e duas linhas, uma acima e outra abaixo da linha central, chamadas de limites de controle superior e inferior, LCS e LCI , respectivamente. Nas cartas médias, esses limites estão situados a $\bar{x} \pm 3s$ (46). Já nas cartas das amplitudes estão situados \bar{RD}_3 (47) e \bar{RD}_4 (48), onde D_3 e D_4 são coeficientes tabelados em função do desvio padrão das amplitudes e número de repetições. Os LC dos gráficos das médias representam o intervalo de confiança da grande média em torno de um valor médio obtido a partir de amostras de tamanho n .

No início da implantação de um gráfico de controle, os limites de controle preliminares são calculados a partir de alguns subgrupos, que totalizem 25 a 30 repetições independentes. Os limites de controle definitivos são traçados quando existirem cerca de 25 subgrupos, ou cerca de 100 repetições. Esses limites definitivos devem ser revistos a cada 25 subgrupos, aproximadamente.

Qualquer ponto fora desses limites é sinal de alerta, para verificar a existência de uma causa aleatória, identifica-la e eliminá-la. Caso um ponto fora dos limites tenha uma explicação conhecida e notificada pelo analista, ele é retirado do gráfico com o devido registro dessa operação.

A sensibilidade do gráfico na detecção de causa especial de erro depende do número de repetições dentro dos subgrupos. Quanto maior for o n , maior será a sensibilidade (MONTGOMERY, D. C. 2004).

As principais vantagens dos gráficos de controle na aplicação de validação de métodos é o aparecimento de erros sistemáticos, o fornecimento de informações quanto ao status do processo, a permissão da estimativa de incerteza, o fornecimento de evidências objetivas para a demonstração da qualidade das medições e o início da elaboração de uma forma de manter dados históricos sobre o processo (HIRATA, Y. S. 2002).

2.5 Estimativa de incerteza

Quando se relata o resultado de medição de uma grandeza física é obrigatória que seja dada alguma indicação quantitativa da qualidade do resultado, de forma tal que aqueles que o utilizam possam avaliar sua confiabilidade. Sem essa indicação, resultados de medição não podem ser comparados, seja entre eles mesmos ou com valores de referência fornecidos numa especificação ou numa norma. É, portanto necessário que haja um procedimento prontamente implementado, facilmente compreendido e de aceitação geral para caracterizar a qualidade de um resultado de uma medição, isto é, para avaliar e expressar sua incerteza; ou seja, laboratórios de ensaios devem ter e aplicar procedimentos para estimativa da incerteza de medição. Em certos casos a natureza do método de ensaio

pode impedir o cálculo rigoroso metrologicamente e estatisticamente válido, da incerteza de medição. Nestes casos o laboratório deve no mínimo identificar todos os componentes de incerteza e efetuar uma estimativa razoável, de modo a garantir que a forma de reportar o resultado não dê uma impressão errada da incerteza. Estimativa razoável deve ser baseada no conhecimento do desempenho do método e no escopo da medição, com base em experiências anteriores e dados de validações (ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005).

Os métodos que necessitam da estimativa da incerteza são:

- aqueles que emitem resultados quantitativos;
- aqueles que possuem as suas decisões baseadas em resultados quantitativos; e
- para aqueles em que existem clientes, especificações, métodos ou requisitos legais.

Os métodos que não requerem a estimativa da incerteza são:

- aqueles que emitem resultados qualitativos; e
- aqueles com as principais fontes de incerteza indicadas no método de ensaio.

O conceito de incerteza como um atributo quantificável é relativamente novo na história da medição, embora erro e análise de erro tenham sido, há muito, uma parte da prática da ciência da medição ou metrologia. É agora amplamente reconhecido que, quando todos os componentes de erro conhecidos ou suspeitos tenham sido avaliados e as correções adequadas tenham sido aplicadas, ainda permanece uma incerteza sobre quão corretamente o resultado da medição representa o valor da grandeza que está sendo medida.

Em geral, uma medição tem imperfeições que dão origem a um erro no resultado da medição. Tradicionalmente, um erro é visto como tendo dois componentes um aleatório e um sistemático. O erro aleatório presumivelmente se origina de variações temporais, imprevisíveis das grandezas de influência. Os efeitos aleatórios são a causa de variações em observações repetidas do mensurando. Embora não seja possível compensar o erro aleatório de um resultado de medição, ele pode geralmente ser reduzido aumentando-se o número de observações. O erro sistemático, tal como o erro aleatório, não pode ser eliminado, mas pode ser reduzido. Ele tem origem num efeito reconhecido que pode ser quantificado e, se for significativo com relação à exatidão requerida da medição, uma correção ou fator de correção pode ser aplicado para compensar o efeito. Supõe-se que, após esta correção, o valor esperado do erro provocado por um efeito sistemático seja zero.

A incerteza do resultado de uma medição reflete a falta de conhecimento exato do valor do mensurando. O resultado de uma medição, após correção dos efeitos sistemáticos reconhecidos, é ainda, tão somente uma estimativa do valor do mensurando por causa da incerteza proveniente dos efeitos aleatórios e da correção imperfeita do resultado para

efeitos sistemáticos. Na prática, existem muitas fontes possíveis de incerteza em uma medição, incluindo:

- definição incompleta do mensurando;
- realização imperfeita da definição do mensurando;
- amostragem não-representativa – a amostra medida pode não representar o mensurando definido;
- conhecimento inadequado dos efeitos das condições ambientais sobre a medição ou medição imperfeita das condições ambientais;
- erro de tendência pessoal na leitura de instrumentos analógicos;
- resolução finita do instrumento ou limiar de mobilidade (deriva do equipamento);
- valores inexatos e padrões de medição e materiais de referência;
- valores inexatos de constantes e de outros parâmetros obtidos de fontes externas e usados no algoritmo de redução de dados;
- aproximações e suposições incorporados ao método e procedimento de medição;
- variações nas observações repetidas do mensurando sob condições aparentemente idênticas.

A incerteza é um parâmetro associado ao resultado de uma medição que caracteriza a dispersão de valores que poderiam ser, razoavelmente, atribuídos ao mensurando. O parâmetro pode ser, por exemplo, um desvio padrão, um múltiplo dele ou a metade de um intervalo tendo um nível de confiança pré-estabelecido. Ela consiste de vários componentes que podem ser agrupados de acordo com a influência do efeito, a natureza e a distribuição (INMETRO/ABNT, 2003).

De acordo com o efeito do fator, as incertezas são classificadas como primárias, secundárias e terciárias. Elas são correlacionadas entre si e podem ser eliminadas quando o seu valor é menor do que $1/3$ do maior componente de incerteza. As primárias possuem os efeitos significativos, ao contrário das terciárias que possuem efeito insignificante (BARROS, C. B. & HIRATA, Y. S. 2004).

Quanto à natureza, ou seja, método utilizado para estimar seu valor numérico, as incertezas podem ser agrupadas em duas categorias:

- Tipo A – para aquelas que são avaliadas com auxílio de métodos estatísticos; e
- Tipo B – para aquelas que são avaliadas por outros meios.

Nem sempre há uma simples correspondência entre a classificação nas categorias A ou B e o caráter aleatório ou sistemático. Toda descrição detalhada da incerteza deve consistir de uma lista completa de seus componentes e indicar para cada uma o método utilizado para lhe atribuir um valor numérico.

Os componentes classificados na categoria A são caracterizados pelas variâncias estimadas S_i^2 (ou os desvios padrão estimados S_i) e o número de graus de liberdade ν_i . O desvio padrão estimado, que é a raiz quadrada positiva da variância calculada a partir de n observações independentes q_k , é denominado de incerteza padrão $u(x_i)$ do Tipo A. A seguir são apresentados, a equação da variância experimental S_i^2 e desvio padrão experimental S_i :

$$S^2(q_k) = \frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (q_k - \bar{q})^2 \quad (49) \quad \text{e} \quad S(\bar{q}) = \sqrt{\frac{S^2(q_k)}{n}} \quad (50)$$

Os graus de liberdade ν_i da $u(x_i)$ são iguais a $n-1$, calculados de n observações independentes.

A incerteza do tipo A pode ser avaliada de diversas maneiras:

- com base de dados históricos com duas ou mais repetições;
- com base nos gráficos de controle;
- com base em repetições na ocasião da análise;
- a partir dos dados de precisão da ANOVA;
- a partir da curva de calibração; e
- com base em erros sistemáticos.

Os componentes classificados na categoria B são caracterizados pelos termos u_j^2 , que podem ser considerados como aproximações das variâncias correspondentes, cuja existência é suposta. Os termos u_j^2 podem ser tratados como variâncias e os termos u_j , como desvio padrão. Para uma estimativa x_i de uma grandeza de entrada X_i que não tenha sido obtida através de observações repetidas, onde o desvio padrão estimado é avaliado por conhecimento científico, baseando-se em todas as informações disponíveis sobre a possível variabilidade de X_i . O conjunto de informações pode incluir:

- dados de medições prévias;
- a experiência ou o conhecimento geral do comportamento e propagação de materiais e instrumentos relevantes;
- especificações do fabricante;
- dados fornecidos com certificados de calibração e outros certificados; e
- incertezas atribuídas a dados de referência extraídas do uso de manuais.

O uso adequado do conjunto de informações disponíveis para uma avaliação do Tipo B da incerteza padrão exige o discernimento baseado na experiência e no conhecimento geral, sendo esta um habilidade que pode ser aprendida com a prática. Deve-se reconhecer que uma avaliação do Tipo B da incerteza padrão pode ser tão confiável

quanto uma avaliação do Tipo A, especialmente numa situação de medição onde uma avaliação do Tipo A é baseada em um número comparativamente pequeno de observações estatisticamente independentes (INMETRO/ABNT, 2003).

A classificação das incertezas quanto à distribuição de probabilidade dos dados, que determina a probabilidade de uma variável aleatória assumir qualquer valor dado ou pertencer a um dado conjunto de valores, agrupam os componentes em três categorias:

- distribuição normal para incertezas do Tipo A e do Tipo B;
- distribuição retangular para incertezas do Tipo B; e
- distribuição triangular para incertezas do Tipo B.

Para avaliação do Tipo B, precisam ser identificadas as distribuições de probabilidade, em função das informações das incertezas expressas como intervalo de confiança, como incerteza expandida ou como informações do fabricante.

A distribuição normal de uma variável é identificada quando a incerteza é expressa como um intervalo a um dado nível de confiança (90; 95 e 99%). Essa incerteza é expressa como incerteza expandida, com informações do nível de confiança e fator de segurança k (1,64; 1,96 e 2,58). Para obter a incerteza padrão u_i , deve-se dividir a incerteza expandida U_i pelo fator de segurança k .

A distribuição retangular (uniforme e simétrica) com valor esperado da quantidade X_i , onde as contribuições sobre os limites $\pm a$ sem um nível de confiança, existe na possibilidade de que valores extremos são prováveis. Ela é definida como ponto médio da faixa e como desvio padrão de $\frac{a}{\sqrt{3}}$ (51).

A distribuição triangular com valor esperado da quantidade X_i , onde as contribuições sobre os limites $\pm a$ sem um nível de confiança, existe na possibilidade de que valores extremos são improváveis. Ela é definida como desvio padrão de $\frac{a}{\sqrt{6}}$ (52) (BARROS, C. B. & HIRATA, Y. S. 2004).

A incerteza padrão combinada u_c deve ser caracterizada pelo valor obtido, aplicando-se o método usual para combinação de variâncias, ou seja, ela é a raiz quadrada da soma de todas as variâncias.

A incerteza expandida U , também chamada como incerteza global, é uma grandeza que define um intervalo em torno do resultado de uma medição com o qual se espera abranger uma grande fração de distribuição dos valores que possam ser razoavelmente atribuídos ao mensurando. A fração k pode ser considerada como a probabilidade de

abrangência ou nível de confiança do intervalo, ela é um fator numérico utilizado como multiplicados da incerteza padrão combinada de modo a obter uma incerteza expandida.

O resultado de uma medição é a melhor estimativa do valor do mensurando e de todos os componentes da incerteza, incluindo aqueles resultantes dos efeitos sistemáticos, como os componentes associados com correções e padrões de referência que contribuem para dispersão (INMETRO/ABNT, 2003).

Resultado = Média das medidas – Erro sistemático \pm U (incerteza expandida) (53).

O resultado de uma medição segue a incerteza, ou seja, como a expressão da incerteza possui dois números significativos, quando aplicável, a média do resultado deverá obter o número de casas decimais correspondentes aos da incerteza (EURACHEM, QUAM 2000).

2.5.1 Procedimento prático de avaliação da incerteza de métodos analíticos

Na primeira etapa, de acordo com o procedimento do método, o mensurando é especificado, o número de repetições n é definido e a relação entre os resultados e os parâmetros, dos quais o método depende, é evidenciada. Adicionalmente, descreve-se uma expressão matemática principal para calcular o resultado com suas unidades de medida. Estudam-se, também as relações matemáticas entre as grandezas de entrada e a grandeza de saída (EURACHEM, QUAM:2000).

Com o desdobramento do procedimento de análise, divide-se o método em conjuntos:

- amostragem;
- preparo da amostra;
- apresentação dos materiais de referência certificados para o sistema de medição;
- calibração dos instrumentos / qualificação dos equipamentos;
- análise (aquisição de dados);
- processamento de dados;
- apresentação dos resultados;
- interpretação dos resultados; e
- validação do método.

Identificam-se todas as correções – erros sistemáticos – que devem ser aplicados aos resultados das medições para obter a grandeza a ser medida, de acordo com as condições da análise. Além disso, são reunidos todos os documentos referentes à execução do método, tais como: protocolo de validação, certificado de calibração de todos os

instrumentos envolvidos, certificado de qualificação do equipamento, certificados dos materiais envolvidos, memoriais de ensaio.

Na segunda etapa da estimativa os componentes de incerteza são identificados e classificados, ou seja, são listados todos os fatores que podem influenciar o valor do mensurando, a partir da expressão matemática completa (EURACHEM, QUAM:2000).

As fontes típicas de incerteza são:

- amostragem;
- condições de armazenamento;
- efeitos de instrumentos (calibração, resolução, deriva na calibração);
- pureza do reagente;
- estequiometria assumida;
- condições de medição (temperatura, umidade, pressão, tempo de análise,);
- efeitos da amostra (estabilidade, robustez);
- efeitos computacionais (deriva);
- correção do branco;
- efeitos do operador (variação do analista);
- efeitos aleatórios (vidraria); e
- curva de calibração (ajuste, pontos).

Nos protocolos de métodos validados, destacam-se:

- desvio padrão de repetitividade;
- desvio padrão de reprodutibilidade;
- incertezas relacionadas com as curvas de calibração, caso exista no método; e
- incertezas relacionadas com os ensaios interlaboratoriais.

Nos certificados disponíveis de calibração, destacam-se:

- Incertezas, erros ou desvios, k dos certificados de calibração de todos os instrumentos envolvidos dos pontos recomendados.
- Pureza, incerteza, k dos certificados dos padrões de referências.

Depois de listados e relacionados, os fatores são classificados conforme o seu efeito, onde os componentes insignificantes são desprezados, conforme a sua natureza, Tipo A ou Tipo B, e conforme a distribuição da probabilidade, normal, retangular e triangular (EURACHEM, QUAM:2000).

Na terceira etapa, calcula-se o coeficiente de sensibilidade para as grandezas C_i para cada fonte, que descreve o quanto a estimativa de saída y é influenciada pela estimativa de entrada X_1 . Essa estimativa é obtida através da derivada parcial da equação (expressão matemática principal) em relação a cada grandeza de entrada.

O procedimento de estimativa de C_i é demonstrado a seguir:

- Escreve-se a expressão matemática do resultado da análise;
- Atribuem-se os valores de entrada X_i de cada variável conforme o determinado pelo procedimento e calcular o resultado de saída y ;
- Escolhe-se uma grandeza da expressão matemática e varia-se a mesma para mais $\Delta X+$, fixando as outras, para obter y e calcular $\Delta y+$;
- Varia-se a mesma grandeza escolhida para menos $\Delta X-$, fixando as outras, para obter y e calcular $\Delta y-$. A variação para menos deverá ser igual à variação para mais em módulo;
- Obtêm-se as duas derivadas dividindo $(\Delta y+)/(\Delta X+)$ (54) e $(\Delta y-)/(\Delta X-)$ (55);
- Determina-se o C_i calculando a média entre as duas derivadas obtidas;
- Calcula-se o C_i para todas outras variáveis da função definidas na expressão matemática principal.

Na verdade os coeficientes de sensibilidades são calculados para transformar as unidades das grandezas de entrada nas unidades de medida principal da grandeza de saída. Essa transformação acontece, multiplicando o C_i obtido para cada fator, pela contribuição de incerteza individual correspondente (SOUZA, C. L. 2004).

Calculando-se os graus de liberdade, $n-1$ para distribuição normal e *infinito* para distribuições triangular e retangular, a incerteza padrão combinada u_c pode ser obtida, através da propagação das incertezas, que é a raiz quadrada da soma das variâncias de cada fonte na unidade de medida principal. Ou seja:

$$u_c = \sqrt{\sum_{i=1}^n c_i^2 u^2(X_i)} \quad (56)$$

Antes da estimativa da incerteza expandida U , precisa-se obter o número de graus de liberdade efetivos V_{eff} e o fator de abrangência k , de acordo com o intervalo de confiança.

Os graus de liberdade efetivos são graus de liberdade correspondentes a uma dada probabilidade, geralmente para métodos, de 0,05, usada para calcular U . E os fatores de abrangência são fatores numéricos utilizados como multiplicadores da incerteza padrão combinada de modo a obter uma incerteza expandida, geralmente, varia na faixa de dois a três (SOUZA, C. L. 2004).

Ou seja, quando o número de observações n for menor do que dez e a incerteza do Tipo A for maior do que a metade da incerteza padrão combinada ($u_A > \frac{u_C}{2}$) (57), V_{eff} é definido pela seguinte equação:

$$V_{eff} = \frac{u_c^4}{\sum_{i=1}^N \frac{u_i(y)^4}{v_i}} \quad (58)$$

E o fator de abrangência, a 95% de confiança para validação de métodos analíticos, é obtido na tabela de *t Student*, interpolando os valores de V_{eff} calculados com a probabilidade α de 0,05. Agora, se as condições acima não forem verdadeiras, se os graus de liberdade da incerteza Tipo A forem muito grande $n > 30$ ou se a incerteza do Tipo A impactar pouco na incerteza combinada ($u_A > \frac{u_C}{2}$), o V_{eff} , de acordo com a fórmula, passa a ser maior que cem, para um k tabelado igual a dois (SOUZA, C. L. 2004).

A incerteza padrão expandida U é obtida multiplicando-se a incerteza padrão combinada u_c pelo fator de abrangência k para determinação da incerteza expandida U com 95% de confiança, de acordo com se seguinte equação:

$$U = K u_c \quad (59)$$

Com a média \bar{x} das n observações, mais ou menos a incerteza expandida U para um k a 95% de confiança, obtém-se o resultado final de uma medição (SOUZA, C. L. 2004).

Depois de estimada a U e a obtenção do resultado final de uma análise, a avaliação da conformidade do resultado final e as sugestões de melhoria do método devem ser realizadas.

A avaliação do resultado final de uma análise sempre estará de acordo com as necessidades do cliente, mas, geralmente, considerações sobre o resultado final em função do limite de especificação são realizadas da seguinte maneira, ilustrada na figura 2:

- Casos A e E – resultado dentro dos limites, considerando o intervalo da incerteza. Produto em conformidade com a especificação.
- Casos B e F – resultado abaixo do *LES* ou acima do *LEI*, mas por um valor menor que $\frac{1}{2}$ do intervalo da incerteza. Não é possível estabelecer conformidade baseada em 95% de confiança. Conformidade é mais provável do que não conformidade.

- Casos C e G – resultado acima do *LES* ou abaixo do *LEI*, mas por uma margem menor que $\frac{1}{2}$ intervalo da incerteza. Não é possível estabelecer conformidade baseada em 95% de confiança.
- Casos D e H – resultado além dos limites esperados, mesmo considerando o intervalo de incerteza. Produto não conforme (EURACHEM, QUAM 2000).

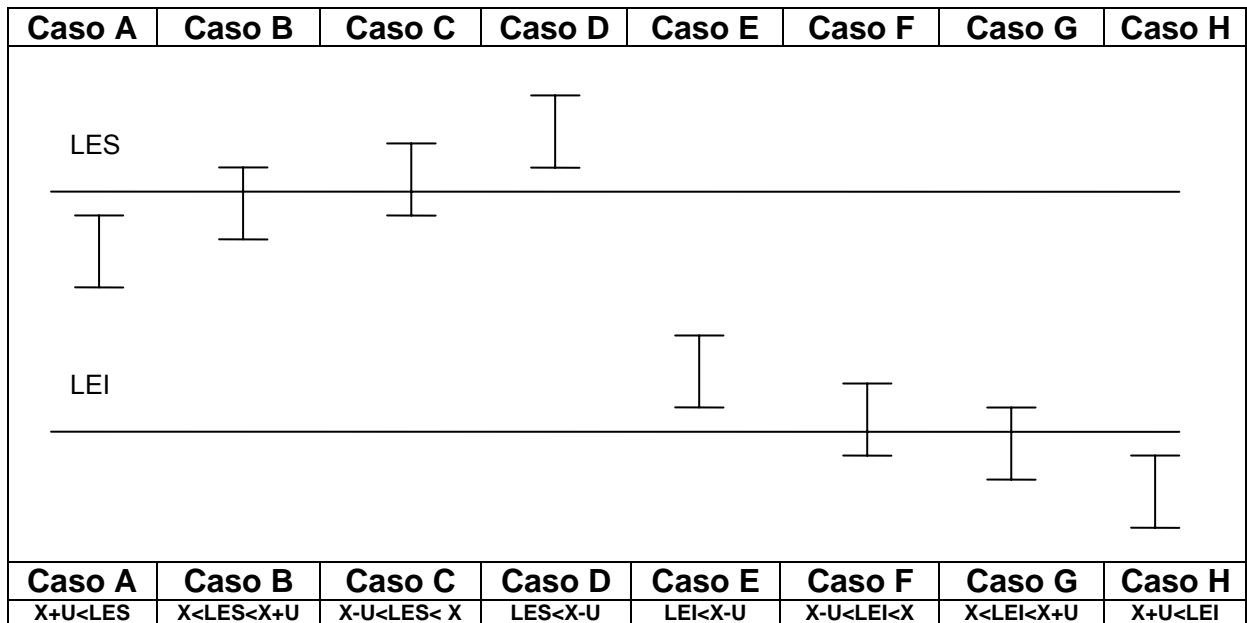


Figura 4: avaliação da conformidade do resultado final com a o limite de especificação de um método (EURACHEM, QUAM:2000)

As sugestões de melhoria do método, diminuindo a incerteza estimada, para menor impacto no resultado final serão feitas, também de acordo com as necessidades do laboratório. A seguir são citadas algumas ações que podem ser tomadas a fim de diminuir a incerteza:

- levantar todos os certificados possíveis referentes ao método;
- aumentar o número de determinações (n);
- aumentar o número de pontos na curva de calibração;
- aumentar a pureza do padrão utilizado;
- calibrar o instrumento no ponto de interesse; e
- utilizar os erros declarados nos certificados, realizando as devidas correções para que não se tornem fontes de incerteza (EURACHEM, QUAM:2002).

Dependendo da ação a ser tomada, o procedimento operacional padrão do método deverá ser revisado.

A frequência da estimativa de incerteza para cada método depende das influências dos fatores de incerteza no método e depende das alterações das condições de análise. Ou seja, deverá ser levados em consideração a cada elaboração da curva analítica, a cada

calibração do principal instrumento de análise e a cada revalidação do método (EURACHEM, QUAM:2002).

Quanto à documentação, é recomendável um relatório de estimativa de incerteza, anexando todos os certificados, considerações, cálculos e resultados. Geralmente esse relatório é anexado ao protocolo de validação (EURACHEM, QUAM:2002).

3 ESTUDOS DE CASOS

3.1 Validação do controle da eliminação do ADH no concentrado do polissacarídeo ativado durante as diafiltrações usando o método de filtração em gel

3.1.1 Introdução

A cromatografia compreende um grupo de técnicas analíticas que separam os componentes de misturas complexas. Nestas técnicas a amostra é transportada por uma fase móvel – gasosa, líquida ou um fluido supercrítico. Essa fase móvel é, então, forçada através de uma fase estacionária imiscível fixa, colocada na coluna ou em uma superfície sólida. As duas fases são escolhidas de modo que os componentes da amostra se distribuam entre as fases móvel e estacionária em proporções distintas.

Os componentes que interagem mais fortemente com a fase estacionária movem-se mais lentamente no fluxo da fase móvel. Ao contrário, os componentes que se ligam mais fracamente à fase estacionária, movem-se mais rapidamente. Como consequência dessas diferenças na mobilidade, os componentes da amostra são separados e podem ser analisados qualitativa e/ou quantitativamente (SKOOG *et. al*, 2002).

Os métodos cromatográficos podem ser classificados de dois modos:

a) De acordo com o meio físico no qual as fases estacionária e móvel entram em contato.

Na cromatografia em coluna, a fase estacionária é mantida dentro de um tubo estreito através do qual a fase móvel é forçada a passar sob pressão. Na cromatografia planar, a fase estacionária é suportada sobre uma superfície plana ou nos interstícios de um papel.

b) De acordo com os tipos de fases móvel e estacionária e com os tipos de equilíbrio envolvidos na transferência de solutos entre as fases.

A Tabela 7 mostra de forma resumida a classificação dos métodos cromatográficos em coluna.

Tabela 7: Classificação dos métodos cromatográficos em coluna (SKOOG *et. al*, 2002).

Classificação – Fase Móvel –	Método	Fase Estacionária	Tipo de Equilíbrio
Cromatografia líquida (CL) – fase móvel: líquido –	líquido-líquido ou partição	líquido adsorvido em um sólido	partição entre líquido imiscíveis
	fase líquido-ligado	espécies orgânicas ligadas a uma superfície sólida	partição entre líquidos e superfície ligada
	líquido-sólido ou adsorção	sólido	adsorção
	troca iônica	resina de troca-iônica	troca iônica
	exclusão por tamanho	líquido em interstícios de sólido polimérico	partição / filtração
Cromatografia gasosa (CG) – fase móvel: gás –	gás-líquido	líquido adsorvido em um sólido	partição entre gás e líquido
	fase gás-ligado	espécies orgânicas ligadas a uma superfície sólida	partição entre líquidos e superfície ligada
	gás-sólido	sólido	adsorção
Cromatografia com fluido supercrítico (CFS) – fase móvel: fluido supercrítico –	---	espécies orgânicas ligadas a uma superfície sólida	partição entre fluido supercrítico e superfície ligada

A cromatografia de exclusão por tamanho, também chamada cromatografia por permeação ou por filtração em gel é uma técnica aplicada na separação de misturas de macromoléculas (moléculas de massa molar elevadas e diferentes). Tem uma grande aplicação no isolamento e purificação de proteínas. Os empacotamentos para cromatografia de exclusão por tamanho consistem de partículas pequenas – aproximadamente dez micrômetros – de sílica ou de polímero contendo uma rede de poros uniformes nos quais moléculas do soluto e do solvente podem se difundir. Enquanto estão nos poros, as moléculas estão efetivamente retidas e ausentes no fluxo da fase móvel. O tempo médio de residência nos poros depende do tamanho efetivo das moléculas do analito. Moléculas maiores do que o tamanho médio dos poros da fase estacionária são excluídas e essencialmente não sofrem retenção. Essas espécies são as primeiras a serem eluídas. Moléculas com diâmetros significativamente menores do que os poros podem penetrar ou permear através da rede de poros e ficar retidas por tempos maiores. Estas são as últimas a serem eluídas. Entre esse dois extremos, estão as moléculas de tamanho intermediário cuja

penetração média nos poros da fase estacionária depende de seus diâmetros. Dentro desse grupo ocorre o fracionamento, que está diretamente relacionado com o tamanho da molécula e, em alguma extensão, também com a sua forma. Para cromatografia de exclusão existe uma correlação entre o tempo de retenção de uma molécula e seu tamanho molecular ou sua massa molar, ou seja, o fenômeno é puramente físico, não havendo interação química entre a matriz e a mistura a ser fracionada (SKOOG *et. al*, 2002).

O volume total (V_t) de uma coluna empacotada com um polímero poroso ou sílica em gel é dado por:

$$V_t = V_o + V_i + V_g \quad (60)$$

onde V_g é o volume ocupado pela matriz sólida de gel, V_i é o volume de solvente mantido nos seus poros e V_o é o volume livre fora das partículas de gel.

Considerando que não há mistura nem difusão, o V_o pode representar o volume teórico do solvente necessário para transportar através da coluna os componentes maiores que não penetram nos poros do gel. Entretanto, como alguma mistura e difusão ocorrem, os componentes não-retidos vão aparecer em uma banda de forma gaussiana com concentração máxima em V_o . Para componentes suficientemente pequenos, que conseguem penetrar livremente nos poros do gel, o máximo da banda aparecerá na saída da coluna em um volume de eluente correspondente a $(V_t + V_i)$ (61). Geralmente, V_o , V_i e V_g são da mesma ordem de grandeza. Assim, uma coluna de gel permite a separação dos componentes com diferentes dimensões presentes em uma amostra, com um mínimo de volume de eluente. Moléculas de tamanho intermediário são capazes de se transferir para uma fração K do solvente retido nos poros. O volume de eluição (V_e) para essas moléculas retidas é:

$$V_e = V_o + KV_i \quad (62)$$

que se aplica a todos os solutos na coluna. Para moléculas maiores, que não conseguem penetrar nos poros do gel, $K = 0$ e $V_e = V_o$. Para moléculas que podem penetrar em poros disponíveis, $K = 1$ e $V_e = (V_o + V_i)$. Com adsorção entre as moléculas do soluto e a superfície do gel, os valores de K podem variar de zero para moléculas maiores, totalmente excluídas até um para moléculas menores. O intervalo da massa molar útil para fases estacionárias por exclusão por tamanho é convenientemente ilustrado através de uma curva de calibração, como ilustrada na Figura 5 (SKOOG *et. al*, 2002).

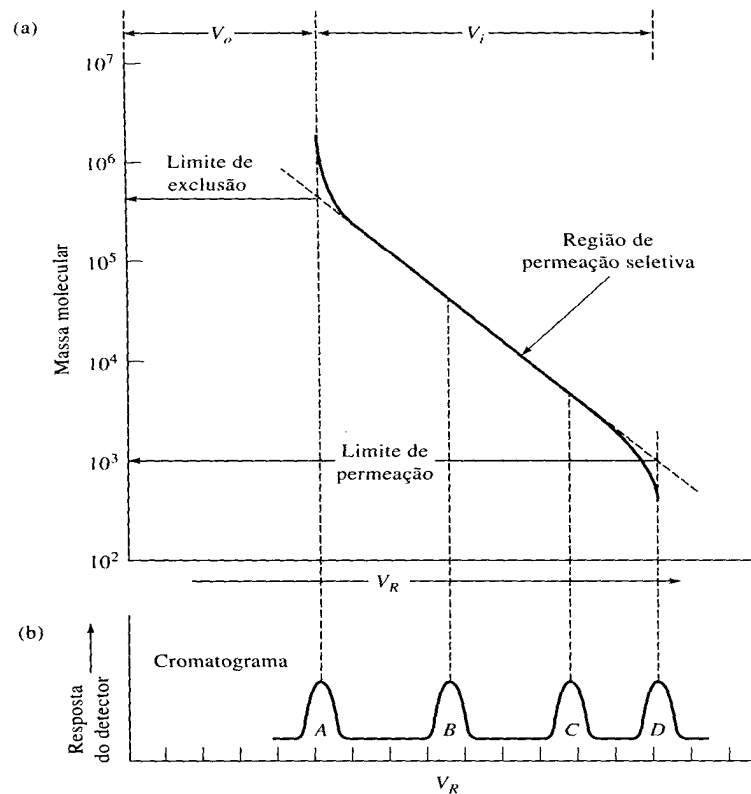


Figura 5 – (a) Curva de calibração. (b) Cromatogramas contendo substâncias, com massas molares diferentes, eluindo em tempos distintos (SKOOG *et. al*, 2002).

Neste caso, a massa molar que está diretamente relacionada com o tamanho das moléculas do soluto é representada graficamente em função de V_R , onde V_R é o produto do tempo de retenção pela vazão. O limite de exclusão define a massa molar da espécie além da qual não ocorre retenção. Todas as espécies com massa molar maior do que o limite de exclusão são grandes demais e não podem ser retidas e eluem juntas para formar o pico A no cromatograma mostrado na Figura 5b. O limite de permeação é a massa molar abaixo da qual as moléculas do soluto podem penetrar completamente nos poros. Todas as moléculas com massa molar abaixo desse valor são pequenas demais e eluem em uma única banda, aqui denominada D. Para valores abaixo do limite de exclusão, conforme a massa molar diminui, as moléculas do soluto permanecem gradativamente mais tempo retidos nos poros da fase estacionária e, portanto, movem-se de modo progressivamente mais lento. Na região de permeação seletiva ocorre fracionamento, gerando picos individuais como B e C no cromatograma da Figura 5b (SKOOG *et. al*, 2002).

Os métodos de exclusão por tamanho são subdivididos em cromatografia por filtração em gel e por permeação em gel. A primeira está baseada em solventes aquosos e fases estacionárias hidrofílicas. A segunda está baseada em solventes orgânicos não-polares e fases estacionárias hidrofóbicas. Os métodos são complementares no sentido em

que se aplicam amostras solúveis em água e a substâncias solúveis em solvente orgânicos menos polares (SKOOG *et. al.*, 2002).

4.1.2 Cromatografia de exclusão por tamanho

A cromatografia líquida com o método de exclusão por tamanho, também chamada de cromatografia por permeação em gel ou por filtração em gel, é uma técnica aplicada na separação de misturas de macromoléculas de massas molares diferentes, sendo largamente utilizada no isolamento e purificação de proteínas. Esta técnica baseia-se no efeito de peneira molecular, que é aquele pelo qual moléculas com diferentes dimensões são seletivamente retidas por um material sólido formado por uma rede tridimensional de poros com tamanho uniforme. Essa técnica é aplicada na separação de substâncias de acordo com o tamanho e forma molecular. Numa separação, as macromoléculas eluem em frações diferentes e por ordem decrescente da sua massa molar, podendo estabelecer-se relações empíricas entre V_e e a respectiva massa molar. Esta relação varia para as diferentes classes de macromoléculas – polissacarídeos, proteínas globulares, aminoácidos (SKOOG *et. al.*, 2002; POP 104240.308, 2004).

4.1.3 Controle da eliminação do ADH no concentrado do polissacarídeo ativado durante as diafiltrações usando o método de filtração em gel

No estudo de caso em questão utilizou-se a cromatografia por filtração em gel para o controle do ADH (dihidrazida do ácido adípico) que é utilizado no procedimento de conjugação da vacina *Haemophilus influenzae* tipo b com o toxóide tetânico purificado. Como o ADH é uma molécula espaçadora de seis carbonos, ela é acrescentada ao polissacarídeo, o qual é conjugado depois na presença de EDAC (1-etil-3(3-dimetilaminopropil)carbodiimida – HCl) com o toxóide tetânico purificado. O controle da quantidade de ADH livre é feito para a otimização do processo, ou seja, para maior índice de conjugação e reaproveitamento da matéria-prima (FRASCH, *et. al.*, 2000)

Esse estudo de caso trata da revalidação de um método qualitativo com a utilização de dois equipamentos (GE, modelo Akta Purifier e Waters, modelo Alliance) e dois analistas. Não possui a variação da amostragem, já que as amostras são retiradas do processo de produção e avaliadas diretamente no cromatógrafo.

As amostras foram coletadas em sete etapas do processo de conjugação, portanto, com concentrações de ADH livre diferentes. Além disso, não houve interferência do analista, já que a injeção das amostras foi automática, mas houve interferência do cromatógrafo

porque o tempo de retenção, a resolução e a sensibilidade variaram entre os equipamentos, apesar de terem sido utilizados o mesmo tipo de coluna e reagentes de um mesmo lote .

As condições otimizadas para a análise cromatográfica foram as seguintes: solução de cloreto de sódio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ($1,0 \text{ mL/min}$) como eluente, pré-coluna Tosohass PW_{XL}, coluna Tosohaas TSK gel 2500 PWxl , detecção de UV e volume da injeção de $30 \mu\text{L}$ (BIO-MANGUINHOS POP 104240.308, 2004).

3.1.4 Ensaio e resultados

Os certificados de calibração das micropipetas, das vidrarias, da balança e de pureza das amostras foram apresentados; assim como o certificado de qualificação do equipamento a fim de manter a rastreabilidade dos ensaios.

Antes de executar os ensaios de validação, o laboratório apresentou protocolos de avaliação dos números de pratos teóricos dos dois sistemas cromatográficos que foram maiores que 10.000 (BIO-MANGUINHOS POP 104240.312, 2004).

Por se tratar de um método qualitativo, a validação desse ensaio consistiu na verificação da seletividade e do limite de quantificação, conforme a categoria II preconizada pela USP 27, 2003.

A avaliação dos cromatógrafos utilizados foi realizada com o estudo da equivalência, da precisão e do limite de detecção. A partir dos dados obtidos, foi estimado o intervalo de confiança do tempo de retenção, mesmo sabendo-se que para métodos qualitativos não se estima a incerteza.

Para determinação da seletividade separou-se dois tipos de amostras de polissacarídeo com quantidade de ADH diferentes. Dividiu-se as mesmas em dois volumes iguais, em um deles foram acrescentados 1 mL de uma solução de ADH de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Preparou-se, em triplicata, os quatro tipos de soluções de trabalho para injetar no cromatógrafo. Cada analista executou esse ensaio uma vez em cada equipamento disponível.

A seletividade foi avaliada pelos testes F e t , já que os mesmos verificam a equivalência entre dois ensaios. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 8, somente para a amostra 1, com maior quantidade de ADH livre, no equipamento 1, não foi verificada a diferença significativa entre os tipos de amostra pura e fortalecida com ADH livre. Para a amostra 2, com pouca quantidade de ADH livre, houve diferença significativa entre os dois tipos de amostras para os dois equipamentos. O teste t foi a ferramenta estatística decisiva, porque avaliou a equivalência entre os ensaios quanto ao valor absoluto e, de acordo com os cálculos, o equipamento 2 é o único que está apto a ser utilizado nesse método.

Tabela 8: Resultados da seletividade do estudo de caso 4.1 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 150/2005, 2005)

Amostra 1 - Equipamento 1 / Analista 1		
Amostra	Porcentagem de ADH (%)	Seletividade
Pura	24,99	Não
Fortalecida	24,38	
Teste F	As análises foram equivalentes quanto à precisão.	
Teste t	As análises foram equivalentes quanto à exatidão.	
Amostra 2 - Equipamento 1 / Analista 1		
Amostra	Porcentagem de ADH (%)	Seletividade
Pura	0,34	Sim
Fortalecida	7,96	
Teste F	As análises não foram equivalentes quanto à precisão.	
Teste t	As análises não foram equivalentes quanto à exatidão.	
Amostra 1 - Equipamento 1 / Analista 2		
Amostra	Porcentagem de ADH (%)	Seletividade
Pura	23,66	Não
Fortalecida	23,96	
Teste F	As análises foram equivalentes quanto à precisão.	
Teste t	As análises foram equivalentes quanto à exatidão.	
Amostra 2 - Equipamento 1 / Analista 2		
Amostra	Porcentagem de ADH (%)	Seletividade
Pura	0,13	Sim
Fortalecida	6,75	
Teste F	As análises não foram equivalentes quanto à precisão.	
Teste t	As análises não foram equivalentes quanto à exatidão.	
Amostra 1 - Equipamento 2 / Analista 1		
Amostra	Porcentagem de ADH (%)	Seletividade
Pura	30,16	Sim
Fortalecida	36,85	
Teste F	As análises não foram equivalentes quanto à precisão.	
Teste t	As análises não foram equivalentes quanto à exatidão.	

Tabela 8: Resultados da seletividade do estudo de caso 4.1 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 150/2005, 2005) (continuação)

Amostra 2 - Equipamento 2 / Analista 1		
Amostra	Porcentagem de ADH (%)	Seletividade
Pura	1,54	Sim
Fortalecida	18,43	
Teste F	As análises foram equivalentes quanto à precisão.	
Teste t	As análises não foram equivalentes quanto à exatidão.	
Amostra 1 - Equipamento 2 / Analista 2		
Amostra	Porcentagem de ADH (%)	Seletividade
Pura	27,63	Sim
Fortalecida	35,21	
Teste F	As análises foram equivalentes quanto à precisão.	
Teste t	As análises não foram equivalentes quanto à exatidão.	
Amostra 2 - Equipamento 2 / Analista 2		
Amostra	Porcentagem de ADH (%)	Seletividade
Pura	1,62	Sim
Fortalecida	19,44	
Teste F	As análises não foram equivalentes quanto à precisão.	
Teste t	As análises não foram equivalentes quanto à exatidão.	

Utilizando-se os dados obtidos do ensaio de seletividade, foram avaliados a equivalência entre os equipamentos, a repetitividade, a reprodutibilidade intralaboratorial e o intervalo de confiança com 95% de probabilidade.

Para a equivalência entre os equipamentos utilizou-se os testes F e t , já que foram utilizados dois equipamentos com as mesmas condições de trabalho e simultaneamente. Como já havia sido evidenciado, os equipamentos não foram equivalentes, ou seja, a probabilidade da hipótese alternativa de desigualdade entre os equipamento ficou demonstrada.

Os desvios padrão da repetitividade e da reprodutibilidade foram calculados para a estimativa do intervalo de confiança num nível de confiança de 95%, ou seja, levando-se em consideração apenas a incerteza do Tipo A do tempo de retenção. O tamanho da amostra para avaliação da repetitividade foi igual a oito, enquanto que para a da reprodutibilidade foi igual a vinte e quatro. O último algarismo significativo do intervalo de confiança do tempo de

retenção, mostrado na Tabela 9, corresponde à terceira casa decimal, portanto, os resultados dessa análise deverão ser apresentados, também, com três casas decimais.

Tabela 9: Resultados de equivalência e precisão do estudo de caso 4.1 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 150/2005, 2005)

Repetitividade			
Equipamento	1	2	
Média (min)	10,40	10,21	
Desvio Padrão (min)	0,018	0,015	
Reprodutibilidade Intralaboratorial			
Tipo	Analista		Equipamento
	1	2	
Média (min)	10,39	10,21	10,30
Desvio Padrão (min)	0,014	0,021	0,013
Equivalência			
Tipo	Analista		Equipamento
	1	2	
Equivalência	Sim	Sim	Não
Intervalo de Confiança			
Equipamento	1	2	
t (95%) de repetitividade – n = 8	2,36462256	2,36462256	
t (95%) de reprodutibilidade – n = 24	2,06865479	2,06865479	
Intervalo de Confiança (95%) – IC _{TR}	± 0,021 min	± 0,021 min	

Para a verificação do limite de detecção preparou-se, em triplicata, seis soluções de ADH com as seguintes concentrações: 0; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Foram coletadas três alíquotas de cada solução para as medidas.

Aplicando-se o método da regressão linear simples, foram calculados os coeficientes angulares e lineares. Para avaliação da curva de calibração, foram calculados os coeficientes de correlação e o intervalo de confiança do coeficiente linear.

Avaliou-se, nas curvas analíticas, a ausência de erro aleatório significativo através do intervalo de confiança do coeficiente linear, o qual deve conter o zero. Apesar dos coeficientes de correlação e de determinação resultarem em valores menores que um,

nenhuma curva analítica apresentou erros aleatórios significativos. Os resultados estão descritos na Tabela 10, em unidade de percentual de área.

Tabela 10: Resultados dos limites de quantificação e de detecção do estudo de caso 4.1 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 150/2005, 2005)

Equipamento 1			
r	0,781 e 0,884	a e b	-0,073 e 2,090
IC _a	-2,27 a 0,806	Presença de Erro Significativo	Não
LD = 0,677 % / LQ = 2,053 %			
Equipamento 2			
r	0,921 e 0,959	a e b	-5,611 e 72,859
IC _a	-29,638 à 18,417	Presença de Erro Significativo	Não
LD = 0,304% / LQ = 0,920%			

Estes resultados indicam que o equipamento 2, que já havia apresentado o melhor desempenho na avaliação da especificidade, apresentou também maior sensibilidade para a determinação em questão. Como o laboratório necessita analisar amostras com quantidades baixas de ADH livre, apresentadas nos ensaios de especificidade, inclusive menores do que o limite de detecção do equipamento 1, somente o equipamento 2 deverá ser utilizado para essa determinação.

3.2 Validação e estimativa da incerteza do método de determinação de fósforo por colorimetria

3.2.1 Introdução

A absorciometria é um método analítico baseado na propriedade que têm muitas espécies iônicas ou moleculares de absorver determinados comprimentos de onda da radiação ultravioleta/visível (UV/VIS). A absorção é um processo específico relacionado com a estrutura da espécie absorvente e com a probabilidade da transição. Apresenta, portanto, potencial para determinações qualitativas e quantitativas (EWING'S ANALITICAL INSTRUMENTATION HANDBOOK, 2005).

A intensidade da absorção não é diretamente mensurável, mas ela determina uma atenuação da radiação que incide na amostra que pode ser medida e relacionada com a concentração da espécie absorvente. Quando um feixe de radiação monocromática atravessa uma solução contendo uma espécie absorvente, uma parte da energia radiante é absorvida, a parte restante atravessa o meio. Chama-se de potência radiante, a quantidade de energia transportada por segundo através de uma unidade de seção transversal. A razão entre potência da radiação transmitida (P) e a potencia da radiação incidente (P₀) é denominada de transmitância (T), assim:

$$T = P / P_0 \quad (3)$$

A transmitância, portanto, representa a fração da potência da radiação incidente que é transmitida pela solução (EWING'S ANALITICAL INSTRUMENTATION HANDBOOK, 2005).

Em geral os métodos absorciométricos são mais simples e rápidos do que os métodos gravimétricos e volumétricos, além de apresentarem níveis de sensibilidade muito superiores. Assim, são muito convenientes para determinações de amostras contendo concentrações de analito relativamente baixas (EWING'S ANALITICAL INSTRUMENTATION HANDBOOK, 2005).

A lei que rege o processo de absorção de radiação é a Lei de Lambert-Beer, que estabelece a relação entre a absorvância (A), que corresponde ao inverso do log decimal da transmitância, e a concentração da espécie absorvente.

$$\log P_0 / P = \log (1/T) = A = \varepsilon.b.c \quad (4)$$

onde: ϵ é a absorvância molar do analito, b é o comprimento do percurso óptico e c a concentração da substância absorvente (EWING'S ANALITICAL INSTRUMENTATION HANDBOOK, 2005).

A colorimetria é uma técnica analítica que é aplicada à determinação da concentração de substâncias coradas, a partir da comparação entre a coloração de uma solução de concentração desconhecida desta substância corada e a coloração de uma solução com concentração conhecida desta mesma substância. Na colorimetria visual usa-se luz branca natural ou artificial como fonte de radiação e as determinações são feitas com instrumentos simples, chamados colorímetros ou comparadores de cor. Quando se substitui o olho humano por uma célula fotoelétrica como detector (eliminando-se, assim, os erros devidos às características individuais de cada observador), o instrumento passa ser designado como colorímetro fotoelétrico. Neste caso, usualmente emprega-se radiação correspondente a um intervalo relativamente estreito de comprimentos de onda obtido pela passagem de luz branca através de filtros (absorção ou interferência) que transmitem somente a região espectral limitada de interesse; o nome fotômetro de filtro é utilizado para designar estes aparelhos. Quando a seleção do comprimento de onda de trabalho é feita por meio de monocromadores, que são dispositivos capazes de dispersar a radiação policromática emitida pela fonte e isolar o comprimento de onda de interesse, o instrumento é capaz de fornecer informação sobre a intensidade da radiação em função do comprimento de onda, sendo chamado espectrômetro. Um espectrofotômetro é um espectrômetro equipado com uma ou mais fendas de saída e detectores fotoelétricos que permitem a determinação da razão entre a potencia de dois feixes em função do comprimento de onda, fundamental para as medidas absorciométricas (EWING'S ANALITICAL INSTRUMENTATION HANDBOOK, 2005).

3.2.2 Determinação de fósforo por colorimetria

No método de determinação de fósforo em polissacarídeo por colorimetria, o fosfato reage com o molibdato de amônio, em meio fortemente ácido, para formar um complexo de fosfomolibdato de amônio, que é reduzido a azul de molibdênio, cuja intensidade da cor é proporcional à concentração de íons fósforo presentes na amostra (IN VITRO DIAGNÓSTICA 10027, 2005).

Através de uma curva analítica – absorvância x concentração – construída com soluções padrão de fósforo e medida em 820 nm, é determinada a concentração do analito na amostra. A concentração de fósforo, em percentagem mássica, é expressa com base na massa do polissacarídeo seco.

A determinação de fósforo é um método quantitativo empregado para estimar traço deste analito em amostras de polissacarídeos provenientes de extrações em proteínas. Esse ensaio faz parte do grupo de métodos analíticos executados em matéria-prima que confirmam a qualidade da vacina produzida, de acordo com seu registro (IN VITRO DIAGNÓSTICA 10027, 2005).

Em virtude da complexidade do método, que envolve o preparo de soluções (meio ácido, reativo de coloração, solução padrão de fósforo de 80 µg/mL, soluções teste), contendo etapas com medidas de massa e diluições, vários fatores podem interferir na determinação, tais como: o treinamento do analista, o uso de micropipetas, a calibração da vidraria e os equipamentos envolvidos: balança analítica, termobloco e espectrofotômetro (Beckman, modelo DU530).

O laboratório possui uma sistemática para minimizar as possibilidades de erros de análise, executando o método duas vezes, cada uma por um analista diferente, em tempos distintos. Assim, essa sistemática fica evidenciada como a maneira de confirmar a interferência de cada analista no método (BIO-MANGUINHOS POP 106405.574, 2004).

3.2.3 Ensaio e resultados

A validação desse ensaio consistiu na verificação da especificidade, linearidade, precisão – repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial, limite de quantificação e exatidão, conforme a categoria II preconizada pela USP 27, 2003.

A avaliação de equivalência entre as análises foi realizada, principalmente, para verificar o treinamento dos analistas no método, já que as condições de análise foram idênticas e foram usados as mesmas micropipetas, os mesmos reagentes e o mesmo lote de vacina.

Para a estimativa de incerteza, foram separados todos os certificados envolvendo o método: calibração dos equipamentos, calibração de vidraria, calibração de micropipetas, pureza de material. A metodologia de cálculo foi a clássica, retirada do INMETRO/ABNT, 2003. Todas as fontes de incerteza foram levadas em consideração com um nível de confiança de 95% de intervalo de confiança.

Para avaliação da precisão, prepararam-se seis replicatas de polissacarídeo (solução teste). De cada réplica foram retiradas três alíquotas para execução de uma medida no espectrofotômetro. O analista 1 repetiu essa mesma seqüência, no dia seguinte, com três lotes de polissacarídeo para verificação da avaliação da equivalência entre dias e entre lotes. Para avaliação da equivalência entre analistas, os quatro analistas restantes executaram esse ensaio uma vez, no mesmo dia, com o mesmo lote e reagentes.

De acordo com os resultados da Tabela 11, todos os coeficientes de variação ficaram abaixo do limite estabelecido pela AOAC, 2000 na Tabela 4 (< 2% para a repetitividade e < 4% para a reprodutibilidade), ou seja, o método é repetitivo para todos os analistas e reprodutível por cada analista. No entanto, pela análise da variância, os analistas não foram equivalentes. Houve equivalência entre dias, avaliada pelos testes *F* e *t*, pois somente dois conjuntos de dados, variando-se apenas o dia da determinação.

Tabela 11: Resultados de precisão e equivalência do estudo de caso 4.2 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 89/2005, 2005)

Repetitividade						
Analista	1		2		3	
Lote	I	III	I	III	I	III
Fósforo %	8,18	7,56	8,46	7,03	8,20	7,30
S (%)	0,066	0,082	0,018	0,010	0,032	0,055
CV (%)	0,81	1,1	0,21	0,14	0,38	0,76
<i>r</i> (%)	0,18	0,22	0,049	0,027	0,087	0,15
Analista	4		5		---	
Lote	I	III	I	III	---	---
Fósforo %	8,59	7,40	8,50	7,10	---	---
S (%)	0,028	0,030	0,0039	0,0039	---	---
CV (%)	0,32	0,40	0,046	0,055	---	---
<i>r</i> (%)	0,076	0,082	0,011	0,11	---	---
Reprodutibilidade Intralaboratorial						
Lote I			Lote III			
Fósforo %	8,39		Fósforo %	7,27		
S (%) / CV%	0,016 / 0,19		S (%) / CV%	0,033 / 0,46		
<i>R</i> (%)	0,070		<i>R</i> (%)	0,15		
Equivalência						
Entre Dias – Analista 1			Sim			
Entre Lotes			Não			
Entre Analistas			Não			

Para a verificação da linearidade do método, foram preparadas, em triplicata, cinco soluções com concentrações de 1,25; 2,50; 3,75; 5,0 e 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de fósforo, a partir de uma solução-estoque de 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$, além da solução branco. As medidas foram realizadas

com três alíquotas de cada solução. De acordo com os resultados descritos na Tabela 12, o método confirmou a linearidade na faixa proposta, pois os coeficientes de correlação foram superiores a 0,99 e o zero ficou contido nos intervalos de confiança dos coeficientes lineares.

Tabela 12: Resultado de linearidade do estudo de caso 4.2 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 89/2005, 2005)

Linearidade			
Curva	I	II	III
r	0,9999	0,9997	0,9999
a	0,0051	0,0027	0,0063
b	0,2141	0,2182	0,2026
IC _a	-0,0122 a 0,0226	-0,0317 a 0,0225	-0,1631 a 0,2253

O procedimento do método (BIO-MANGUINHOS-POP 106040.574) recomenda preparar uma solução branco, contendo todas as soluções – meio ácido, reativo de cloração e água – menos a amostra, para ajustar o equipamento, portanto a solução branco, com $0,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de fósforo, não produziu medida de absorvância. Assim, o limite de quantificação foi calculado a partir da solução mais diluída da curva de calibração – $1,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ de fósforo. Preparou-se, em triplicata, sete soluções de fósforo contendo: 0,05; 0,10; 0,20; 0,40; 0,60; 0,80 e $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ mais o branco de solução. Das mesmas, retiraram-se três alíquotas para efetuar as medidas no espectrofotômetro e três curvas analíticas foram construídas.

Tabela 13: Resultados do limite de quantificação do estudo de caso 4.2 (BIO-MANGUINHOS-PROTOCOLO 89/2005, 2005)

Limite de Quantificação			
Curva	I	II	III
r	0,9991	0,9992	0,9988
a	-0,0060	-0,0055	-0,0069
b	0,2101	0,2104	0,2086
S _{xy}	0,0035	0,0033	0,0041
S _a	0,0010	0,0010	0,0012
LQ	0,50%		

Considerando que o limite de especificação da análise é de até 9% de fósforo em massa seca de polissacarídeo, o limite de quantificação está aceitável.

Como não havia rotina nesse ensaio, optou-se por uma faixa de quantidade de fósforo dentro do limite de especificação para verificar a exatidão. Prepararam-se cinco soluções, em triplicata, com a quantidade de 1, 2, 3, 4 e 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de fósforo. Das mesmas, separaram-se três alíquotas para as medidas no espectrofotômetro.

Pelos resultados apresentados na Tabela 14, além da recuperação por concentração, a exatidão foi avaliada através de uma curva de calibração – concentração nominal x concentração obtida. Os resultados obtidos foram bastante satisfatórios, tendo em vista que a recuperação foi de 100%, dentro do critério estabelecido, na Tabela 3, de 97 a 103%, e o zero ficou contido nos intervalos de confiança dos coeficientes lineares das curvas de calibração.

Tabela 14: Resultados de exatidão do estudo de caso 4.2 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 89/2005, 2005)

Exatidão			
Dados da Reta da Concentração Nominal x Concentração Observada			
Ensaio	I	II	III
b / IC _b	1,00 / $\pm 0,05$	1,00 / $\pm 0,06$	1,00 / $\pm 0,05$
a / IC _a	-0,0002 / $\pm 0,0044$	-0,0007 / $\pm 0,0054$	-0,0007 / $\pm 0,0042$
Exatidão % (recuperação)	100	100	100

No teste de especificidade, foram aproveitados os dados dos ensaios de limite de quantificação, com a solução branco e uma solução com concentração conhecida de fósforo, e de repetitividade, com uma solução teste. A finalidade desses resultados foi evidenciar, como mostrado na Tabela 15, que não há interferência significativa da solução branco e da solução teste na determinação do fósforo.

Tabela 15: Resultados da especificidade no estudo de caso 4.2 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 89/2005, 2005)

Especificidade			
Ensaio	Limite de Quantificação ($\mu\text{g/mL}$)		Repetitividade
Amostra	Branco	Padrão (1 $\mu\text{g/mL}$)	Amostra Lote I
Concentração (%)	0,03	1,00	8,20
Especificidade	Sim		

Na estimativa de incerteza, mostrada na Tabela 16, as contribuições de cada fonte foram estimadas separadamente. Nessa estimativa, as pesagens, as diluições e os erros das micropipetas, da balança e das vidrarias foram levados em consideração. Para uniformização das unidades o C, foi estimado para cada fonte. Para as incertezas do Tipo A, devido à alta sensibilidade do método em relação aos analistas, na reprodutibilidade foi escolhido o maior desvio padrão como fonte de incerteza e na curva de calibração, o erro padrão estimado entrou como contribuição de incerteza. Para incertezas do Tipo B, nas contribuições do preparo da amostra e do padrão, todos os erros absolutos dos instrumentos calibrados – vidrarias, balanças, espectrofotômetro – entraram como fonte de incerteza, já que eles não são corrigidos na rotina de análise.

Observando-se, ainda, a Tabela 16, nota-se que a maior contribuição para a incerteza expandida do método foi o preparo da curva de calibração, que envolveu diluições. Considerando-se a correção dos erros absolutos das micropipetas, que normalmente não são realizadas pelo laboratório em questão, o resultado final foi 0,40% de incerteza para um coeficiente de distribuição de 2,57 a 95% de intervalo de confiança. Como o segundo algarismo significativo da incerteza expandida situou-se na segunda casa decimal, todos os resultados de análise deverão possuir duas casas decimais.

Esse estudo de caso evidenciou a importância da elaboração de um procedimento para uniformizar as etapas da determinação, a fim de que os analistas executem o ensaio segundo o mesmo procedimento, ou seja, enfatizou a importância da verificação da performance de cada analista antes da participação na atividade em questão. Isto porque, para a avaliação da precisão, os ensaios foram executados repetidas vezes, tendo sido observada uma reprodutibilidade satisfatória para cada analista, apesar dos resultados não satisfatórios observados para a reprodutibilidade intralaboratorial. Já na estimativa de incerteza do método, ficou evidenciada a importância das análises dos certificados de calibração dos instrumentos e, conseqüentemente, da correção dos erros associados, a fim de diminuir a incerteza do método.

Tabela 16: Resultados das estimativas de incerteza do estudo de caso 4.2 (BIO-MANGUINHOS-PROTOCOLO 89/2005, 2005)

Estimativa de Incerteza da Determinação de Fósforo											
s _(i)	Tipo	Fonte	Valor incerteza ±	Unidade	Distr.	DIV.	C _(i)	u(i)	GL	V, Veff	
1	A	Reprodutibilidade (S maior do analista)	0,1400	%	Normal	2,236	1,000	0,063	2	7,683E-06	
2	A	Curva de Calibração (ajuste)	0,2109	%	Retangular	1,732	1,000	0,122	2	0,0001099	
3	B	Preparo da Amostra	0,1300	%	Normal	2,000	1,000	0,065			
4	B	Preparo do Padrão	0,0540	%	Normal	2,000	1,000	0,027			
5	B	Espectrofotômetro	0,0280	Abs	Normal	2,000	0,950	0,013			
6	B	Resolução do Equipamento (assumida)	0,0001	Abs	Retangular	3,464	0,950	0,000014			
uc	Incerteza padrão Combinada							0,15453	4,8		
U	Incerteza padrão Expandida em Fósforo % (95%)					k=	2,57	0,40			

3.3 Validação e estimativa da incerteza do método de determinação do polissacarídeo por colorimetria

3.3.1 Determinação de polissacarídeo por colorimetria

Na quantificação do polissacarídeo por colorimetria pelo método do orcinol ocorre a reação de Bial, onde o ácido clorídrico, na presença do cloreto férrico, desidrata primeiro as pentoses – polissacarídeo – e depois as hexoses – orcinol – para condensação dos mesmos e oxidação dos grupos cetona livres, a uma temperatura de 100°C, num tempo de 20 min. O furfural reage com o orcinol formando um complexo verde estável que absorve em um comprimento de onda de 669nm (SOTO *et. al.*, 2002).

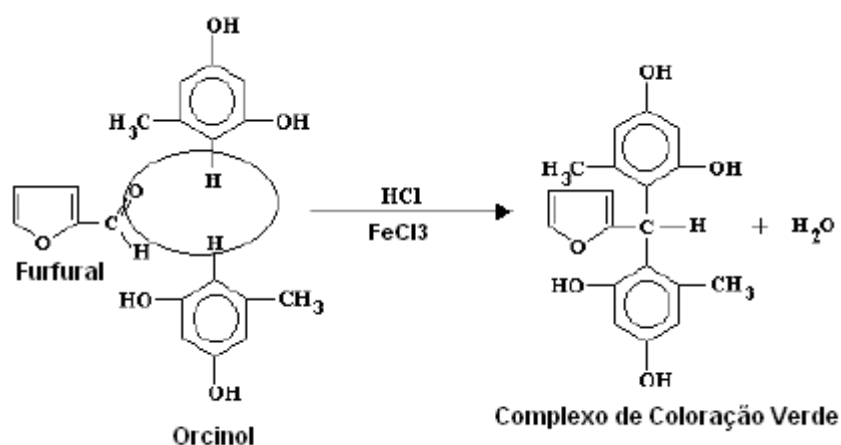


Figura 6: Reação de formação do complexo corado – polissacarídeo, orcinol e furfural (SOTO *et. al.*, 2002).

Através da curva analítica – absorvância x concentração – construída com soluções padrão de ribose, obtém-se a quantidade de polissacarídeo na amostra.

Esse método é importante no controle do processo de produção de vacinas, por determinar o conteúdo de polissacarídeo na matéria-prima, nas amostras de ativação e nas amostras de conjugação. Neste estudo, foram obtidos os dados de três determinações independentes, duas realizadas por um analista em dias diferentes e uma por outro analista, com seis replicatas de amostra padrão, três alíquotas de cada amostra e uma medida de cada alíquota empregando-se um único espectrofotômetro.

3.3.2 Ensaio e resultados

A validação desse ensaio consistiu na verificação da especificidade, linearidade, precisão – repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial e exatidão, conforme a categoria I preconizada pela USP 27, 2003.

A avaliação de equivalência entre as análises foi realizada, principalmente, para verificar o treinamento dos analistas no método, já que as condições de determinação foram as mesmas, ou seja: um único espectrofotômetro VIS (Genesys, modelo Spectronic 20), as mesmas micropipetas e os mesmos reagentes.

Para estimativa de incerteza, foram separados todos os certificados envolvendo o método: calibração dos equipamentos, calibração de vidraria, calibração de micropipetas e pureza de material. A metodologia de cálculo foi a clássica, retirada do Guia para Expressão da Incerteza de Medição. Todas as fontes de incerteza foram levadas em consideração, com um intervalo de confiança de 95% de intervalo de confiança.

Os critérios de aceitação foram retirados da AOAC, 2000 e do procedimento analítico onde a absorvância da solução branco menor deverá ser inferior a 0,050 (SILVA, A & CARVALHO, M. 2004).

Para verificação da linearidade foram analisadas as três curvas analíticas preparadas em determinações independentes. De acordo com a Tabela 17, que apresenta a média dos resultados das três curvas, fica comprovada a linearidade do método.

Tabela 17: Resultado da linearidade do estudo de caso 3.3 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 971/2005, 2005)

Linearidade			
r	0,9998	A	-0,0026
b	0,0594	Absorvância do Branco	0,007
$S_{y/x}$	0,0109	IC_a	-0,018 à 0,013

Para determinar a exatidão foram preparadas, em triplicata, sete amostras de concentrações diferentes de ribose – 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 e 25,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ - englobando toda a faixa de trabalho do laboratório. Executou-se este ensaio três vezes. Com os resultados das medidas de absorvância das soluções, foram calculadas as concentrações para a avaliação da recuperação e para a construção da curva analítica – concentração calculada x concentração nominal. A partir dos resultados mostrados na Tabela 18 foi possível confirmar a exatidão do método, tendo em vista que a recuperação média das soluções da curva foi de 100%, que os coeficientes angulares foram iguais a um

e os lineares iguais a zero, e que os intervalos de confiança dos coeficientes angulares e dos lineares continham o um e o zero, respectivamente.

Tabela 18: Resultados de exatidão do estudo de caso 3.3 (BIO_MANGUINHOS PROTOCOLO 971/2005, 2005)

Exatidão dos Pontos da Curva de Calibração						
Recuperação (%)						
Ponto	D-Ribose (ug/mL)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média	CV%
1	1	109	95	89	98	2,3
2	2,5	102	97	96	98	2,6
3	5	99	103	100	100	1,7
4	10	97	99	101	99	0,64
5	15	101	100	102	101	0,71
6	20	101	100	101	101	0,58
7	25	99	100	99	99	0,42
Média					100 %	1,3 %
Coeficientes da Curva						
Coeficientes	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média		
b	1,00	1,00	1,00	1,00		
a	0,00	0,00	0,00	0,00		
Intervalos de Confiança (IC)						
Curva	Intervalo Linear		Intervalo Angular			
1	-0,29999	0,29999	0,96596	1,03404		
2	-0,12188	0,12188	0,98612	1,01383		
3	-0,35459	0,35459	0,95977	1,04023		
Média	-0,25882	0,25882	0,97063	1,02937		

Para a determinação da precisão foram separados os resultados das seis soluções padrão de $758 \mu\text{g mL}^{-1}$ de polissacarídeo, preparadas em triplicata, para cada curva de calibração. O analista 1 executou esse ensaio duas vezes em dias diferentes, para avaliação da reprodutibilidade variando o dia (valor máximo para o coeficiente de variação igual a 6%). O analista 2 executou esse ensaio uma vez para avaliação da reprodutibilidade variando analista (valor máximo para o coeficiente de variação igual a 6%). A repetitividade foi avaliada por ensaio, já que havia número de dados suficiente (limite para o coeficiente de variação igual a 3%). A equivalência entre dias e analista foi avaliada pelos testes *F* e *t*.

De acordo com os resultados da Tabela 19, a precisão foi verificada porque o CV_r ficou em torno de 1% e o CV_R ficou em torno de 1,4%. As comparações entre os analistas e os dias foram equivalentes, confirmando estarem os dois adequadamente treinados para a execução do ensaio.

Tabela 19: Resultados de precisão e de equivalência do estudo de caso 3.3 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 971/2005, 2005)

Repetitividade				
Parâmetro	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média
Polissacarídeo ($\mu\text{g/mL}$)	708	693	687	696
S_r - ($\mu\text{g/mL}$)	6,9	6,5	7,2	6,8
CV_r %	0,97	0,94	1,0	1,0
r a 95% - ($\mu\text{g/mL}$)	19	18	20	19
Reprodutibilidade de Intralaboratorial				
Parâmetro	Analista	Dia	Média	
Polissacarídeo ($\mu\text{g/mL}$)	696	700	698	
S_R - ($\mu\text{g/mL}$)	8,2	12	10	
CV_R %	1,2	1,7	1,4	
R a 95% - ($\mu\text{g/mL}$)	28	33	31	
Equivalência	Sim	Sim	Sim	

Os resultados dos ensaios de linearidade e repetitividade foram aproveitados para avaliação da especificidade. O objetivo desses resultados foi demonstrar que não houve interferência significativa do branco na quantificação do polissacarídeo na amostra e no padrão (curva de calibração).

Na estimativa de incerteza, mostrada na Tabela 20, os componentes significativos foram identificados; portanto, as contribuições de cada fonte foram estimadas separadamente. Nesta estimativa, as pesagens, as diluições e os erros das micropipetas, da balança e das vidrarias foram levados em consideração. Para uniformização das unidades o C_i foi estimado para cada fonte.

Como indicado na Figura 7, a incerteza do espectrofotômetro foi a que mais contribuiu para a incerteza total do método e, de acordo com a Tabela 20, a incerteza padrão expandida a 95% de confiança para $k = 2$ corresponde a $21 \mu\text{g mL}^{-1}$, valor este que equivale a 3% do valor teórico do polissacarídeo padrão.

O resultado final da determinação deve ser expresso como a média acrescida ou diminuída da incerteza. Ele deve situar-se dentro da faixa de especificação previamente determinada, devendo ser expresso sem casas decimais.

De acordo com os resultados apresentados, o laboratório em questão está apto para executar este método analítico. Porém, como o laboratório trabalha com amostras com baixas quantidades de polissacarídeo, recomenda-se substituir o equipamento por um mais sensível.

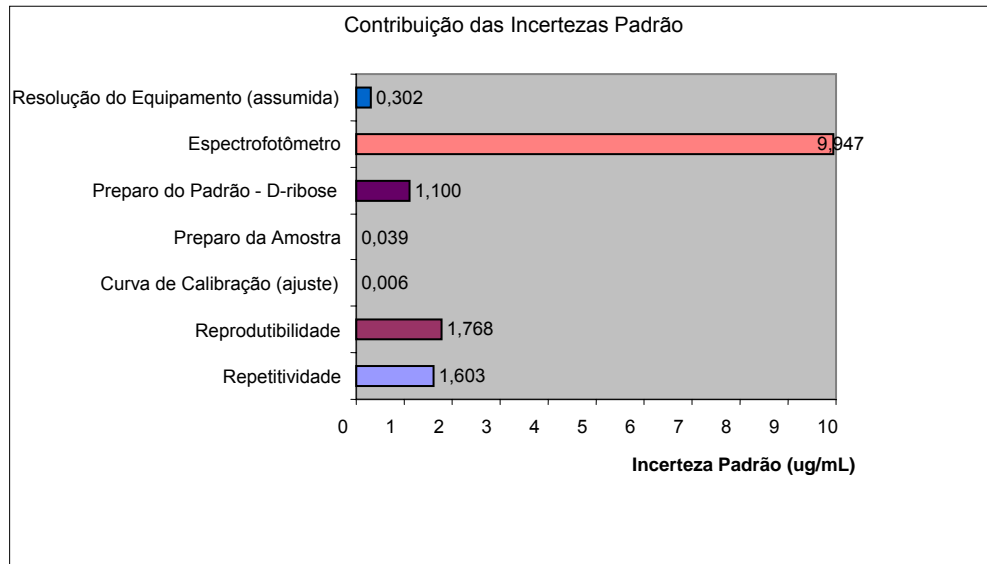


Figura 7: Contribuição das incertezas do estudo de caso 4.3 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 971/2005, 2005)

Tabela 20: Estimativa de incerteza do estudo de caso 4.3 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 971/2005, 2005)

Estimativa de Incerteza para Determinação de Polissacarídeo por Orcinol											
s _(i)	Tipo	Fonte	Valor incerteza ±	Unidade	Distr.	DIV.	C _(i)	u(i)	GL	u(i) ⁴ /GL	
1	A	Repetitividade	6,8000	ug/mL	Normal	4,243	1,000	1,603	17	0,3881877	
2	A	Reprodutibilidade	10,0000	ug/mL	Normal	5,657	1,000	1,768	31	0,3150202	
3	A	Curva de Calibração (ajuste)	0,0109	ug/mL	Normal	1,732	1,000	0,006	2	7,842E-10	
4	B	Preparo da Amostra	0,0770	ug/mL	Normal	2,000	1,000	0,039			
5	B	Preparo do Padrão - D-ribose	2,2000	ug/mL	Normal	2,000	1,000	1,100			
6	B	Espectrofotômetro	0,0190	ug/mL	Normal	2,000	1047	9,947			
7	B	Resolução do Equipamento (assumida)	0,0005	ug/mL	Retangular	1,732	1047	0,302			
uc								Incerteza padrão Combinada		10,292	15957
U						Incerteza padrão Expandida (95%)		k=	2	21	µg/mL

3.4 Validação retrospectiva e estimativa da incerteza na medida do pH em água ultrapura

3.4.1 Determinação de pH

A potenciometria é uma técnica analítica baseada na medida de potencial de células eletroquímicas na ausência de correntes apreciáveis. As células para medidas potenciométricas são formadas por um eletrodo de referência e um eletrodo indicador ligados a um instrumento capaz de medir a diferença de potencial entre eles (EWING'S ANALITICAL INSTRUMENTATION HANDBOOK, 2005).

Desde os anos 1930, o modo mais conveniente de determinar o pH tem sido por medida da diferença de potencial através de uma membrana de vidro que separa a solução do analito de uma solução de referência, com determinada acidez. A célula moderna típica para medida de pH é formada por um eletrodo indicador de vidro e de um eletrodo de referência de prata/cloreto de prata ou de calomelano saturado, imerso na solução cujo pH deve ser determinado. O eletrodo indicador consiste em uma fina membrana de vidro sensível ao pH, selada na extremidade de um tubo de plástico ou de vidro. Um pequeno volume de ácido clorídrico diluído e saturado com cloreto de prata está contido no tubo (em alguns eletrodos, a solução interna é um tampão que contém o íon cloreto). Um fio de prata/cloreto de prata, em contato com esta solução, forma um eletrodo de prata-cloreto de prata que é conectado a um dos terminais do dispositivo que mede o potencial. O eletrodo de referência é conectado ao outro terminal. A Figura 8 mostra uma representação esquemática para a célula para medida de pH (SKOOG *et. al.*, 2002).



Figura 8: Diagrama de uma célula para medida de pH (SKOOG *et. al.*, 2002).

O eletrodo de vidro é uma ferramenta muito versátil para medidas de pH sob diferentes condições. O eletrodo pode ser usado sem interferências em soluções contendo oxidante e redutores fortes, gases e proteínas; o pH de fluidos viscosos ou mesmo semi-sólidos também pode ser determinado (SKOOG *et. al.*, 2002).

A utilidade do pH como medida de acidez ou alcalinidade de meios aquosos, a ampla disponibilidade de eletrodos de vidro comerciais e a recente comercialização de pHmetros

de estado sólido a baixo custo transformaram as medidas potenciométricas de pH numa das técnicas analíticas mais comuns em toda ciência. Assim, é importante que o pH seja definido de modo a ser facilmente reproduzido ao longo do tempo e nos vários laboratórios pelo mundo. Assim, é fundamental que o pH seja definido em termos operacionais, isto é, pelo modo no qual a medida é feita, como forma de garantir que o pH medido por um profissional seja o mesmo que o medido por outro. A definição operacional de pH está baseada na calibração direta do medidor com soluções padrão (composição estabelecida pelo NIST) seguida da medida do pH da(s) solução(ões) desconhecida(s) (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1998).

O pH é uma grandeza que expressa a intensidade da acidez ou da basicidade de um determinado meio. É definido como logaritmo decimal do inverso da atividade dos íons hidrogênio na solução em estudo (a_{H^+}) (SKOOG *et. al.*, 2002).

$$pH = \log (1/a_{H^+}) = - \log a_{H^+} \quad (39)$$

Para soluções muito diluídas como, por exemplo, aquelas com força iônica menor que 0,1, a atividade pode ser substituída pela concentração molar (SKOOG *et. al.*, 2002).

3.4.2 Determinação do pH da água ultrapura

A medida do pH da água ultrapura é difícil, tendo em vista que a mesma pode se contaminar rapidamente pelo contato com a atmosfera do laboratório. Além disso, dada a sua elevada pureza, ela apresenta baixa condutância, o que provoca instabilidade na maior parte dos instrumentos de medição de pH, à exceção daqueles especificamente concebidos para estas medidas específicas (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1998)

A água ultrapura tende a se contaminar com os componentes do meio ambiente tão logo seja exposta à atmosfera do laboratório. Assim, uma pequena fração do CO₂ do ar dissolve-se em água, estabelecendo um equilíbrio que envolve ácido carbônico e íons hidrogênio, carbonato e bicarbonato. A contaminação com íons cálcio pode ocorrer nos laboratórios em que existem revestimentos ou divisórias de gesso, enquanto a contaminação com chumbo pode ocorrer quando a pintura das paredes foi feita com tintas antigas (pigmentos a base de compostos de chumbo). Outra fonte de contaminação pode vir da frascaria, que se for de vidro pode determinar a presença de sílica e íons sódio na água ultrapura (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1998).

Por outro lado, a medição do pH neste tipo de água não é simples. Os medidores de pH comuns foram projetados para a medição em soluções que contêm íons dissolvidos. Quando se introduz um eletrodo de referência de calomelano na água ultrapura, uma célula

secundária é criada devido à forte diferença de concentrações entre o eletrodo e a solução. Além disso, o cloreto de potássio começa imediatamente a se difundir a partir do eletrodo que está imerso na solução, criando flutuações na medição.

Neste estudo de caso foi abordado um método quantitativo: a determinação do pH nos diluentes de vacinas e na água ultrapura. Por se tratar de um método simples e de rotina, os resultados das medições foram utilizados para a elaboração de cartas de controle a serem usadas em validações analíticas com objetivo de verificar se o processo de medição do pH atende aos níveis de qualidade desejados, bem como de identificar as principais causas de erros (operador, instrumentos ou soluções de trabalho).

Seguindo as etapas necessárias para que a confiabilidade das análises seja atingida, o laboratório realizou a validação do método, a estimativa de incerteza e a participação de ensaios de proficiência, além da verificação da conformidade do sistema, empregando uma amostra de referência.

3.4.4 Ensaio e resultados

A validação dos ensaios consistiu na construção das cartas de controle para verificação da precisão – reprodutibilidade intralaboratorial e da incerteza, como preconizado pela USP 27, 2003 para métodos quantitativos de determinação de características físico-químicas de uma solução (categoria III).

A sensibilidade das medições a variações de temperatura foi compensada pela autocalibração das soluções tampão de pH = 7,0 e pH = 4,0 e com o uso dos sensores de temperatura dos instrumentos utilizados (Radiometer, modelo VIT90; Quimis e Mettler Toledo, modelo PMH21).

As medições foram realizadas com o maior número de variações possíveis, ou seja, a cada dia, um analista separou as amostras de trabalho: água, diluente e soluções tampão. Atingido o equilíbrio térmico com o ambiente, os três pH-metros eram calibrados com as soluções tampão de pH = 7,0 e de pH = 4,0. Uma alíquota de cada solução era retirada e as medidas de pH eram feitas, sob agitação constante. Este procedimento foi repetido durante trinta dias por analistas diferentes.

A partir de trinta resultados, foram construídos os gráficos das amplitudes móveis e das médias para cada amostra de trabalho.

Para o gráfico das amplitudes, que verifica a variação dentro das medições (precisão), foram calculadas as trinta médias diárias, as amplitudes móveis, a média das amplitudes e os limites superiores e inferiores de controle. Para o gráfico das médias, que verifica a variação da média da medição (exatidão), foram calculadas as trinta médias

diárias, a média das médias, o desvio padrão das medidas e os limites superiores e inferiores de controle.

Os limites de controle, de acordo com um subgrupo de uma análise, para o gráfico das amplitudes foi calculado multiplicando-se a média de todas amplitudes por $D3$ – limite inferior – e $D4$ – limite superior, que são constantes tabeladas de acordo com o número de medidas. Para o gráfico das médias, os limites de controle foram calculados a partir da adição – limite superior – e da subtração – limite inferior – da grande média, pelo produto de três vezes o desvio padrão calculado.

A Tabela 21 apresenta os resultados para as medições realizadas na amostra de diluente de vacina. Aproveitando-se estes dados, foram construídos os gráficos das amplitudes (Tabela 22 e Figura 9) e das médias (Tabela 23 e Figura 10). A análise dos resultados indicou que a medição do pH nos diluentes atendeu aos níveis de qualidade desejados, estando sob controle.

A Tabela 24 apresenta os resultados para as medições realizadas com a solução tampão pH = 7,0. Aproveitando-se estes dados, foram construídos os gráficos das amplitudes (Tabela 25 e Figura 11) e das médias (Tabela 26 e Figura 12). De acordo com os resultados, a vigésima primeira medição ficou acima do limite superior de controle, porém, analisando-se os dados pela distribuição t de Student, a probabilidade das medições de pH que situou-se fora dos limites de controle neste laboratório, com base nessa amostra, foi de 0,028%. Assim, o resultado enquadrou-se dentro dos limites de especificação da amostra, na temperatura de trabalho, não havendo portanto, necessidade de intervenção no processo. Apenas um resultado fora dos limites de controle não invalidou a medição de pH, ou seja, a mesma foi considerada dentro do controle para esta solução.

De qualquer modo, sempre que forem utilizadas novas soluções tampão, é recomendado um novo estudo para manutenção da qualidade das medições.

A Tabela 27 apresenta os resultados para as medições realizadas com a água ultrapura. Aproveitando-se estes dados, os gráficos de amplitudes (Tabela 28 e Figura 13) e das médias (Tabela 29 e Figura 14) foram construídos. A avaliação dos resultados indicou que a medição do pH em água ultra pura atendeu aos níveis de qualidade desejados, estando sob controle.

No estudo de caso em questão foi comprovado que a amostra não interfere diretamente na incerteza da medição de pH, já que antes da leitura o analista calibra o medidor de pH com soluções tampão de pH 4 e 7. Essa comparação é mostrada nas Tabelas 30, 31, 32 e 33, nas quais foi estimada uma incerteza para cada tipo de amostra e uma incerteza sem amostra. As contribuições de incerteza do tipo A foram os desvios padrão retirados dos gráficos de controle das médias e as contribuições do tipo B foram retiradas dos certificados de calibração do material e de pureza dos reagentes.

Considerando-se $k = 2,000$, para um intervalo de confiança de 95% de probabilidade, a incerteza padrão na medida do pH é 0,037. Como pode ser visto na Tabela 34, a mesma incerteza padrão foi obtida para a solução tampão pH 7 ($k = 2,000$). No entanto, para a amostra de água ultrapura este valor foi de 0,041, para $k = 1,960$.

Como os medidores de pH utilizados somente fornecem resultados com duas casas decimais, conclui-se que o resultado final da incerteza estimada para medição de pH, neste laboratório, é 0,04 para $k = 2,00$ a 95% de probabilidade.

A compatibilidade dos resultados do programa de ensaio de proficiência, organizado e gerenciado por uma administradora de águas, foi avaliada pelo índice Z Score, ou seja, o desempenho individual. Foram analisados, em duplicata, três tipos de amostras – ácida, neutra e alcalina. A variância intralaboratorial do ensaio de proficiência foi determinada com o objetivo de medir o tamanho da variação entre as medidas realizadas em cada laboratório. Portanto, de acordo com os resultados da Tabela 35, todos os resultados de medição de pH apresentados pelo laboratório em questão, foram considerados satisfatórios.

Dentre as etapas de garantia do controle de qualidade – validação do método, estimativa de incerteza e participação de ensaios de proficiência – e de acordo com os resultados apresentados, o laboratório está apto para executar as medições de pH na faixa ácida de medidas.

Depois de determinados os limites de controle, um procedimento de ação quando esses limites forem ultrapassados é pertinente, ou seja, repetir a análise no mesmo equipamento e em outro equipamento diferente para verificar se o problema é da amostra. Verificando que o problema é de medição, efetuar a leitura com um padrão, em mais de um equipamento, por mais de um analista, para investigar se o problema é do padrão ou do analista. Verificando que o problema é do equipamento, retirar o mesmo da rotina e encaminhar para manutenção.

Tabela 21: Condições e resultados das medidas de pH da amostra de vacina do estudo de caro 4.4 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 2281/2004, 2005)

Condições									
Tempo dos Dados		2 leituras a cada dia			Tipo de Amostra			Vacina	
Temperatura (média)		24°C			Lote			---	
Início		19/07/2004			Final			31/08/2004	
Subgrupos / Medidas de pH									
Dia	Leituras	Dia	Leituras	Dia	Leituras	Dia	Leituras	Dia	Leituras
1	6,7 / 6,7	7	6,8 / 6,8	13	6,8 / 6,8	19	6,8 / 6,8	25	6,8 / 6,8
2	6,8 / 6,8	8	6,8 / 6,8	14	6,7 / 6,7	20	6,8 / 6,8	26	---
3	6,8 / 6,8	9	6,8 / 6,8	15	6,8 / 6,8	21	6,7 / 6,7	27	---
4	6,8 / 6,8	10	6,7 / 6,7	16	6,8 / 6,8	22	6,8 / 6,8	28	---
5	6,8 / 6,8	11	6,8 / 6,8	17	6,8 / 6,8	23	6,8 / 6,8	29	---
6	6,8 / 6,8	12	6,8 / 6,8	18	6,8 / 6,8	24	6,8 / 6,8	30	---

Tabela 22: Cálculos para a construção do gráfico de controle das amplitudes para a amostra de vacina no estudo de caso 3.4 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 2281/2004, 2005)

Cálculos para o gráfico das amplitudes – Amostra: Vacina – Referente à Figura 9			
Amplitude Geral	0,0	Número de Observações	25
Desvio Padrão	---	Constantes D_3 e D_4	0 e 3,267
LIC e LSC	0,0 e 0,0	Valores Fora do Limite	---

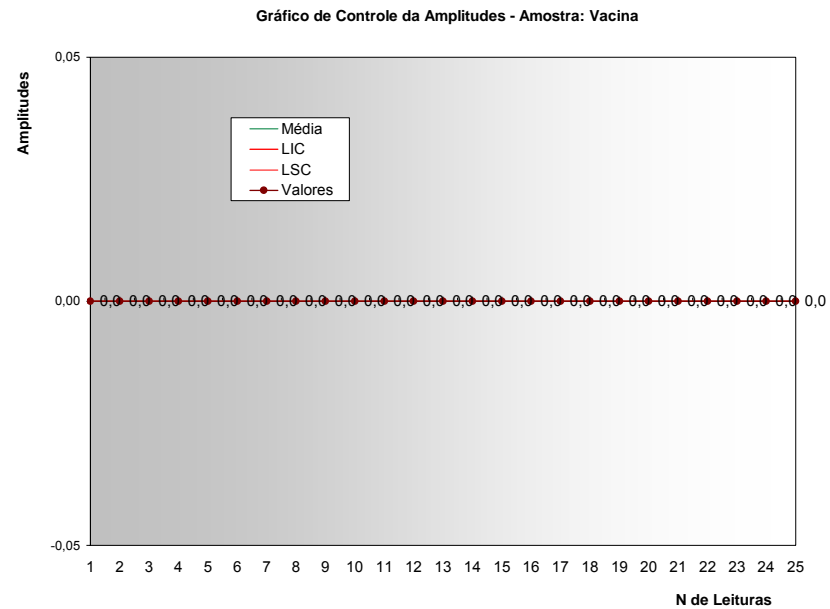


Figura 9: Gráfico de controle das amplitudes para a amostra de vacina (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 2281/2004, 2005).

Tabela 23: Cálculos para a construção do gráfico de controle das médias para a amostra de vacina do estudo de caso 4.4 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 2281/2004, 2005)

Cálculos para o gráfico das médias – Amostra: Vacina – Referente à Figura 10			
Média Geral	6,8	Número de Observações	25
3 X Desvio Padrão (99,75%)	0,12	LIC e LSC	6,67 e 6,90
Valores Fora dos Limites de Controle		---	

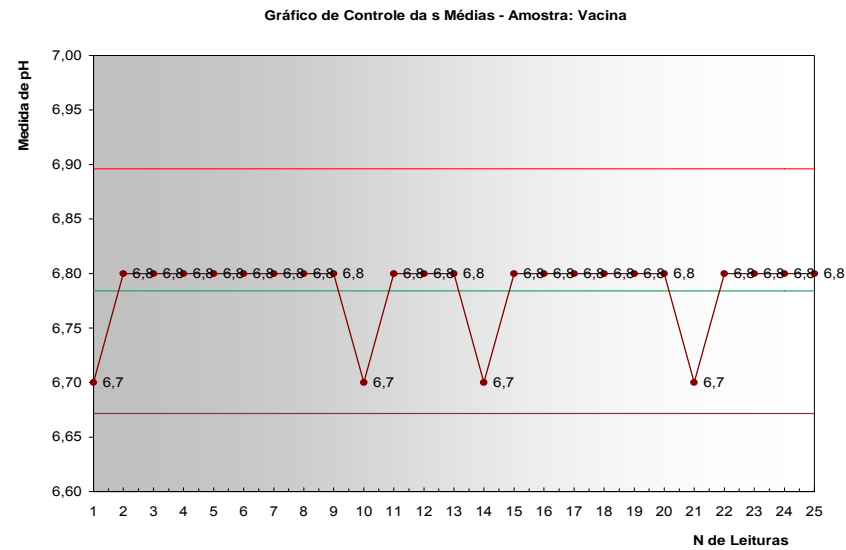


Figura 10: Gráfico de controle das médias para a amostra de vacina (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 2281/2004, 2005)

Tabela 24: Condições e resultados das medidas de pH da solução tampão pH 7 do estudo de caso 4.4 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 2281/2004, 2005)

Condições									
Tempo dos Dados		1 leitura a cada dia			Tipo de Dados			Solução de pH 7	
Temperatura (média)		24°C			Lote			---	
Início		19/07/2004			Fim			04/09/2004	
Subgrupos / Medidas de pH									
Dia	Leituras	Dia	Leituras	Dia	Leituras	Dia	Leituras	Dia	Leituras
1	6,7 / 6,7	7	6,8 / 6,8	13	6,8 / 6,8	19	6,8 / 6,8	25	7,0
2	7,0	8	7,0	14	7,0	20	7,0	26	7,0
3	7,0	9	7,0	15	7,0	21	7,1	27	7,0
4	7,0	10	7,0	16	7,0	22	7,0	28	7,0
5	7,0	11	7,0	17	7,0	23	7,0	29	7,0
6	7,0	12	7,0	18	7,0	24	7,0	30	7,0

Tabela 25: Cálculos para a construção do gráfico de controle das amplitudes para a solução tampão pH 7 do estudo de caso 4.4 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 2281/2004, 2005)

Cálculos para o gráfico das amplitudes – Amostra: Tampão pH 7 – Referente à Figura 11			
Amplitude Geral	0,0069	Número de Observações	30
Desvio Padrão	0,0061	Constantes D_3 e D_4	0 e 3,267
LIC e LSC	0,000 e 0,023	Valores Fora do Limite	0,1 (subgrupo = 21 ^o)

Gráfico de Controle de Amplitude - Amostra: Tampão pH 7

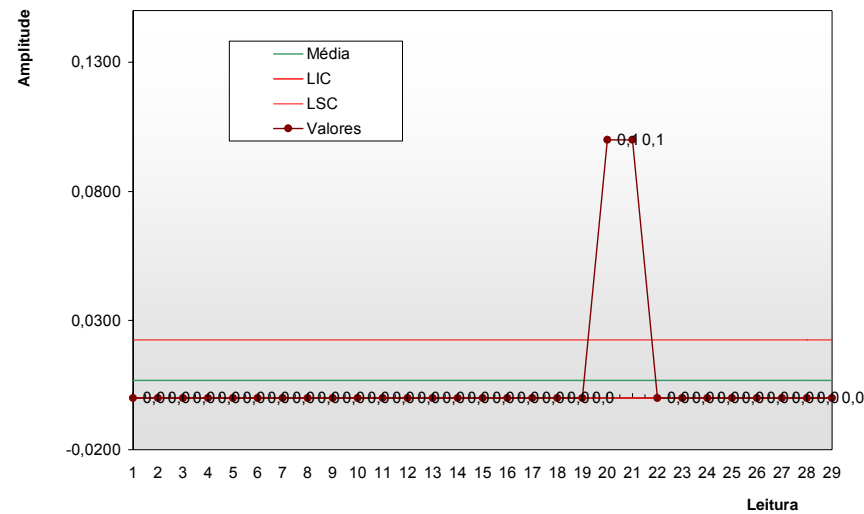


Figura 11: Gráfico de controle das amplitudes para a solução tampão pH 7 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 2281/2004, 2005)

Tabela 26: Cálculos para a construção do gráfico de controle das médias para a solução tampão pH 7 do estudo de caso 4.4 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 2281/2004, 2005)

Cálculos para o gráfico das médias – Amostra: Tampão pH 7 – Referente à Figura 12			
Média Geral	7,0	Número de Observações	30
3 X Desvio Padrão (99,75%)	0,018	LIC e LSC	6,69 e 7,02
Valores Fora dos Limites de Controle		7,1 (subgrupo = 21°)	

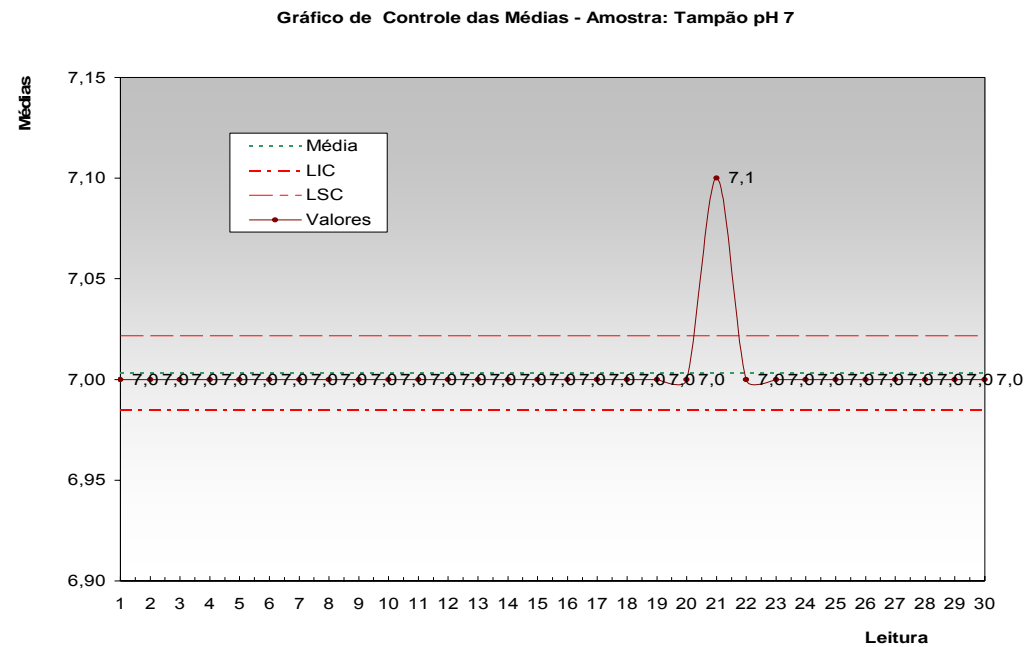


Figura 12: Gráfico de controle das médias para a solução tampão pH 7 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 2281/2004, 2005)

Tabela 27: Condições e resultados das medições de pH para a água ultrapura do estudo de caso 4.4 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 2281/2004, 2005)

Condições									
Tempo dos Dados		1 leituras a cada dia		Tipo de Dados		Água Ultrapura			
Temperatura (média)		25°C		Lote		---			
Início		Abril / 2004		Fim		Maio / 2004			
Subgrupos / Medidas de pH									
Dia	Leituras	Dia	Leituras	Dia	Leituras	Dia	Leituras	Dia	Leituras
1	5,9	7	6,0	13	5,8	19	5,8	25	5,8
2	6,0	8	5,9	14	5,9	20	5,9	26	5,9
3	5,9	9	5,9	15	5,8	21	5,8	27	5,7
4	5,9	10	6,0	16	5,9	22	5,8	28	5,9
5	5,8	11	5,9	17	5,9	23	5,9	29	5,9
6	5,9	12	5,9	18	5,8	24	5,8	30	5,9

Tabela 28: Cálculos para a construção do gráfico de controle das amplitudes para a água ultrapura do estudo de caso 3.4 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 2281/2004, 2005)

Cálculos do Gráfico das Amplitudes – Amostra: Água Ultrapura – Referente ao Gráfico: 13			
Amplitude Geral	0,076	Número de Observações	30
Desvio Padrão	0,055	Constantes D_3 e D_4	0 e 3,267
LIC e LSC	0,000 e 0,025	Valores Fora do Limite	---

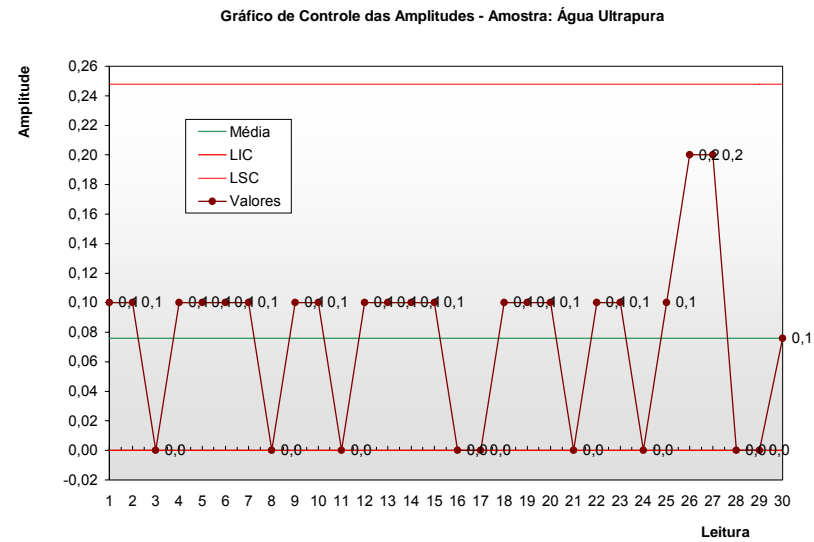


Figura 13: Gráfico de controle das amplitudes para a água ultrapura (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 2281/2004, 2005)

Tabela 29: Cálculos para a construção do gráfico de controle das mM para a água ultrapura do estudo de caso 4.4 (PROTOCOLO 2281/2004, 2005)

Cálculos para o gráfico das médias – Amostra: Água Ultrapura – Referente à Figura 14			
Média Geral	5,9	Número de Observações	30
3 X Desvio Padrão (99,75%)	0,17	LIC e LSC	5,7 e 6,0
Valores Fora dos Limites de Controle			---

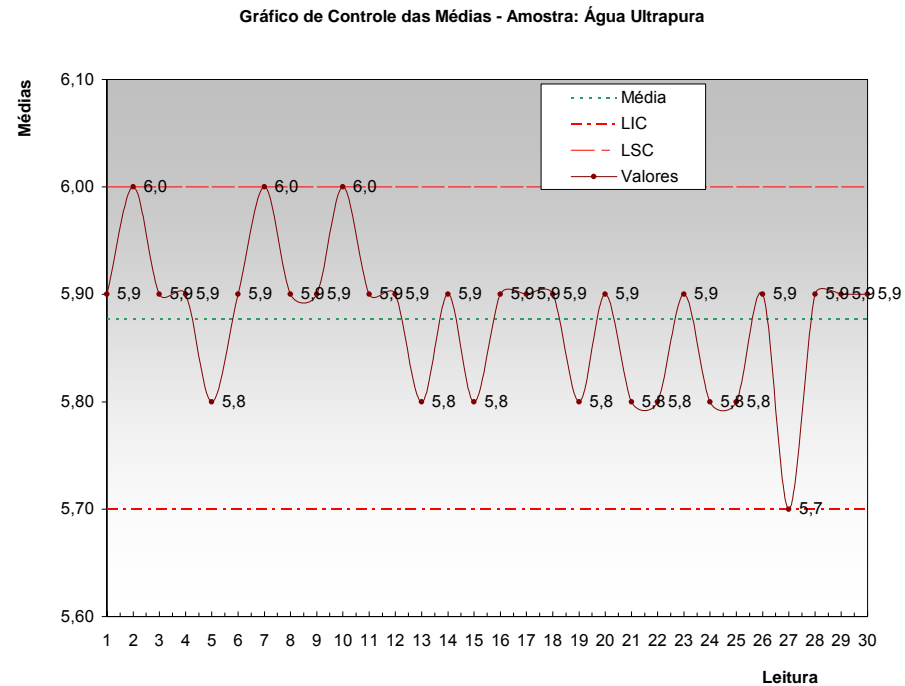


Figura 14: Gráfico de controle das médias para a água ultrapura (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 2281/2004, 2005)

Tabela 30: Estimativa de incerteza para a amostra de vacina do estudo de caso 4.4 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 2281/2004, 2005)

Estimativa de Incerteza para Determinação de pH – Amostra: Vacina											
s _(i)	Tipo	Fonte	Valor incerteza ±	Unidade	Distr.	DIV.	C _(i)	u(i)	GL	u(i) ⁴ /GL	
1	A	Vacina	0,040	pH	Normal	5,000	1,00	0,00800	24	1,71E-10	
2	B	Resolução pH-metro	0,010	pH	Retangular	3,464	1,00	0,00289			
3	B	Solução Padrão 7	0,015	pH	Normal	2,000	1,00	0,00750			
4	B	Erro não corrigido tampão 7	0,010	pH	Normal	1,000	1,00	0,01000			
5	B	Solução Padrão 4	0,015	pH	Normal	2,000	1,00	0,00750			
6	B	Erro não corrigido tampão 4	0,010	pH	Normal	1,000	1,00	0,01000			
7	B	Deriva de calib tampão 7 assumida	0,005	pH	Retangular	1,732	1,00	0,00289			
8	B	Deriva de calib tampão 4 assumida	0,005	pH	Retangular	1,732	1,00	0,00289			
uc	Incerteza padrão Combinada							0,02004	944,54		
U	Incerteza padrão da medição de pH (95%)					k=	1,96	0,039			

Tabela 31: Estimativa de incerteza para a solução tampão pH 7 do estudo de caso 4.4 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 2281/2004, 2005)

Estimativa de Incerteza para Determinação de pH – Amostra: Tampão pH 7											
s _(i)	Tipo	Fonte	Valor incerteza \pm	Unidade	Distr.	DIV.	C _(i)	u(i)	GL	u(i) ⁴ /GL	
1	A	Tampão 7	0,006	pH	Normal	5,477	1,00	0,00111	29	5,3E-14	
2	B	Resolução pH-metro	0,010	pH	Retangular	3,464	1,00	0,00289			
3	B	Solução Padrão 7	0,015	pH	Normal	2,000	1,00	0,00750			
4	B	Erro não corrigido tampão 7	0,010	pH	Normal	1,000	1,00	0,01000			
5	B	Solução Padrão 4	0,015	pH	Normal	2,000	1,00	0,00750			
6	B	Erro não corrigido tampão 4	0,010	pH	Normal	1,000	1,00	0,01000			
7	B	Deriva de calib tampão 7 assumida	0,005	pH	Retangular	1,732	1,00	0,00289			
8	B	Deriva de calib tampão 4 assumida	0,005	pH	Retangular	1,732	1,00	0,00289			
uc	Incerteza padrão Combinada							0,01840	2162992,37		
U	Incerteza padrão da medição de pH (95%)					k=	2,00	0,037			

Tabela 32: Estimativa de incerteza para a água ultrapura do estudo de caso 4.4 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 2281/2004, 2005)

Estimativa de Incerteza para Determinação de pH – Amostra: Água Ultrapura											
s _(i)	Tipo	Fonte	Valor incerteza ±	Unidade	Distr.	DIV.	C _(i)	u(i)	GL	u(i) ⁴ /GL	
1	A	Água ultrapura	0,055	pH	Normal	5,477	1,00	0,01004	29	3,51E-10	
2	B	Resolução pH-metro	0,010	pH	Retangular	3,464	1,00	0,00289			
3	B	Solução Padrão 7	0,015	pH	Normal	2,000	1,00	0,00750			
4	B	Erro não corrigido tampão 7	0,010	pH	Normal	1,000	1,00	0,01000			
5	B	Solução Padrão 4	0,015	pH	Normal	2,000	1,00	0,00750			
6	B	Erro não corrigido tampão 4	0,010	pH	Normal	1,000	1,00	0,01000			
7	B	Deriva de calib tampão 7 assumida	0,005	pH	Retangular	1,732	1,00	0,00289			
8	B	Deriva de calib tampão 4 assumida	0,005	pH	Retangular	1,732	1,00	0,00289			
uc	Incerteza padrão Combinada							0,02094	548,02		
U	Incerteza padrão da medição de pH (95%)					k=	1,96	0,041			

Tabela 33: Estimativa de incerteza sem amostra do estudo de caso 4.4 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 2281/2004, 2005)

Estimativa de Incerteza para Determinação de pH – Sem Amostra											
s _(i)	Tipo	Fonte	Valor incerteza ±	Unidade	Distr.	DIV.	C _(i)	u(i)	GL	u(i) ⁴ /GL	
1	B	Resolução pH-metro	0,010	pH	Retangular	3,464	1,00	0,00289			
2	B	Solução Padrão 7	0,015	pH	Normal	2,000	1,00	0,00750			
3	B	Erro não corrigido tampão 7	0,010	pH	Normal	1,000	1,00	0,01000			
4	B	Solução Padrão 4	0,015	pH	Normal	2,000	1,00	0,00750			
5	B	Erro não corrigido tampão 4	0,010	pH	Normal	1,000	1,00	0,01000			
6	B	Deriva de calib tampão 7 assumida	0,005	pH	Retangular	1,732	1,00	0,00289			
7	B	Deriva de calib tampão 4 assumida	0,005	pH	Retangular	1,732	1,00	0,00289			
uc								Incerteza padrão Combinada		0,01837	
U						Incerteza padrão da medição de pH (95%)		k= 2,00	0,037		

Tabela 34: Resumo dos resultados do Laboratório na participação de ensaios de proficiência em medição de pH do estudo de caso 4.4 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 2281/2004, 2005)

Ensaio	Data	Faixa Ácida		Faixa Neutra		Faixa Alcalino	
		<i>Z score</i>	Variância	<i>Z score</i>	Variância	<i>Z score</i>	Variância
1	Janeiro / 2003	Satisfatório	1,12E-05	N/A	N/A	Satisfatório	1,14E-06
2	Junho / 2003	Satisfatório	1,72E-04	N/A	N/A	Satisfatório	6,37E-03
3	Janeiro / 2004	Satisfatório	2,95E-06	N/A	N/A	Satisfatório	3,74E-07
4	Agosto / 2004	Satisfatório	1,53E-05	Satisfatório	1,57E-05	N/A	N/A

3.5 Revalidação do método analítico de determinação de pH

3.5.1 Introdução

Este estudo de caso contempla um método quantitativo executado no laboratório de metrologia e validação. Ele consiste numa revalidação do método, que foi necessária devido à aquisição de um novo instrumento para medida de pH. Assim, ele pode ser considerado como um exemplo típico da necessidade de verificação da metodologia analítica devido a alguma alteração na rotina da medição.

Foi realizada uma verificação da adequação do equipamento ao ensaio feito no laboratório e também da habilidade dos analistas com relação à operação do equipamento, através da avaliação da precisão e das equivalências dos equipamentos e dos analistas. Apenas os analistas que haviam participado da primeira validação deste ensaio, nesse laboratório, executaram os ensaios de revalidação, já que o limite máximo de variação permitido nas medições de pH foi estabelecido na primeira validação.

3.5.2 Ensaio e resultados

Na verificação da adequação do equipamento novo ao laboratório foram selecionados três tipos de amostra – soluções tampão (pH = 4, pH = 7 e pH = 10), dois analistas e dois equipamentos – o novo (Metrohm, modelo 781 pH/ion meter) e um antigo (WTW, modelo ionLab Level 2), no qual o método havia sido validado. Todas as determinações foram realizadas no mesmo dia.

Na avaliação da repetitividade, mostrada na Tabela 35, cada analista separou seis alíquotas de cada amostra, aguardou o equilíbrio térmico com o ambiente e efetuou as medições do pH das soluções no mesmo momento, nos dois instrumentos disponíveis. A média das médias, entre os dois analistas, de todos os tipos de amostra, do coeficiente de variação foi igual a 0,052%, no equipamento I (novo), e a 0,077%, no equipamento II (antigo). De acordo com a validação anterior, na Tabela 36, este valor poderia ser menor ou igual a média dos coeficientes de variação resultantes das leituras, das soluções tampão (pH = 4, pH = 7 e pH = 10), efetuadas no equipamento antigo (II), ou seja, até 0,17%. Como as soluções possuíam o pH conhecido (soluções tampão), a exatidão pode ser estimada, tendo sido encontrado valor igual a 100% para todas as amostras, garantindo, assim, a qualidade das leituras de pH no laboratório.

Na avaliação da reprodutibilidade intralaboratorial, também mostrada na Tabela 37 – variando o equipamento e o analista – os cálculos dos ensaios de repetitividade foram aproveitados, já que essa avaliação foi realizada dentro de um grupo de ensaios variando

alguma condição possível na rotina do laboratório. O coeficiente de variação de reprodutibilidade médio foi de 0,23%, igual ao preconizado na validação anterior.

Para verificação da repetitividade sistema de medição novo, um analista separou uma alíquota de cada tipo de amostra e efetuou dez leituras das mesmas. O coeficiente de variação obtido, mostrado na Tabela 38, foi igual a 0,0097%, menor do que o determinado na primeira validação, no equipamento antigo, que foi igual a 0,014%.

As equivalências foram avaliadas para todas as amostras (pH = 4, pH = 7 e pH = 10), empregando-se os dados de precisão e utilizando-se os testes F e t , pois só havia dois grupos de análise (dois equipamentos e dois analistas). De acordo com os resultados obtidos, aplicados às três soluções tampão, os equipamentos I (novo) e II (antigo) e os analistas foram equivalentes, ou seja, descartou-se a hipótese da diferença entre os mesmos em relação à precisão (repetitividade e reprodutibilidade) e à exatidão, respectivamente, utilizando os resultados de pH com duas casas decimais

Tabela 35: Resultados de precisão, repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial do estudo de caso 4.5 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 913/2005, 2005)

Repetitividade			
Analista I - Equipamento I (Novo)		Analista II - Equipamento I (Novo)	
Médias (pH 4, 7 e 10)	3,993 / 7,007 / 9,923	Médias (pH 4, 7 e 10)	3,985 / 7,009 / 9,916
S_r / CV_r %	0,0050 / 0,057	S_r / CV_r %	0,0040 / 0,047
r_a (95%)	0,012	r_a (95%)	0,012
Exatidão % (pH 4, 7 e 10)	100 / 100 / 99	Exatidão % (pH 4, 7 e 10)	100 / 100 / 99
Analista I - Equipamento II		Analista II - Equipamento II	
Médias (pH 4, 7 e 10)	4,008 / 7,008 / 9,889	Médias (pH 4, 7 e 10)	3,997 / 7,006 / 9,865
S_r / CV_r %	0,0088 / 0,11	S_r / CV_r %	0,0031 / 0,044
r_a (95%)	0,024	r_a (95%)	0,0084
Exatidão % (pH 4, 7 e 10)	100 / 100 / 99	Exatidão % (pH 4, 7 e 10)	100 / 100 / 99
Reprodutibilidade Intralaboratorial			
Variando Equipamento pelo Analista I		Variando Equipamento pelo Analista II	
Médias (pH 4, 7 e 10)	4,000 / 7,007 / 9,898	Médias (pH 4, 7 e 10)	3,991 / 7,008 / 9891
S_R / CV_R %	0,019 / 0,25	S_R / CV_R %	0,018 / 0,23
R_a (95%)	0,052	R_a (95%)	0,050
Variando Analista pelo Equipamento I		Variando Analista pelo Equipamento II	
Médias (pH 4, 7 e 10)	3,989 / 7,008 / 9,898	Médias (pH 4, 7 e 10)	4,002 / 7,007 / 9870
S_R / CV_R %	0,021 / 0,24	S_R / CV_R %	0,018 / 0,22
R_a (95%)	0,056	R_a (95%)	0,043

Tabela 36: Resultados de repetitividade do sistema do equipamento novo (I) do estudo de caso 4.5 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 913/2005, 2005)

Resultados			
Média	4,01 / 6,99 / 9,15	S_r	0,00067
Limite de Repetitividade (95%)	0,0018	CV_r %	0,0097

Tabela 37: Resultados de repetitividade do equipamento antigo (II) referentes à primeira validação do estudo de caso 4.5 (BIO-MANGUINHOS PROTOCOLO 913/2005, 2005)

Parâmetros (unidade de pH)	Resultados do Equipamento II					
	3,78	4,00	6,87	7,00	7,41	10,00
Média	3,758	4,003	6,820	6,980	7,375	9,888
Desvio Padrão	0,0098	0,0103	0,0041	0,0063	0,0123	0,0484
CV %	0,2616	0,2580	0,0599	0,0906	0,1661	0,4890
Repetitividade	0,0000	0,004	0,0000	0,002	0,004	0,025

4 CONCLUSÕES

A prática de validação é essencial para definir se os métodos desenvolvidos ou adaptados estão completamente adequados aos objetivos a que se destinam, a fim de se obter resultados confiáveis que possam ser satisfatoriamente interpretados, possibilitando o conhecimento das limitações e da confiabilidade nas medidas realizadas nas análises. O método pode ser considerado validado, mesmo que alguns parâmetros não se enquadrem nos limites estabelecidos na literatura, mas que sejam criteriosamente conhecidos e, portanto, adequados aos objetivos do laboratório. Conseqüentemente, a validação analítica, a estimativa de incerteza, o controle estatístico do método e a qualificação de equipamentos analíticos fazem parte dos sistemas de qualidade de laboratórios analíticos.

No primeiro estudo de caso, tendo como única variação equipamentos de diferentes marcas, identificou-se esse fator de alta relevância. No segundo estudo de caso, observou-se a importância do treinamento dos analistas e a correção dos erros absolutos dos instrumentos nas análises de rotina. O terceiro estudo de caso evidenciou, mais uma vez, a importância da verificação dos equipamentos, porque nem sempre os equipamentos utilizados são adequados para sensibilidade do método. O quarto estudo de caso exemplificou a aplicação da carta de controle e de estudos interlaboratoriais na validação de um método. O quinto e último estudo de caso confirmou a importância da avaliação dos equipamentos utilizados nas análises de rotina.

Os conceitos de validação de métodos continuam a evoluir. Assim, esse trabalho mostrou, através dos cinco estudos de caso, a importância da revalidação dos métodos antes de sua implantação no laboratório e da verificação da validação a cada vez que chegarem analistas e equipamentos novos no laboratório. Outro aspecto importante evidenciado foi que a validação analítica, com seus planos de ensaio diferenciados, deve unir o fator econômico, à qualidade e ao tempo. Ou seja, um bom planejamento com poucos ensaios, pouco tempo, englobando todos os parâmetros de avaliação é recomendável, principalmente, para ensaios com insumos biológicos e microbiológicos que são caros, raros e difíceis de existirem padrões e placebos.

5 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Desenvolvendo os estudos de caso, de acordo com os planos de ensaio, algumas ações podem ser tomadas para melhorar as futuras validações e revalidações, ou seja:

- Diminuição dos números de ensaios para validação;
- Aplicação dos gráficos de controle, efetuando a leitura de padrões certificados para verificação da estabilidade do sistema;
- A produção de padrões secundários; e
- Aplicação da análise de riscos dos métodos.

A diminuição do número de ensaios será sempre um objetivo a ser atingido em virtude do controle da qualificação e/ou calibração de equipamentos e/ou instrumentos e da rotatividade de analistas, fica difícil se a revalidação englobar grande número de ensaios.

Na aplicação de gráficos de controle por sistema de medição, com a utilização de padrões diminui a necessidade de calibração e/ou qualificação do instrumento e/ou equipamento. Ainda assim, esses dados podem ser aplicados nas revalidações porque são ricos em informações de precisão (reprodutibilidade intralaboratorial) e exatidão. O método sob controle estatístico não necessita ser revalidado, mesmo diante das alterações das condições de equipamento e analista.

A produção de padrões secundários para os ensaios de validação seria interessante porque, em muitos casos, os parâmetros não são revistos com integridade devido à indisponibilidade de padrão certificado. No estudo de caso III, método de dosagem, que necessita de um plano de ensaios complexos para avaliar os critérios de desempenho, o número de ensaios foi menor do que no estudo de caso II porque todos os ensaios foram realizados com padrão secundário. Realizando menos ensaios, mais rápida e mais econômica será a revalidação.

O estudo de análise de risco do método tem como objetivo avaliar o percentual de falhas que ele pode ter. A probabilidade de erro que o método possui de emitir um resultado errado. Para tanto, análises estatísticas como a verificação de distribuição de dados, a verificação de *outlier*, a análise de t Student, a elaboração de gráficos serão aplicadas a dados que pode ser retrospectivos. Contudo, a avaliação da conformidade do sistema com os gráficos de controle facilitará esse estudo. O conhecimento do risco do método aumenta o tempo necessário para revalidação de métodos que não sofreram nenhuma alteração significativa. Geralmente, as revalidações para métodos sem alterações significativas, acontecem a cada dois anos.

Avaliando a conformidade do sistema medição e com o conhecimento de risco do método, acredita-se que a necessidade das revalidações diminuirá porque as considerações das alterações tornarão menos significativas.

REFERÊNCIAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**, 20th ed. Washington, 1998.

ANVISA, RE no. 899: **Guia para validação de métodos analíticos bioanalíticos**. 2003. (www.anvisa.gov.br)

ANVISA. **Guia para qualidade em química analítica: uma assistência a acreditação**. 2004. (www.anvisa.gov.br)

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – NBR ISO 9000, **Sistemas de gestão da qualidade - Fundamentos e vocabulário**, 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – NBR ISO 9001, **Sistemas de gestão da qualidade - Requisitos**, 2000.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ISO/IEC 17025, **Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração**, 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – Appendix D: Interlaboratory collaborative study for method validation in the AOAC. **Official methods of analysis of AOAC international**. 2000.

BAHIA, O. Implantação de sistemas de qualidade em laboratórios de ensaios. **Analytica**, (3), 24-28. 2003.

BARROS, C. B. Validação de métodos analíticos. **FIOCRUZ / Bio-Manguinhos**. 2004.

BARROS, C. B. & HIRATA, Y. S. Princípios e práticas de validação de métodos analíticos. **Shaffer**. 2004.

BARROS, C. B.; HIRATA, Y. S. Estimativa de incerteza nas medições laboratoriais. **Shaffer**. 2004.

BARROS, C. B. & HIRATA, Y. S. Validação de métodos analíticos. **REMESP**. 2005.

BRITO, N. M.; AMARANTE, O. P. J.; POLESE, L., RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**. v. 13, 129-146. 2003.

BIO-MANGUINHOS – POP:104240.308. **Dosagem de adh no polissacarídeo ativado – método colorimétrico**. 2004.

BIO-MANGUINHOS – POP: 106040.574. **Determinação de fósforo**. 2004.

BIO-MANGUINHOS – POP: 104240.306. **Determinação colorimétrica do conteúdo de polissacarídeo na vacina.** 2004.

BIO-MANGUINHOS – POP: 106040.503. **Determinação de pH em vacinas.** 2004.

BIO-MANGUINHOS – POP: 101031.586. **Análise de condutividade, pH e toc nas amostras para validação de utilidades.** 2004.

BIO-MANGUINHOS – POP: 140240.312. **Regeneração das colunas zorbax gf-450 e tsk-gel 2500 pwxl e tsk gel 5000 e execução do teste de eficiência das colunas – hetp.** 2004.

BIO-MANGUINHOS – PROTOCOLO 150/2005. **Validação do controle da eliminação do adh no concentrado do polissacarídeo ativado.** 2005.

BIO-MANGUINHOS – PROTOCOLO 89/2005. **Validação da determinação do fósforo.** 2005.

BIO-MANGUINHOS – PROTOCOLO 971/2005. **Validação da determinação colorimétrica do conteúdo de polissacarídeo pelo método orcinol.** 2005.

BIO-MANGUINHOS – PROTOCOLO 2281/2004. **Validação retrospectiva do método analítico aplicando carta de controle - medição de pH.** 2005.

BIO-MANGUINHOS – PROTOCOLO 913/2005. **Revalidação do método de análise de determinação de pH - motivo: equipamento novo - potenciômetro metrohm.** 2005.

CODE OF FEDERAL REGULATION – **CFR title 21**, part 211.194 (a)

COUTO, P. Incerteza de medição na análise química. **INMETRO.** 2004.

DE ARAÚJO, J. C. F.; FILHO, C. A. S.; CARDOSO, G. L. B. X.; RODRIGUES, P. **Validação da metodologia analítica para suspensão oral de hidróxido de alumínio III. Controle de Contaminação.** 71, (7), 22-27. 2005.

EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics.** 1ed, 1998. (www.eurachem.ul.pt)

EURACHEM. **Guide quantifying uncertainty in analytical measurement .** 2 ed., 2000. (www.eurachem.ul.pt)

EWING's ANALITICAL INSTRUMENTATION HANDBOOK, 3^o ed., edited by **Jack Cazes.** 2005.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for industry analytical: chemistry, manufacturing, and controls documentation.** 2000. (www.fda.gov)

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION & INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. **Guidelines validation of chromatographic methods**. CDER, 2000. (www.fda.gov/cder/guidance)

FRASCH, C. E. & CHI-JEN; DRUSILLA, L.; Progressos em matéria de vacinas bacterianas pediátricas; **Infecções Respiratórias em Crianças, Seção II: Aspectos Etilógicos** - Capítulo 7, 129-133. 2000

GARFIELD, F.M. Quality assurance principles for analytical laboratories. **AOAC**. Arlington, 2000.

HIRATA, Y. S. Gráficos de controle para laboratórios de ensaios. **Biológico**, v. 64, n. 2, 183-185. 2002. (www.biologico.sp.gov.br/publicacoes/biologico)

HORWITZ, W. & CURRIE, L.A. IUPAC recommendation for defining and measuring detection and quantification limits. **Analysis Magazine**, 22 (5). 1994.

HORWITZ, W. **Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents**. **J. Assoc. Off. Anal. Chem**, 63, (6), 1344-1354. 1980.

HUBER, Ludwig. **Validation and qualification in analytical laboratories**. Interpharm Press. 1999.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION – Q2A. **Text validation of analytical procedures**. 1994. (www.ich.org)

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION – Q2B. **Validation of analytical procedures and method validation: methodology**. 1996. (www.ich.org)

INMETRO/ABNT. **Guia para a expressão da incerteza de medição**, 3ª Ed. Brasileira do “ISO Guide to the Expression of Uncertainty in Measurements”. 2003.

INMETRO DOQ-CGCRE-008. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. rev. 1. 2003.

IN VITRO DIAGNÓSTICA S/A CAT.: 10027. **Fósforo UV**. Rev. 04. 2005.

ISO 5725-1. **Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 1: General principles and definitions**. 1994.

ISO 5725-2. **Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 2: basic method for the determination of repeatability and reproductibility of a standard measurement method.** 1994.

ISO 5725-3. **Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 3: Intermediate measures of precision of a standard measurement method.** 1994.

ISO 5725-4. **Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 4: Basic methods for the determination of the trueness of a standard measurement method.** 1994.

ISO 5725-6. **Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 6: Use in practice of accuracy values.** 1994.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **Harmonized guidelines for internal quality control in analytical chemistry laboratories.** Pure & Appl. Chem. 67, (4), 649-666. 1995.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **Harmonized protocols for the adoption of standardized analytical methods and for the presentation of their performance characteristics.** Pure & Appl. Chem. 62, (1), 149-162. 1990.

KATEMAN, G. **Quality control in analytical chemistry.** John & Sons, Inc. v.60, 70-133. 1981.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise.** RiMa, 62p. 2004.

MILLER, J. C & MILLER, J. N. **Estadística para química analítica.** Addison-Wesley Iberoamericana, 211p. 1993

MONTGOMERY, D. C. **Introdução ao Controle Estatístico da Qualidade**, 4^a ed., 2004, LTC, 532 p.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos.** Editora da Unicamp. 2002.

NICOLÓSI, M. **Validação de métodos analíticos.** Controle de Contaminação, 34, (6), 12-21. 2003.

OLIVEIRA, F. **A análise do sistema de medição (msa)**. Metrologia & Instrumentação, 66-69. 2003.

RANGEL, C. **Estatística para validação de ensaios**. SBM. 2004.

RIBANI, M; BOTTOLI, C. B.; COLLINS, C. H; JARDIM, I. C. S.; MELO, L. F. C.; Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quím. Nova**, v. 27, (5), 23p. 2004.

RIBEIRO, P. R. S.; **Programa de desenvolvimento de métodos analíticos**. CEP. 2005.

SILVA, A. & CARVALHO, M. Como iniciar validação de métodos. **Metrologia & Instrumentação**, v. 44. 2004. (www.banasmetrologia.com.br)

SKOOG, A. D. **Fundamentals of analytical chemistry**. 2004.

SKOOG, D. A.. HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. Bookman Companhia Editora , 5^o ed. 2002.

SOARES, L. M. V. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60, (1), 79-84. 2001.

SOTO, C.; CUELLO, M.; CABRERA, O.; SIERRA, G. Validación de uma técnica colorimétrica para la determinación de carbohidratos. **Vaccimonitor**, 11, (3). 2002.

SOUZA, C. L. **Cálculo de incerteza da medição na calibração de ensaios**. RioMetrologia. 2004

TAYLOR, J. K. **Quality assurance of chemical measurements**. Lewis Publishers. 1987.

TRIOLA, M. **Introdução à estatística**. LTC, 7^o ed. 1999.

ULRICH, J. C. & SARKIS, J. E. S.; Validação de metodologias em laboratórios analíticos. **Metrologia**. 2000.

UNITED STATE PHARMACOPEIA – USP 27 / NF 22. **Validation of compendial methods**.1225, 2003.

VIM. **Vocabulário internacional de termos fundamentais e gerais de metrologia.** 2000.

WESTGARD, J.O.; BARRY, P.L.; HUNT, M.R.; GROTH T. **A multi-rule Shewhart chart quality control in clinical chemistry.** Clin Chem, v.27: p. 493-501. 1981. (www.westgard.com)

WHO. **Guide to good manufacturing practice (GMP) requirements.** Part 2: Validation. 1997.

WHO. **Expert committee on biological standardization.** v. 46. 1998.

ANEXOS

Trabalhos apresentados no 13^o. Encontro Nacional de Química Analítica e 1^o. Congresso Ibero-Americano de Química Analítica na Universidade Federal Fluminense no período de 08 a 12 de setembro de 2005, Niterói, RJ.

- 1) Validação e estimativa de incerteza do método de determinação de fósforo por colorimetria
- 2) Revalidação do método analítico de determinação de pH associado à troca de equipamento

Trabalhos apresentados no ENQUALAB 2006 - Congresso e Feira da Qualidade em Metrologia no período de 30 de maio a 01 de junho de 2006, no Centro de Convenções Frei Caneca, São Paulo, SP.

- 1) Estimativa da incerteza e validação da determinação colorimétrica do conteúdo de polissacarídeo pelo método do orcinol.
- 2) Validação do controle da eliminação do ADH no concentrado do polissacarídeo ativado durante as diafiltrações usando o método de filtração em gel
- 3) Aplicação da carta de controle na validação retrospectiva e estimativa da incerteza na medida do pH

VALIDAÇÃO E ESTIMATIVA DE INCERTEZA DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE FÓSFORO POR COLORIMETRIA,

Aderval S. Luna⁽¹⁾, Cristiane A. Henriques⁽¹⁾ e Alaíde Aline Xavier Leal^(1,2)

(alaide@bio.fiocruz.br)

¹*Setor de Validação Analítica, Laboratório de Metrologia e Validação, Bio-Manguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil*

²*Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 20559-900, Brasil*

Os métodos oficialmente publicados são considerados validados, no entanto, a verificação da adequação do mesmo no laboratório em questão é pertinente, a partir do momento em que é necessário o conhecimento das variações do ensaio: equipamento, fornecedor, analista, micropipeta, padrão e outras. A validação analítica reúne todas essas informações para estimativa da incerteza do método. A incerteza de medição de um ensaio químico caracteriza a faixa de valores, dentro da qual o valor real deve se situar, com um nível de confiança especificado. Na obtenção da incerteza relativa de um método, é essencial assegurar que a estimativa considere explicitamente todas as possíveis fontes de incerteza, avaliando-se os componentes significativos, já que nem todas as fontes interferem diretamente no resultado final. A incerteza pode ser expressa como um desvio padrão ou um múltiplo do mesmo. Na prática, a incerteza demonstra claramente as principais fontes de variação que podem ser reduzidas.

Este trabalho apresenta os resultados da validação do método de determinação colorimétrica de fósforo nos polissacarídeos de *Neisseria meningitidis* tipo A e de *Haemophilus influenzae* tipo B e as suas variações para a estimativa de incerteza. A quantidade de fósforo presente no polissacarídeo, medida por espectrofotometria de absorção molecular a 820 nm, não deve ser menor que 8% m/m no tipo A e deve estar entre 6,8 e 9,0% m/m no segundo tipo. Nesta validação analítica foram definidos os seguintes testes específicos para serem realizados: especificidade, linearidade, repetitividade, reprodutibilidade intralaboratorial, limite de quantificação e exatidão. A especificidade foi testada com solução branco, solução padrão e amostras, tendo sido evidenciada de forma satisfatória. A linearidade foi obtida com os resultados da curva de calibração, em triplicata, sendo adotado como critério de avaliação um coeficiente de correlação maior que 0,99 ao mesmo tempo em que o intervalo de confiança do coeficiente linear, contendo o zero, serviu para demonstrar a falta de evidência de erro sistemático. Nas curvas de calibração obtidas, os requisitos foram atendidos. A repetitividade do método foi investigada, por um mesmo analista, em três lotes distintos em dias diferentes. Adotou-se como critério de aceitação da repetitividade, um coeficiente de variação de, no máximo, 2%. Os resultados obtidos indicaram um coeficiente de variação entre 0,81 e 1,22%. No ensaio de reprodutibilidade intralaboratorial, foram utilizados cinco analistas na análise de quatro amostras, com preparação independente, sendo considerado aceitável um coeficiente de variação máximo de 4%. A avaliação da equivalência por ANOVA mostrou que o fator analista é importante na execução do ensaio, apesar dos analistas apresentarem o coeficiente de variação de repetitividade pequeno (0,19 a 0,46%). O limite de quantificação ($10 \cdot s_{\text{branco}}/m$) para esta metodologia indicou um valor igual a 0,50% m/m, onde s_{branco} é o desvio padrão da solução branco ($n = 10$) e m é o coeficiente angular da curva de calibração. A exatidão foi avaliada utilizando-se cinco amostras de polissacarídeos com concentrações conhecidas abrangendo toda a faixa de de trabalho da curva de calibração. Adotou-se como critério de avaliação, uma recuperação entre 97 e 103% para cada concentração testada. A análise da curva da concentração nominal versus a concentração observada indicou um coeficiente angular igual a 1,0000 com uma incerteza, neste parâmetro, de $\pm 0,0458$ a $\pm 0,0596$ para as três curvas obtidas. A recuperação do analito mostrou um intervalo de 100,0 a 100,3%, o que demonstra a exatidão da metodologia. A estimativa da incerteza da determinação de fósforo abrangeu as incertezas associadas com a reprodutibilidade do método. Neste caso adotou-se o maior desvio padrão do analista, o ajuste da curva de calibração, a preparação da amostra e padrões, o espectrofotômetro e a própria resolução do instrumento. Obteve-se uma incerteza expandida para a determinação de fósforo igual a 0,40%.

[1] Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos – INMETRO – DOQ-CGRE-008

[2] Guia EURACHEM / CITAC – Determinando a Incerteza na Medição Analítica, segunda edição.

[3] IN VITRO DIAGNÓSTICA S/A CAT.: 10027. *Fósforo UV*. Rev. 04. 2005

REVALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DE DETERMINAÇÃO DE pH ASSOCIADO À TROCA DE EQUIPAMENTO

Aderval S. Luna⁽¹⁾, Cristiane A. Henriques⁽¹⁾ e Alaíde Aline Xavier Leal^(1,2)
(alaide@bio.fiocruz.br)

¹*Setor de Validação Analítica, Laboratório de Metrologia e Validação, Bio-Manguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 20000-000, Brasil*

²*Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 20559-900, Brasil*

Este trabalho apresenta os resultados da revalidação do método analítico de determinação do pH em virtude da aquisição de um novo instrumento de medida. O objetivo deste foi verificar se os critérios de validação estabelecidos para um antigo equipamento podiam ser empregados no novo instrumento.

A determinação do pH foi realizada com calibração diária dos equipamentos, os quais foram mantidos em temperatura ambiente de 20 a 25°C. Foi realizado um ensaio para verificar a equivalência dos resultados fornecidos pelos equipamentos (antigo e novo), sendo as medidas feitas por dois analistas. Foram preparadas três amostras diferentes (pH = 4; pH = 7 e pH = 10), com seis alíquotas de cada solução sendo usadas na medida do pH nos dois instrumentos. Procedeu-se a análise da variância (ANOVA), usando o programa Statistica versão 6.0 da Statsoft, para verificar a importância estatística dos fatores analista e equipamento na medida do pH. Os resultados da ANOVA estão mostrados na tabela 1.

Tabela 1 – Resultados da análise da variância

ANOVA Results: pH (Spreadsheet1)							
Source	Effect (F/R)	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p
{1}Analista	Fixed	1	0,000450	68	6,138144	0,000073	0,993193
{2}Equipamento	Fixed	1	0,003556	68	6,138144	0,000579	0,980868
1*2	Fixed	1	0,000002	68	6,138144	0,000000	0,999546

De acordo com os resultados relacionados à equivalência entre os equipamentos, pode-se afirmar que não existe diferença significativa entre os mesmos em virtude dos valores de *F* (inferior ao valor crítico) e *p* (nível de significância, indica um valor elevado de α) para rejeitar a hipótese nula. Portanto, não existe evidência para a rejeição da hipótese nula. O mesmo pode ser afirmado para a equivalência entre os analistas e a interação entre os fatores: analista e equipamento.

A repetitividade do sistema foi obtida com o equipamento novo, empregando-se três amostras diferentes (pH = 4; pH = 7 e pH = 10), onde uma alíquota de cada solução foi escolhida para a medição do pH. Neste caso, foram feitas dez medidas do pH para cada alíquota. O critério de aceitação da repetitividade usado foi o coeficiente de variação deste ensaio ser inferior ou igual aquele obtido na validação do método (CV = 0,97%). Os resultados obtidos para o coeficiente de variação oscilaram 0,03 a 0,11%, portanto inferiores ao do método validado. O Laboratório participou de um exercício de proficiência para medidas de pH. Foram realizadas quatro rodadas de ensaios, sendo analisadas dois tipos amostras de cada vez com sete medidas de pH para cada solução. O valor real para a medida do pH foi obtido a partir do certificado de análise da solução padrão utilizada. O valor de referência, tomado como valor real, possui rastreabilidade a materiais de referência do National Institute of Standards and Technology (NIST). A compatibilidade entre os resultados de medição foi avaliada pelo índice *Z score*, ou seja o desempenho individual. A variância intralaboratorial foi determinada com o objetivo de medir o tamanho da variação entre as medidas realizadas em cada laboratório, fornecendo uma indicação da repetitividade.

Tabela 2 – Resultados do ensaio de proficiência.

Ensaio	Faixa Ácida		Faixa Neutra		Faixa Alcalina	
	<i>Z score</i>	Variância	<i>Z score</i>	Variância	<i>Z score</i>	Variância
1	Satisfatório	0,00E+00	N/A	N/A	Satisfatório	1,33E-04
2	Satisfatório	5,71E-05	N/A	N/A	Satisfatório	4,89E-05
3	Satisfatório	2,20E-05	N/A	N/A	Satisfatório	4,18E-05
4	Satisfatório	1,81E-05	Satisfatório	2,25E-05	N/A	N/A

[1] Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos – INMETRO – DOQ-CGRE-008

[2] Guia EURACHEM / CITAC – Determinando a Incerteza na Medição Analítica, segunda edição.

ENQUALAB 2006 - Congresso e Feira da Qualidade em Metrologia

30 de maio a 01 de junho de 2006 - Centro de Convenções Frei Caneca – São Paulo

Estimativa da incerteza e validação da determinação colorimétrica do conteúdo de polissacarídeo pelo método do orcinol

Alaíde Aline Xavier Leal^(1,2), Cristiane A. Henriques⁽²⁾ e Aderval S. Luna⁽²⁾.

1 – FIOCRUZ, Bio-Manguinhos, Laboratório de Metrologia, Setor de Validação Analítica, Avenida Brasil, 4365 - Rio de Janeiro, Brasil, 21040-900 (alaide@bio.fiocruz.br). Tel: 0XX21-3382-3392.

2 – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Rua São Francisco Xavier, 524 – Maracanã - Rio de Janeiro, Brasil, 20559-900 (cah@uerj.br; asluna@uerj.br). Tel: 0XX21-2587-7322.

Palavras-chave: validação, incerteza, colorimetria, orcinol, polissacarídeo.

Este trabalho apresenta a validação da determinação colorimétrica do conteúdo de polissacarídeo pelo método do orcinol, assim como a estimativa da incerteza identificando as suas fontes e propondo a minimização destas. Os parâmetros verificados⁽¹⁾ foram: especificidade, linearidade, exatidão, repetitividade do método, reprodutibilidade intralaboratorial e a equivalência. Os parâmetros de avaliação foram obtidos através de três análises independentes por dois analistas com seis réplicas da mesma amostra para cada análise. Adicionalmente, foi estimada a incerteza do método. A especificidade foi constatada pela medida da solução branco ser inferior a 0,050 unidades de absorvância em 669 nm, enquanto que a linearidade foi obtida com o emprego de soluções padrão de D-ribose com: 0,0; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 e 25,0 mg l⁻¹ no mesmo comprimento de onda. A curva de calibração (n = 3) mostrou um coeficiente de correlação igual a 0,9998 e um intervalo de confiança para o coeficiente linear [-0,018; 0,013], o que não evidencia a presença de erro sistemático. A exatidão foi medida com uma solução padrão do polissacarídeo PSTH 758 mg l⁻¹, encontrando-se uma recuperação média igual a 92%, ao mesmo tempo a exatidão para os pontos da curva: concentração de D-ribose teórica versus D-ribose experimental foi igual a 100%. A repetitividade do método obtida pela medida do padrão do polissacarídeo indicou um coeficiente de variação igual a 1,0% para um máximo aceitável de 3,0%. A avaliação da reprodutibilidade intralaboratorial seguiu a regra da AOAC 2000⁽²⁾, quanto ao número de análises [k(n-a) >15]. Para a avaliação da reprodutibilidade variando o dia, foram levadas em consideração as análises de um mesmo analista. O coeficiente de variação médio foi igual a 1,4% para um máximo permissível de 6%. A equivalência entre os analistas foi avaliada por ANOVA, enquanto que a equivalência entre os dias foi avaliada pelos testes estatísticos *F* e *t*. As incertezas do preparo da amostra e do padrão de D-ribose foram estimadas separadamente, o que incorporou as contribuições dos balões, da balança, das micropipetas e da pureza do padrão. A incerteza do espectrofotômetro Genesys Spectronic 20 foi a que mais contribuiu para a incerteza total do método, portanto, se o laboratório tiver a necessidade de usar outro equipamento, uma nova verificação da repetitividade e reprodutibilidade deve ser feita. A incerteza padrão expandida (95%) para um k = 2 corresponde a 21 mg l⁻¹, o que equivale a 3% do valor teórico do PSTH.

Referências bibliográficas

1 – USP 27

2 – AOAC 2000.

ENQUALAB 2006 - Congresso e Feira da Qualidade em Metrologia
30 de maio a 01 de junho de 2006 - Centro de Convenções Frei Caneca – São Paulo
**Validação do controle da eliminação do ADH no concentrado do polissacarídeo
ativado durante as diafiltrações usando o método de filtração em gel**

Alaíde Aline Xavier Leal^(1,2), Cristiane A. Henriques⁽²⁾ e Aderval S. Luna⁽²⁾.

1 – FIOCRUZ, Bio-Manguinhos, Laboratório de Metrologia, Setor de Validação Analítica, Avenida Brasil, 4365 - Rio de Janeiro, Brasil, 21040-900 (alaide@bio.fiocruz.br). Tel: 0XX21-3382-3392.

2 – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Rua São Francisco Xavier, 524 – Maracanã - Rio de Janeiro, Brasil, 20559-900 (cah@uerj.br; asluna@uerj.br). Tel: 0XX21-2587-7322.

Palavras-chave: validação, incerteza, ADH, filtração em gel, polissacarídeo.

Este trabalho apresenta a validação do controle da eliminação do ADH (dihidrazida do ácido adípico) no concentrado do polissacarídeo ativado. O método empregado foi desenvolvido e validado pela GSK⁽¹⁾ e implantado em Bio-Manguinhos pelo Convênio de Repasse Tecnológico de Produção da Vacina Combinada DTP-Hib. Os ensaios realizados foram para demonstrar que o laboratório opera de maneira correta, dentro das condições existentes nas suas instalações. As condições de análises para o controle de ADH por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram as seguintes: eluente (solução de NaCl 0,2 mol/l); pré-coluna: Tosohaas PW_{XL}; coluna: Tosohaas TSK gel 2500 PW_{XL}; comprimento da coluna: 300 mm; diâmetro da coluna: 7,8 mm; vazão: 1,0 ml/min; detecção: UV (comprimento de onda: 206 nm); volume de injeção: 30 µl. A avaliação da performance do método foi realizada através da determinação do número de pratos teóricos (N) da coluna cromatográfica e dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ). Os parâmetros de avaliação foram obtidos através de duas análises de polissacarídeos independentes (RD 20 e RD 50) com amostras puras e enriquecidas com uma solução de ADH 10 mg l⁻¹ por dois analistas com três réplicas da mesma amostra para cada análise usando dois instrumentos diferentes. O limite de detecção foi obtido com o emprego de soluções padrão de ADH com: 0,00; 0,25; 0,50; 1,00; 1,50 e 2,00 mg l⁻¹. Para o sistema cromatográfico Pharmacia – GE (Akta Purifier) foram encontrados: N = 2,74 x 10⁵, LD = 0,68 mg l⁻¹ e LQ = 2,05 mg l⁻¹ enquanto que para o sistema cromatográfico Waters (Alliance) foram encontrados: N = 4,04 x 10⁵, LD = 0,51 mg l⁻¹ e LQ = 1,53 mg l⁻¹. A especificidade do teste indicou que o sistema cromatográfico Waters foi eficiente no controle da eliminação de ADH para as duas amostras, enquanto que o sistema cromatográfico Pharmacia – GE foi eficiente somente para a amostra RD 50. A repetitividade do teste foi avaliada pelo tempo de retenção do analito, com as amostras puras e enriquecidas, e indicou um coeficiente de variação médio igual a 0,16% para os dois sistemas cromatográficos. A variação da reprodutibilidade, avaliada em termos do tempo de retenção do analito, para os analistas indicou um coeficiente de variação igual a 0,13% (Pharmacia – GE) e 0,21% (Waters), respectivamente, enquanto que para os instrumentos o coeficiente de variação foi igual a 0,13%. Foi demonstrada a equivalência entre os analistas para os dois sistemas cromatográficos utilizados usando os testes estatísticos *F* e *t*.

Referências bibliográficas

1 – GSK.

ENQUALAB 2006 - Congresso e Feira da Qualidade em Metrologia
30 de maio a 01 de junho de 2006 - Centro de Convenções Frei Caneca – São Paulo
Aplicação da carta de controle na validação retrospectiva e estimativa da incerteza na medida do pH

Alaíde Aline Xavier Leal^(1,2), Cristiane A. Henriques⁽²⁾ e Aderval S. Luna⁽²⁾.

1 – FIOCRUZ, Bio-Manguinhos, Laboratório de Metrologia, Setor de Validação Analítica, Avenida Brasil, 4365 - Rio de Janeiro, Brasil, 21040-900 (alaide@bio.fiocruz.br). Tel: 0XX21-3382-3392.

2 – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Rua São Francisco Xavier, 524 – Maracanã - Rio de Janeiro, Brasil, 20559-900 (cah@uerj.br; asluna@uerj.br) . Tel: 0XX21-2587-7322.

Palavras-chave: validação, incerteza, ADH, filtração em gel, polissacarídeo.

O objetivo deste trabalho foi assegurar que a medida de pH pelo Laboratório Físico-Químico da Fiocruz está sendo realizada de forma adequada. Neste contexto, a aplicação da carta de controle tornou-se uma ferramenta estatística indispensável nesta avaliação. As medidas de pH foram feitas utilizando-se um titulador volumétrico Radiometer (VIT90) com eletrodo do mesmo fabricante e um medidor de pH Quimis com eletrodo Mettler (Toledo). Foram realizadas trinta medidas de pH de cada amostra (solução tampão pH = 7 e água WFI), em dias diferentes nos dois instrumentos e por analistas diferentes. A carta de controle das médias foi elaborada para conter: 1 – linha central = média das medições; 2 – limite superior de controle (LSC) = média das medições acrescida do produto da média das amplitudes pela constante A_3 ; 3 - limite inferior de controle (LIC) = média das medições diminuída do produto da média das amplitudes pela constante A_3 ; 4 – número de grupos (k); 5 – número de observações dentro do grupo (n). Para a solução tampão pH = 7, a carta de controle da média indicou um valor igual a 7,0. Os valores de LIC e LSC encontrados foram: 6,985 e 7,022 respectivamente para k = 30 e n = 1. O valor k = 21 ficou fora do limite especificado. De acordo com a distribuição (*t*) de *Student*, a probabilidade das medições de pH saírem dos limites de controle neste laboratório, para este tipo de amostra, é de 0,028%. Para a amostra de água WFI, a carta de controle da média indicou um valor igual a 5,9. Os valores de LIC e LSC encontrados foram: 5,7 e 6,0 respectivamente para k = 30 e n = 1. Nenhum valor ficou fora do limite especificado. De acordo com a distribuição de *Student*, a probabilidade das medições de pH saírem dos limites de controle neste laboratório, para este tipo de amostra, é de 0,030%. As cartas de controle foram elaboradas usando os pacotes computacionais Microsoft Excel versão 7.0 e Statística versão 6.0. A incerteza da medição do pH (95%; k = 1,96) é de 0,039 unidades de pH para amostra de vacina contra febre amarela 05 doses, de 0,041 para amostra de água WFI e de 0,037 para amostra da solução tampão pH = 7, portanto as amostras pouco influenciaram na estimativa da incerteza no resultado final.

Referências bibliográficas

- 1 – Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A., Princípios de Análise Instrumental, 5ª. edição, Bookman Companhia Editora, São Paulo, 2002.
- 2 – Neto, B. B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E., Como Fazer Experimentos, Editora da Unicamp, Campinas, 2002.