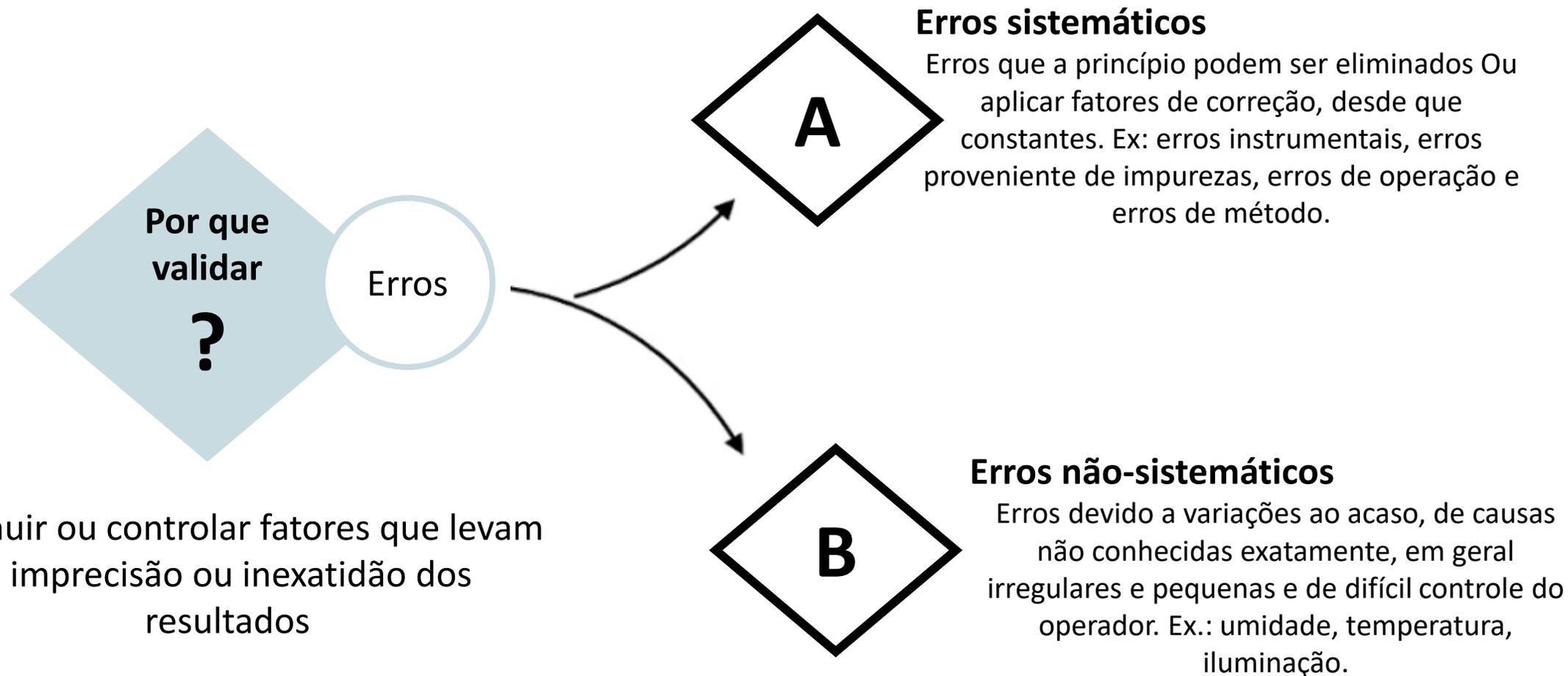




VALIDAÇÃO ANALÍTICA

LEANDRO OKA-DUARTE

POR QUE VALIDAR?



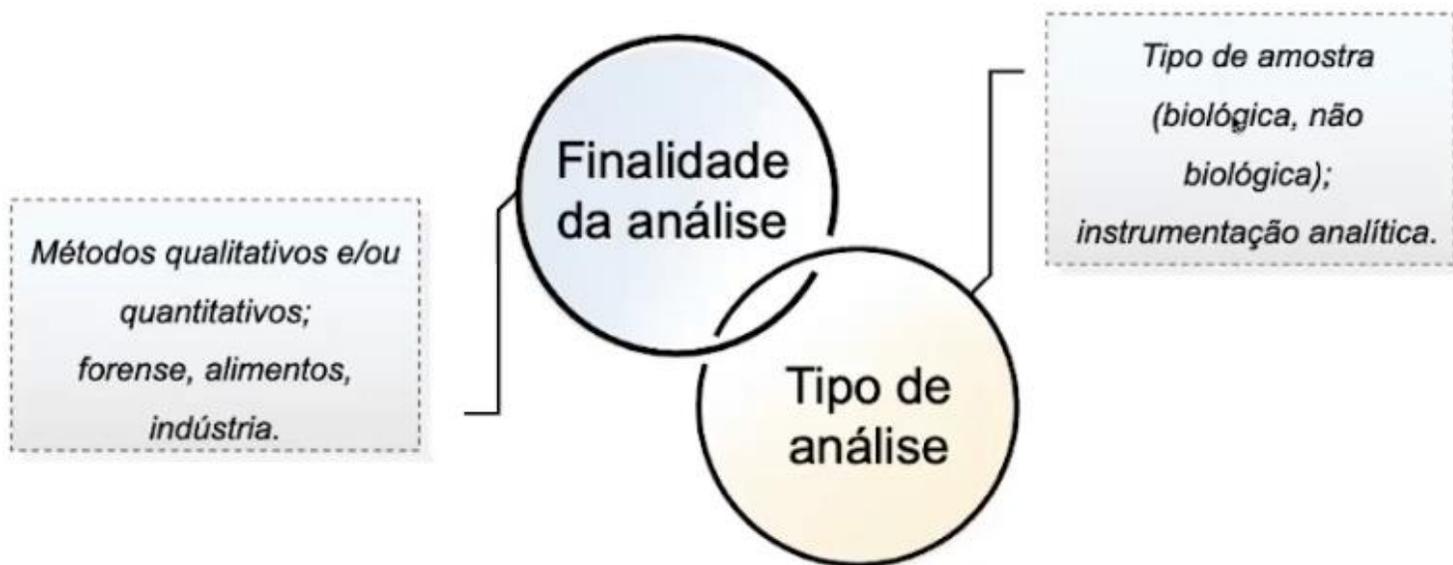
RESUMO

“Avaliação sistemática de um método por meio de **ensaios experimentais** de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu **uso pretendido** são atendidos”

Resolução RDC nº 166/2017

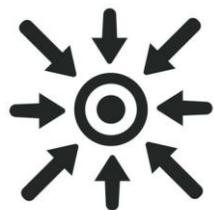


ESCOLHA DO GUIA

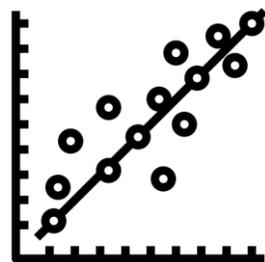


No final, muito dos parâmetros de validação são semelhantes

PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO



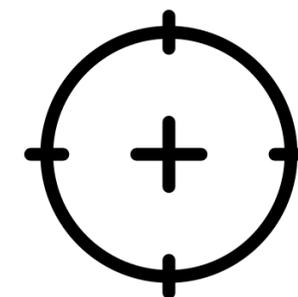
SELETIVIDADE



LINEARIDADE



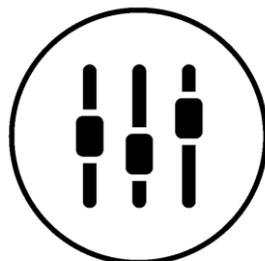
EXATIDÃO



PRECISÃO



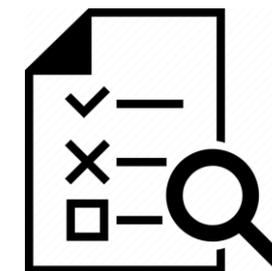
EFEITO MATRIZ



LIMIARES ANALÍTICOS



ROBUSTEZ



CONFORMIDADE



LINEARIDADE:

- CURVA ANALÍTICA -

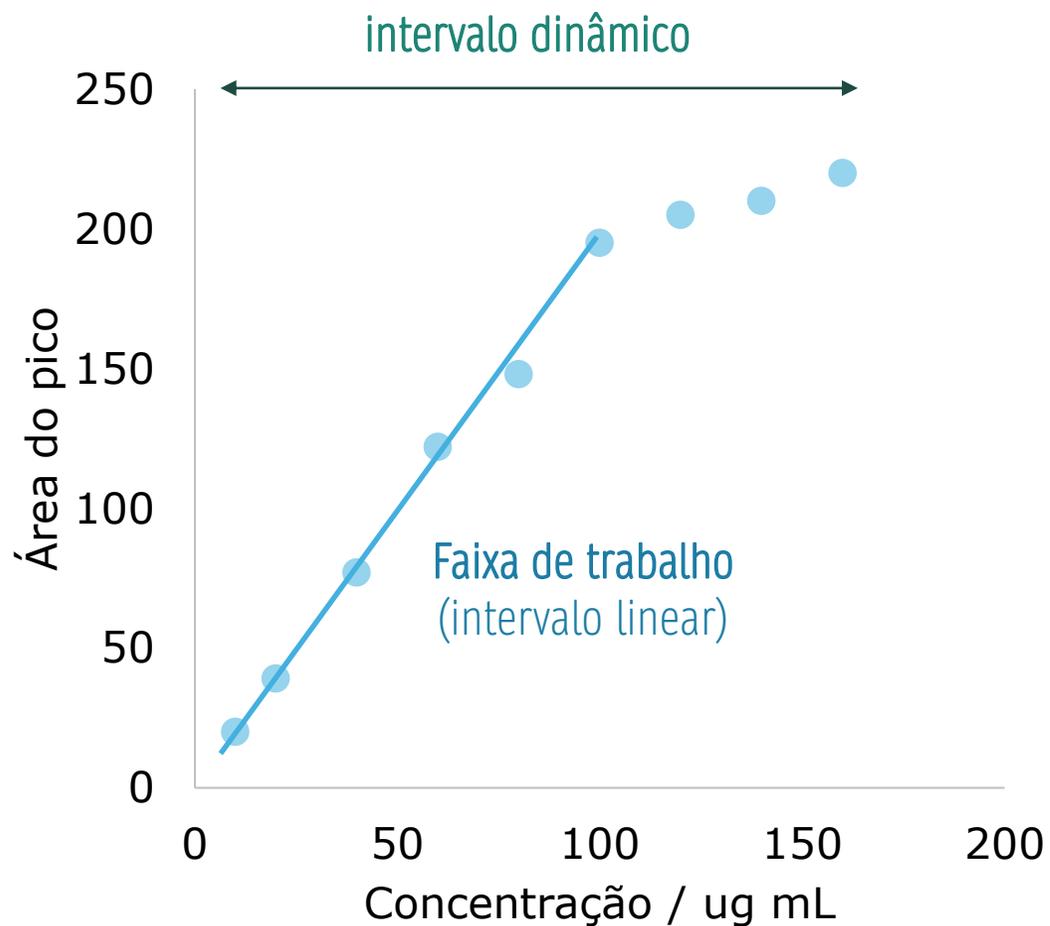


LINEARIDADE

Linearidade é a capacidade de o procedimento produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

Esse intervalo, ou **faixa de trabalho** da curva, contempla a faixa de concentração em que a linearidade, precisão e exatidão foram atingidas, definindo-se assim, a curva analítica correspondente.

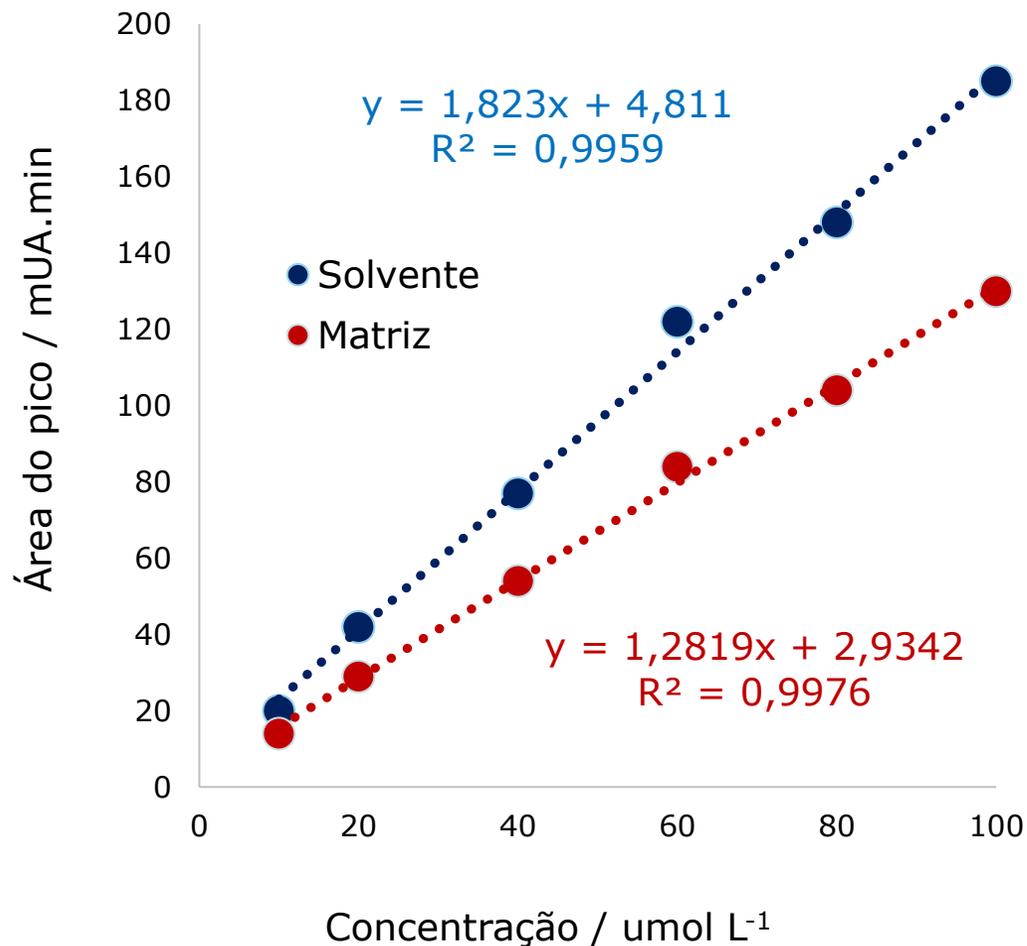
CURVA ANALÍTICA



Observações importantes:

1. Não incluir amostras branco na curva (se trata do ruído na linha-base do instrumento);
2. O menor ponto da curva, na prática, costuma ser o limite de quantificação (LIQ).
3. Deve-se construir a curva na **mesma matriz** proposta para o estudo!

CURVA ANALÍTICA



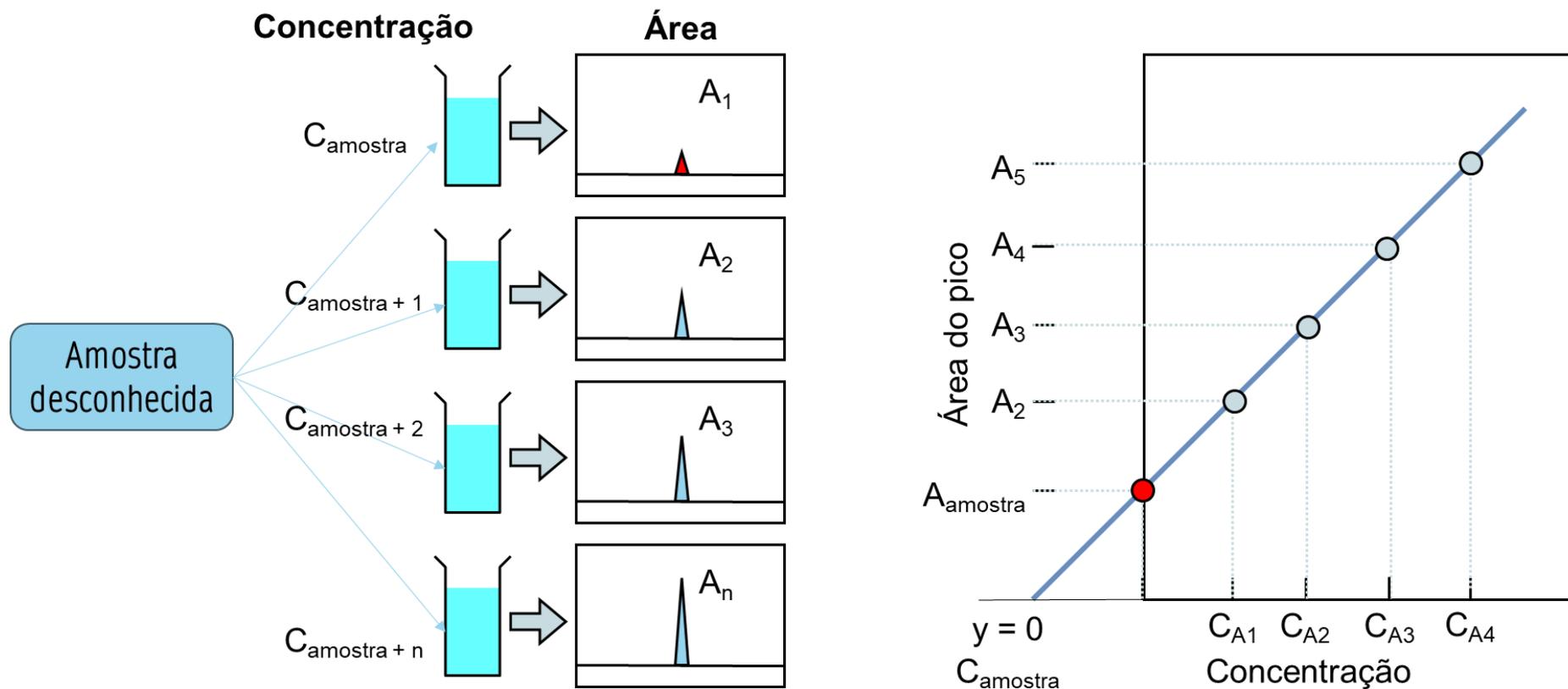
Observações importantes:

1. Não incluir amostras branco na curva (se trata do ruído na linha-base do instrumento);
2. O menor ponto da curva, na prática, costuma ser o limite de quantificação (LIQ).
3. Deve-se construir a curva na **mesma matriz** proposta para o estudo!

COMO QUANTIFICAR?

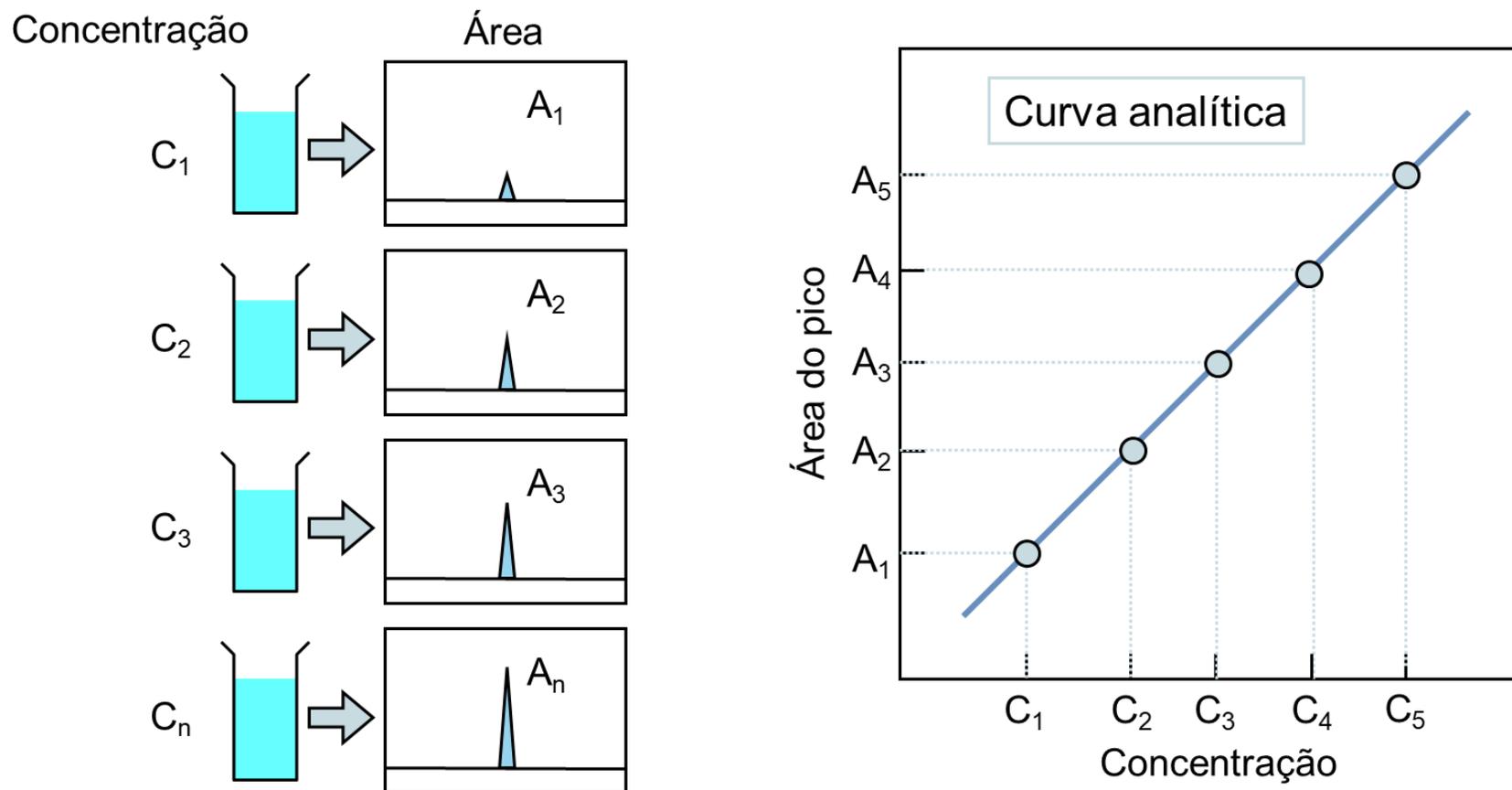
- MÉTODOS DE PADRONIZAÇÃO -

ADIÇÃO DE PADRÃO



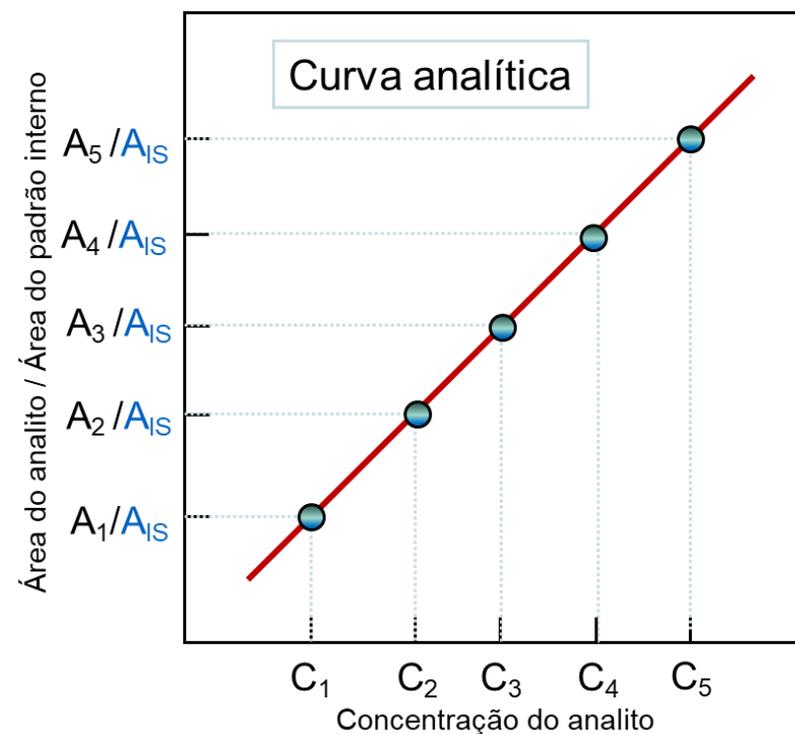
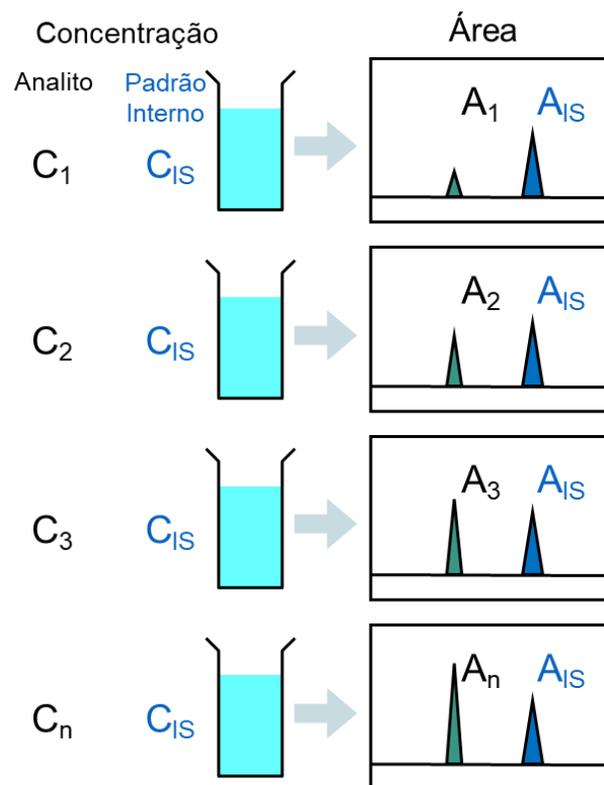
Obs.: Usado quando for difícil ou impossível fazer uma cópia da matriz da amostra.

PADRONIZAÇÃO EXTERNA



Obs.: Simples e efetivo, mas pode sofrer variações que impactem negativamente a curva

PADRONIZAÇÃO INTERNA



Obs.: Indispensável em métodos bioanalíticos para quantificação de substâncias em amostras “complexas”

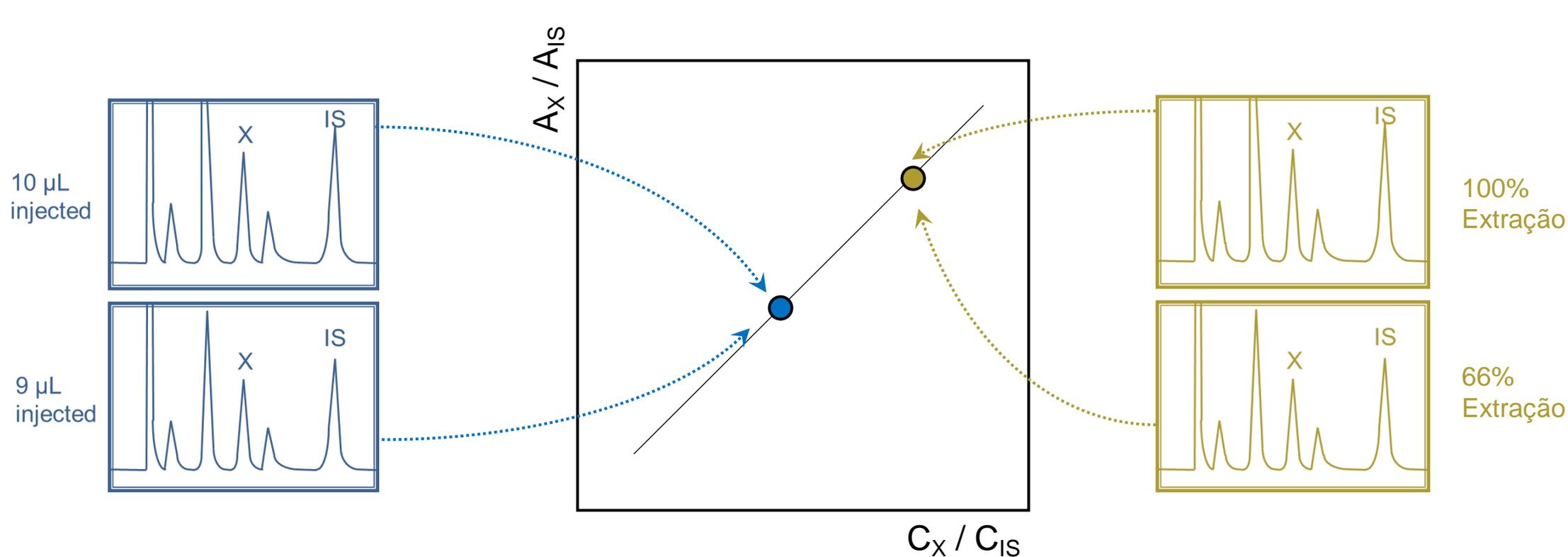
PADRONIZAÇÃO INTERNA

Como escolher um padrão interno?

- Deve possuir propriedades químicas similares ao analito;
- Não deve estar presente na amostra a ser analisada;
- Não deve interferir na análise química (sinal, tempo de retenção, etc)

VANTAGENS - PADRONIZAÇÃO INTERNA

- NÃO é afetado por inconsistências do volume de injeção ou recuperação
- DIMINUI diferença dos erros aleatórios e sistemáticos entre amostras e padrões



COMO AVALIAR A LINEARIDADE?

DE ACORDO COM A **ANVISA/MAPA**

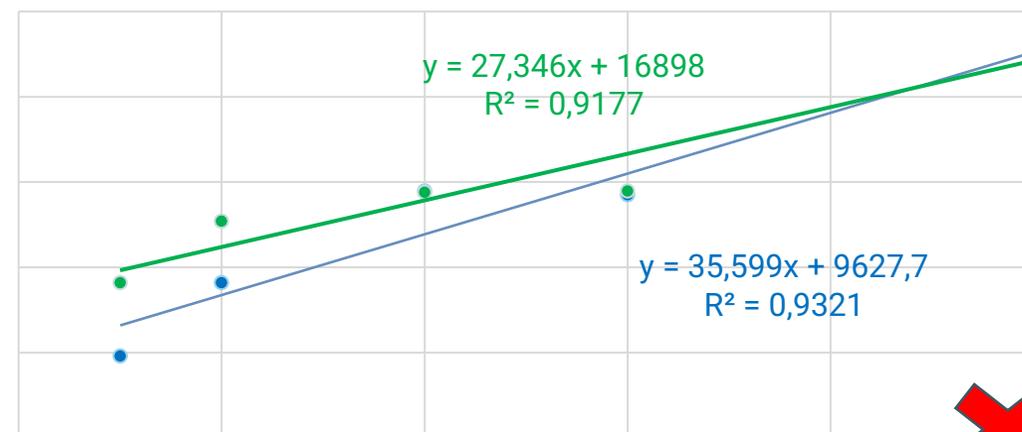
LINEARIDADE

PARÂMETRO	ANVISA / ICH 2012 / 2023	MAPA / ANVISA 2015 / 2017
Proposta	Quantificar substâncias em amostras biológicas	Quantificar substâncias em insumos farmacêuticos, medicamentos e afins
Níveis de concentração / réplica	6 / triplicata = total de 18 pontos, usando padrão interno	5 / triplicata = total de 15 pontos
O que avaliar por inspeção visual?	-	Curva analítica e distribuição dos resíduos
O que avaliar matematicamente?	Equação da reta, precisão ($DPR \leq 15\%$) e exatidão ($EPR \pm 15\%$)	Equação da reta, coeficiente de correlação ($r \geq 0,99$), além de exatidão ($EPR \pm 20\%$) dos pontos

ORGANIZANDO OS DADOS

Concentração	Área Analito	Área PI	Razão
100,0	9596,00	7885,00	1,22
100,0	18207,00	14684,00	1,24
200,0	18217,00	8227,00	2,21
200,0	25417,00	11213,00	2,27
400,0	28950,00	7987,00	3,62
400,0	28810,00	7603,00	3,79
600,0	28505,00	5085,00	5,61
600,0	28950,00	5102,00	5,67
1000,0	45999,00	4981,00	9,23
1000,0	44748,00	4996,00	8,96

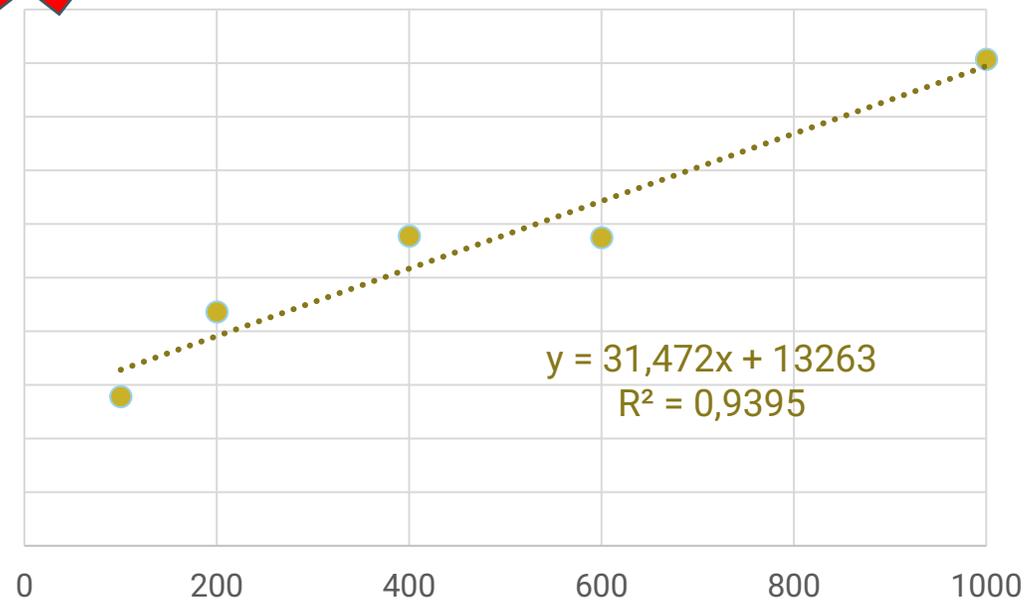
- Colocar os valores de concentração e resposta analítica (área do pico) em colunas, como no exemplo. Todos os valores devem ser plotados em um único gráfico para o ajuste linear, ou seja, **haverá somente UMA equação de reta.**



ORGANIZANDO OS DADOS

2. Não plotar a curva analítica com os valores médios (média) das replicatas!

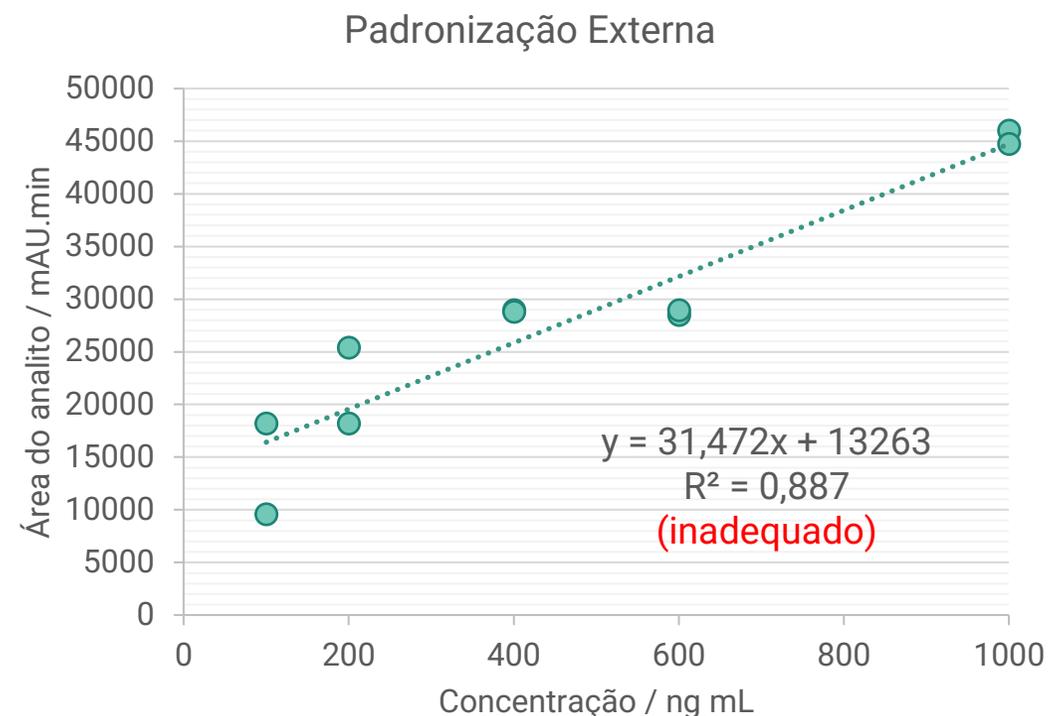
Concentração	Área Analito	Área PI	Razão
100,0	9596,00	7885,00	1,22
100,0	18207,00	14684,00	1,24
200,0	18217,00	8227,00	2,21
200,0	25417,00	11213,00	2,27
400,0	28950,00	7987,00	3,62
400,0	28810,00	7603,00	3,79
600,0	28505,00	5085,00	5,61
600,0	28950,00	5102,00	5,67
1000,0	45999,00	4981,00	9,23
1000,0	44748,00	4996,00	8,96



CONSTRUINDO UMA CURVA

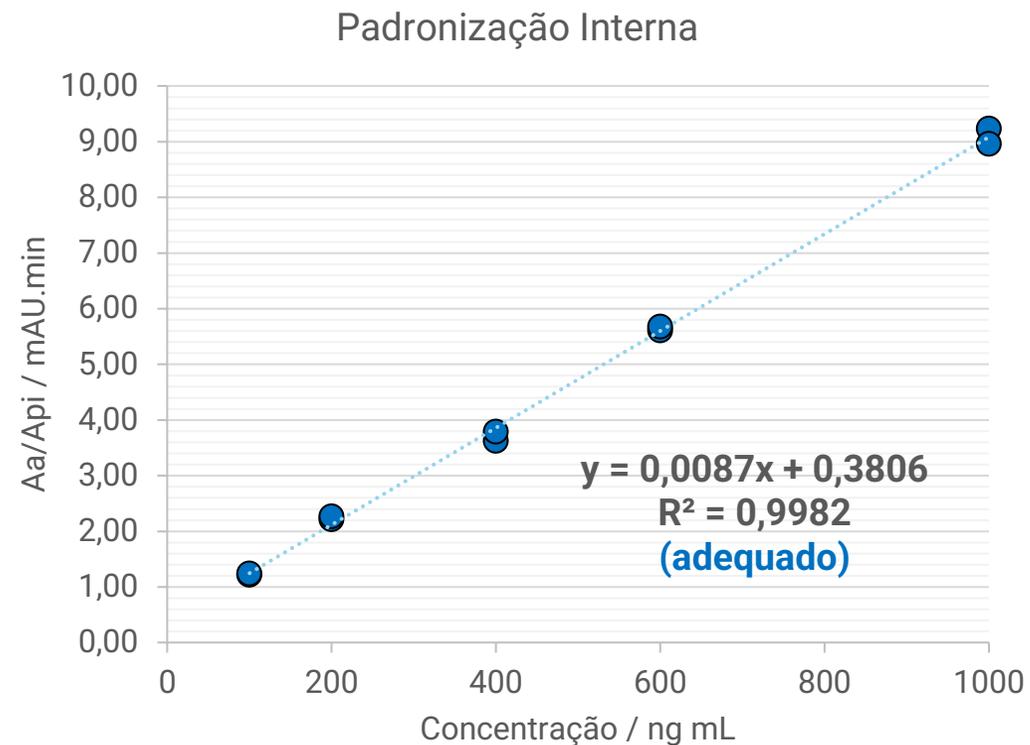
Concentração	Área Analito	Área PI	Razão
100,0	9596,00	7885,00	1,22
100,0	18207,00	14684,00	1,24
200,0	18217,00	8227,00	2,21
200,0	25417,00	11213,00	2,27
400,0	28950,00	7987,00	3,62
400,0	28810,00	7603,00	3,79
600,0	28505,00	5085,00	5,61
600,0	28950,00	5102,00	5,67
1000,0	45999,00	4981,00	9,23
1000,0	44748,00	4996,00	8,96

1. Inserir → Gráficos → Dispersão
2. Com os dados selecionados, adicionar a “Linha de tendência”.



CONSTRUINDO UMA CURVA

Concentração	Área Analito	Área PI	Razão
100,0	9596,00	7885,00	1,22
100,0	18207,00	14684,00	1,24
200,0	18217,00	8227,00	2,21
200,0	25417,00	11213,00	2,27
400,0	28950,00	7987,00	3,62
400,0	28810,00	7603,00	3,79
600,0	28505,00	5085,00	5,61
600,0	28950,00	5102,00	5,67
1000,0	45999,00	4981,00	9,23
1000,0	44748,00	4996,00	8,96



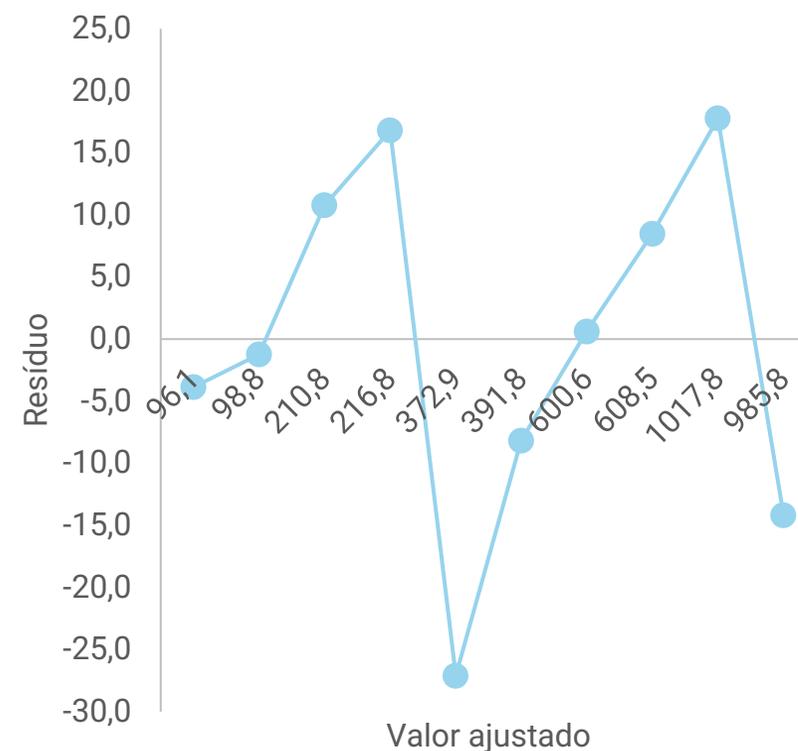
A CURVA É VÁLIDA?

$$Y = 0,0087x + 0,3806 \rightarrow X_e = (Y - 0,3806) / 0,0087$$

Concentração (X)	Razão (Y)	X_e (estimado)	$E_i (X - X_e)$	EPR_x	DPR_x
100,0	1,22	96,1	-3,9	-3,9	2
100,0	1,24	98,8	-1,2	-1,2	
200,0	2,21	211	11	5	2
200,0	2,27	217	17	8	
400,0	3,62	373	-27	-7	4
400,0	3,79	392	-8	-2	
600,0	5,61	601	1	0,1	1
600,0	5,67	608	9	1	
1000,0	9,23	1018	18	2	2
1000,0	8,96	986	-14	-1	

Critério de aceitabilidade: $EPR \pm 15\%$ $DPR \leq 15\%$

Gráfico de resíduos



A CURVA É VÁLIDA?

$$Y = 0,0087x + 0,3806 \rightarrow X_e = (Y - 0,3806) / 0,0087$$

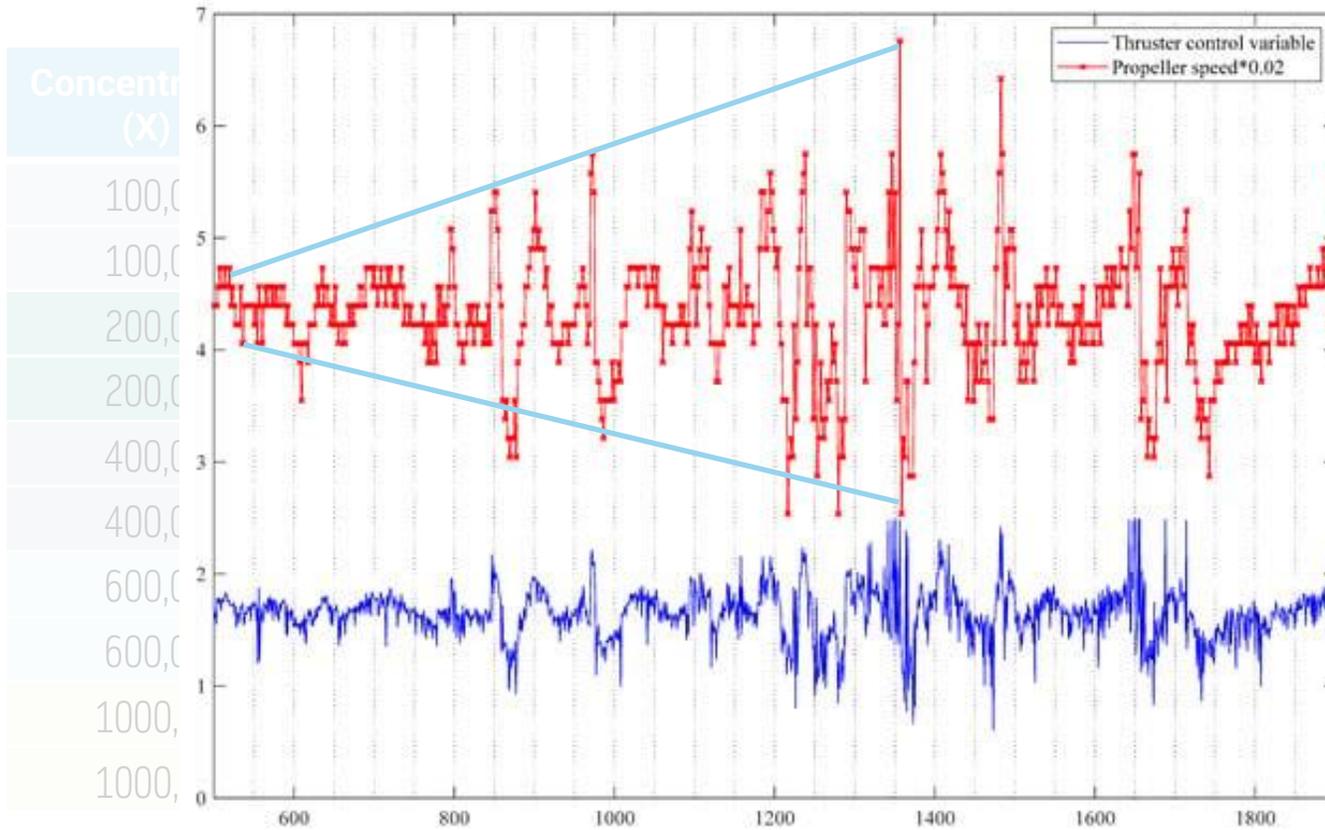
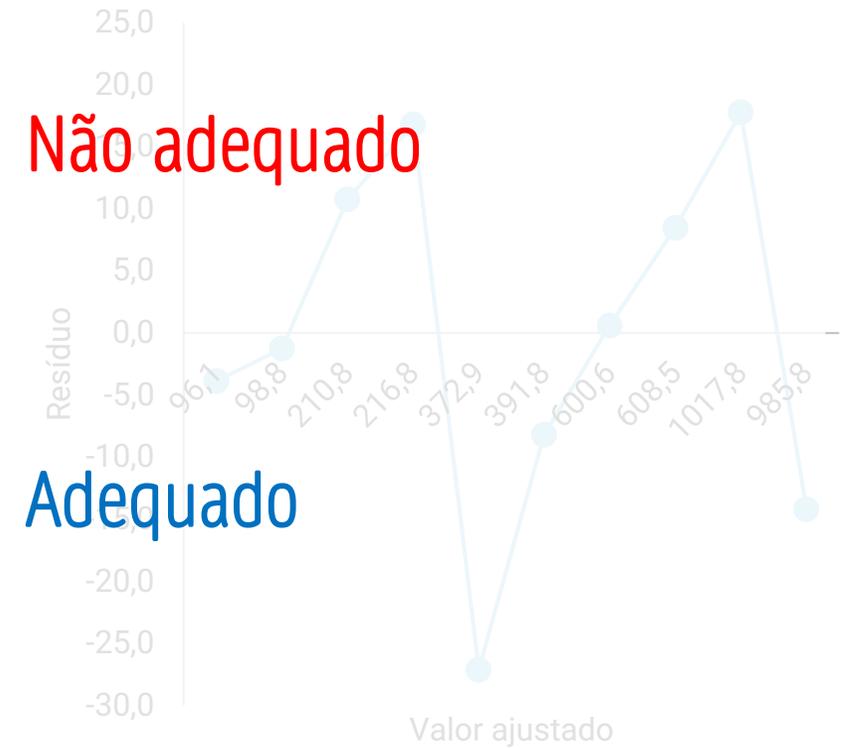
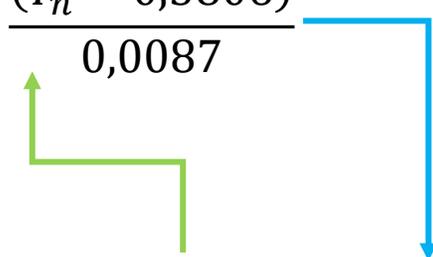


Gráfico de resíduos



CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA

$$C = X = \frac{(Y_n - 0,3806)}{0,0087}$$


	Área Analito	Área PI	Razão	Concentração (ng mL ⁻¹)	Média (ng mL ⁻¹)	Desvio Padrão (ng mL ⁻¹)
Amostra rep 1	38000	4800	7,92	866		
Amostra rep 2	38500	5000	7,70	841	867	26 (3%)
Amostra rep 3	37900	4650	8,15	893		



NO RELATÓRIO

- O QUE VOCÊS DEVEM FAZER -

DE ACORDO COM OS **MONITORES**

QUAIS DADOS APRESENTAR?

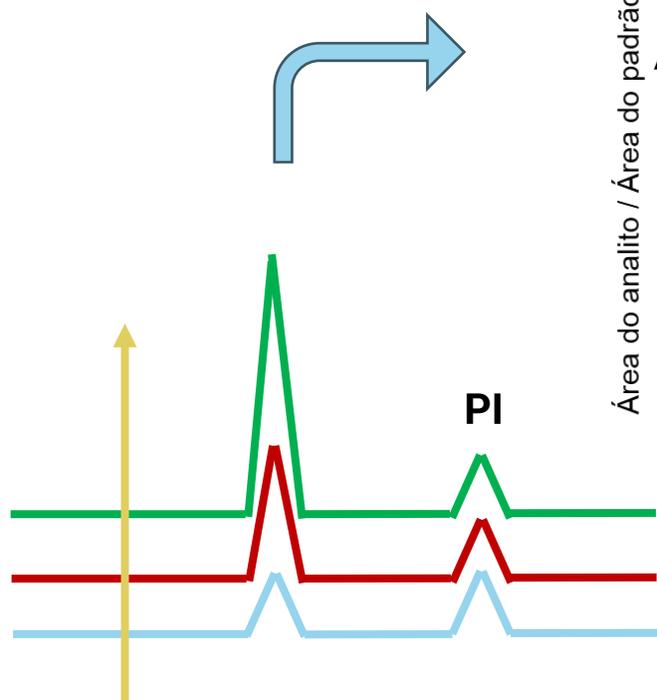
1. Tabela contendo os dados de área e concentração da curva analítica.
2. Tabela contendo os dados de área das amostras desconhecidas.
3. Plotar a curva analítica utilizando **todos os pontos** (5 níveis em duplicata = 10 pontos).
- Não adicionar a resposta da amostra na curva!
4. Realizar o ajuste linear, mostrando a equação da reta e o coeficiente de correlação (r).
- Indicar na forma $y = mx + b$, com valor de r e não R^2 .
5. Demonstrar a concentração da amostra por meio da **média e desvio-padrão** associados.
Ex.: C(midazolam) = (5,4 ± 0,4) g/L
- Média e desvio padrão dos valores de concentração obtidos para cada uma das réplicas.
- Atenção para os algarismos significativos!

LIMIARES ANALÍTICOS:

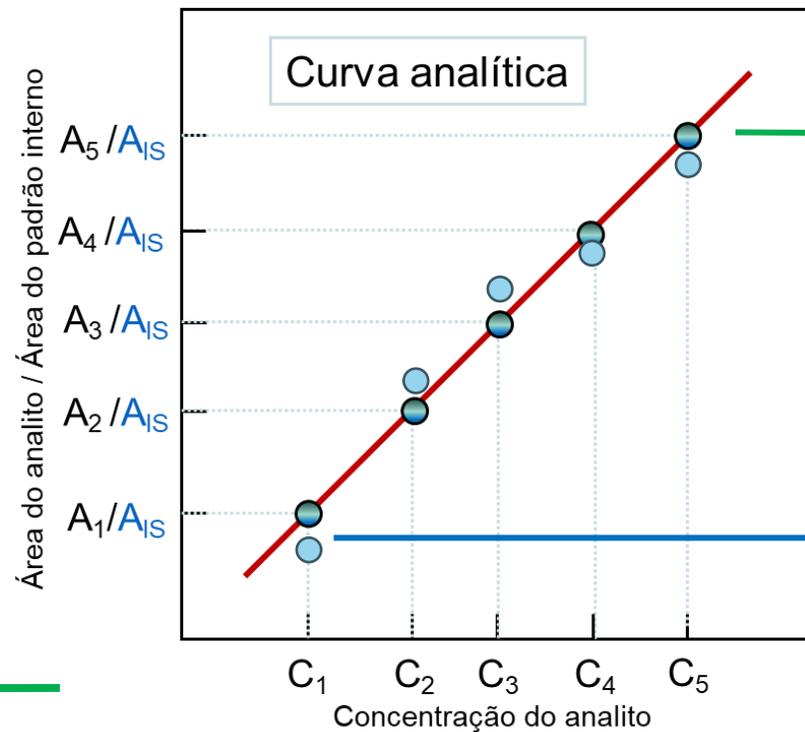
- LD, LIQ E LSQ -



RECAPITULANDO A LINEARIDADE...



O padrão interno se encontra NA MESMA CONCENTRAÇÃO em todas as amostras.



Maior nível de Conc.:
Limite Superior de Quantificação (LSQ)

Menor nível da curva:
Limite Inferior de Quantificação (LIQ)

PORTANTO, o intervalo linear compreende as concentrações do LIQ ao LSQ.



LIMIARES ANALÍTICOS

Limite de detecção

Menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado [como um valor exato], sob as condições experimentais estabelecidas.

Limite de quantificação

Menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser quantificada com **precisão e exatidão** aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas.

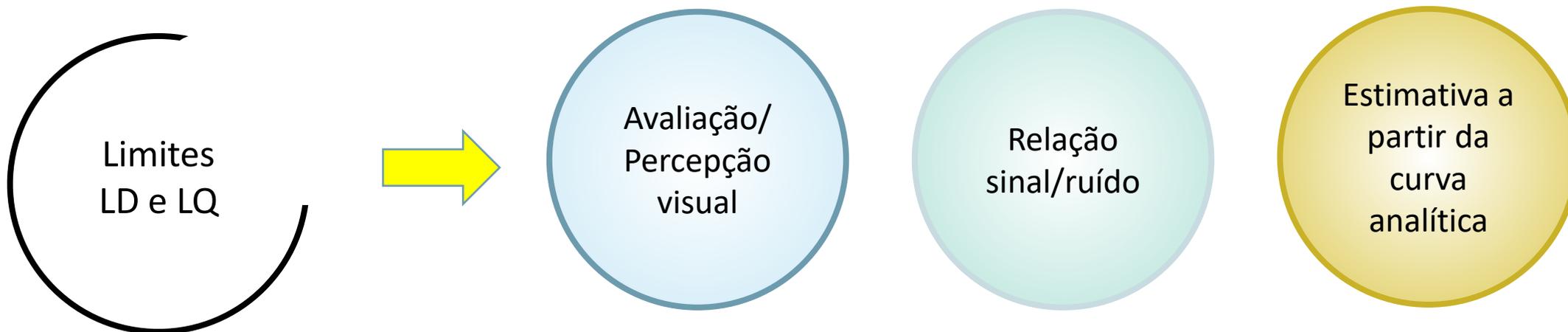
COMO AVALIAR OS LIMITES (LD E LIQ)?

DE ACORDO COM A **ANVISA/MAPA**

LIMIARES ANALÍTICOS

COMO FAZER?

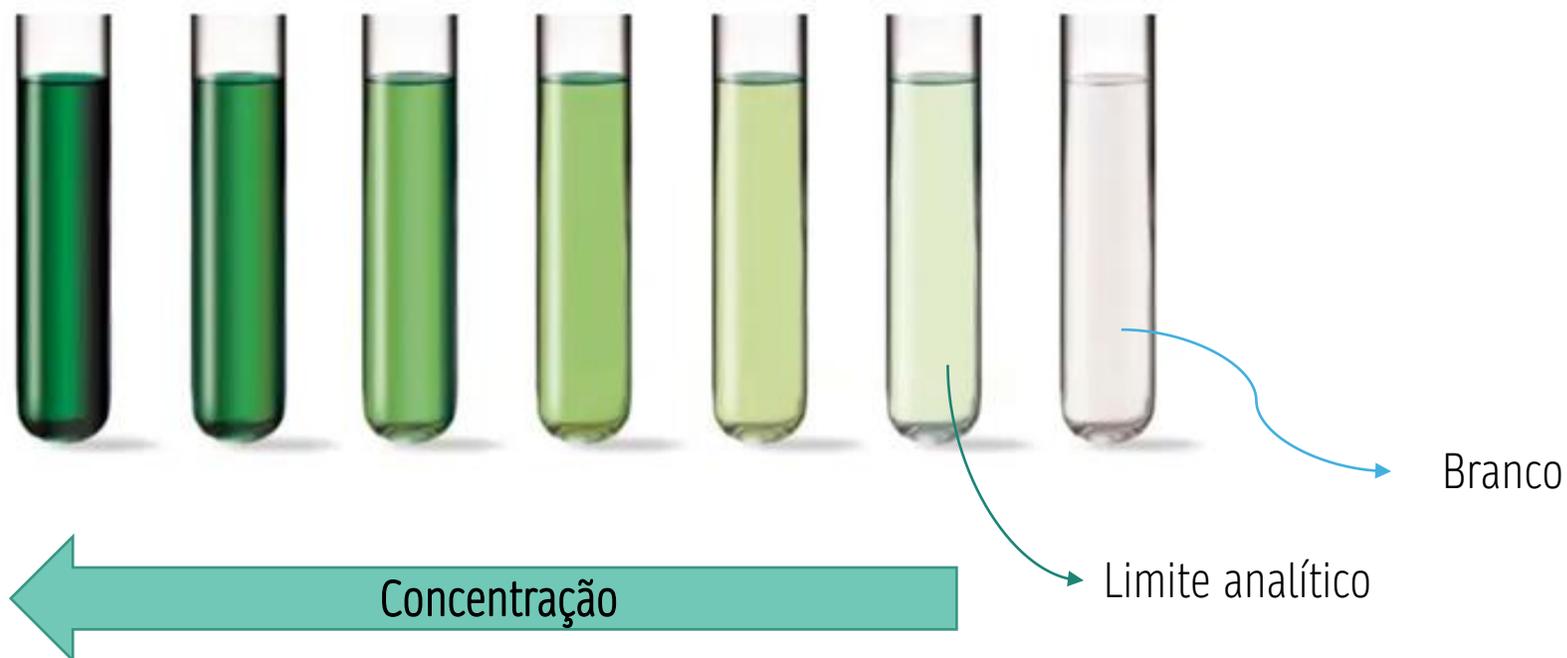
Dependendo se o método é instrumental ou não, diferentes recomendações são feitas



LIMIARES ANALÍTICOS

AVALIAÇÃO VISUAL

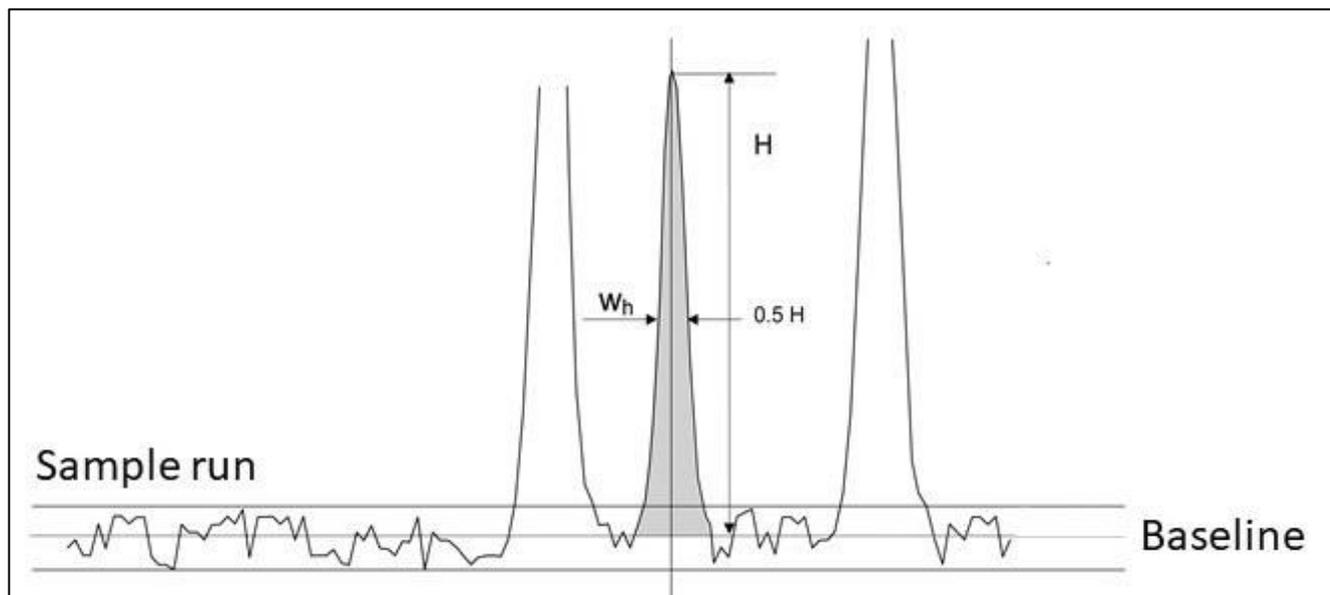
Normalmente são realizadas sucessivas diluições até se encontrar a menor concentração que pode ser diferenciado do branco.



LIMIARES ANALÍTICOS

RELAÇÃO SINAL/RUÍDO

Aplicável em procedimentos que **apresentem ruído de linha de base**, devendo-se atentar que a região do ruído do branco deve ser a mesma do sinal medido.



Critérios

LD de 3:1 ou 2:1

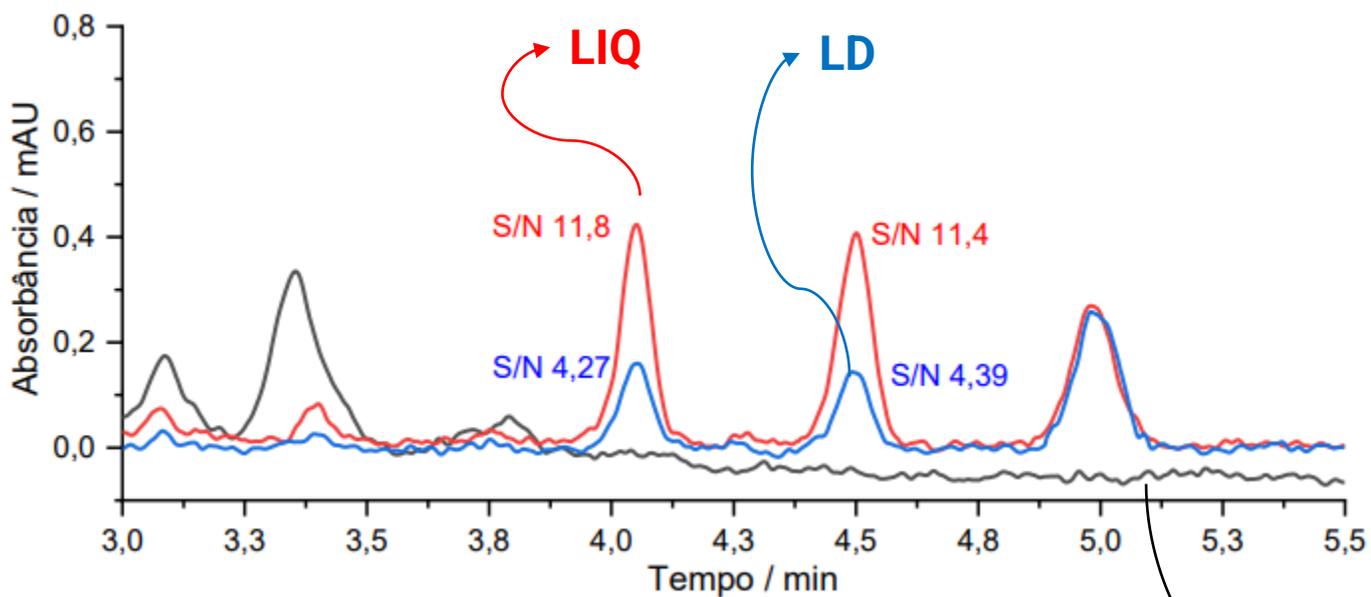
LQ de 10:1 ou 6:1

$$SN = \frac{2H}{h} = \frac{\text{Altura do sinal}}{\text{amplitude do ruído}}$$

LIMIARES ANALÍTICOS

RELAÇÃO SINAL/RUÍDO

Aplicável em procedimentos que **apresentem ruído de linha de base**, devendo-se atentar que a região do ruído do branco deve ser a mesma do sinal medido.



Critérios

LD de 3:1 ou 2:1

LQ de 10:1 ou 6:1

LIMIARES ANALÍTICOS

ESTIMATIVA A PARTIR DA CURVA ANALÍTICA

Limite de Detecção

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

Limite de Quantificação

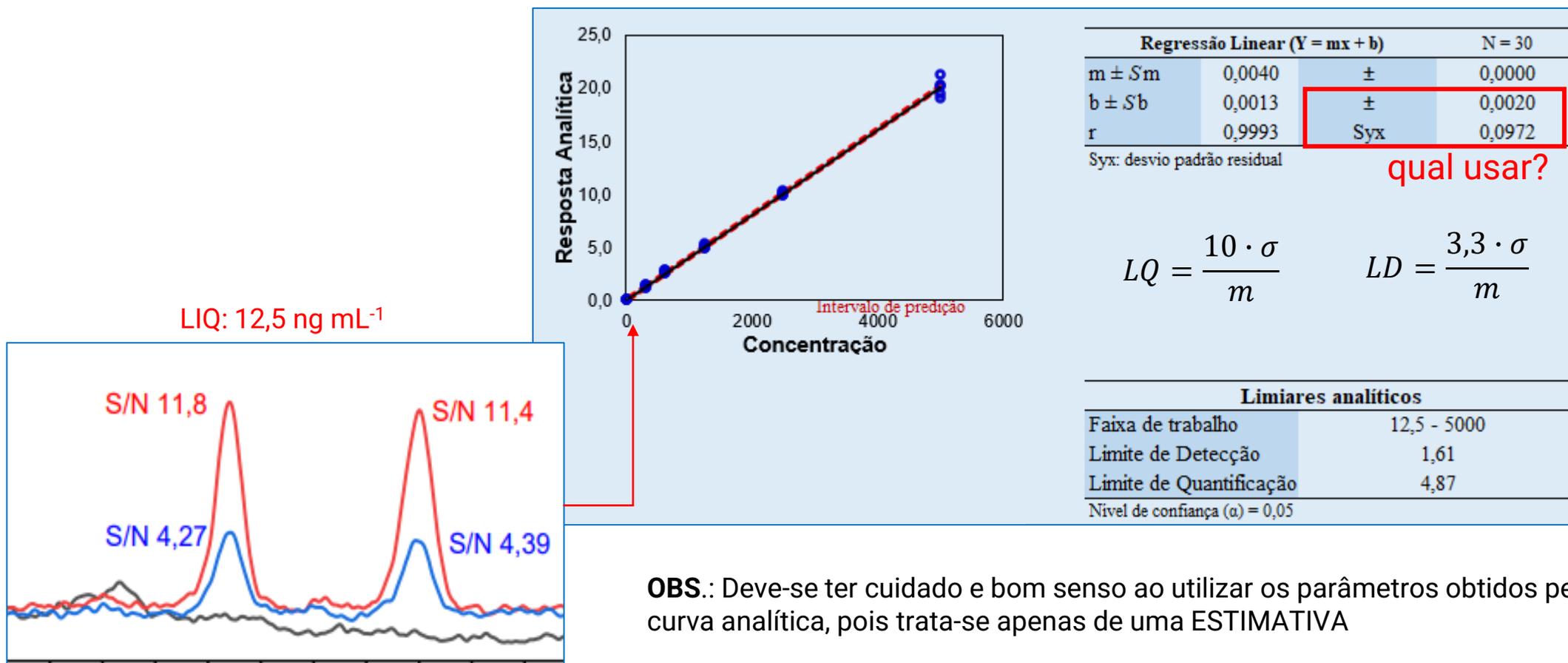
$$LQ = \frac{10 \cdot \sigma}{m}$$

onde m é a inclinação da curva analítica e σ o desvio padrão, podendo ser obtido de três formas:

- I. Desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo , três curvas analíticas contendo concentrações do menor nível da curva;
- II. Desvio padrão residual, S_{yx} , da linha de regressão;
- III. Estimativa de ruído do branco [no mínimo 6 amostras]

LIMIARES ANALÍTICOS

ESTIMATIVA A PARTIR DA CURVA ANALÍTICA





PRECISÃO E EXATIDÃO

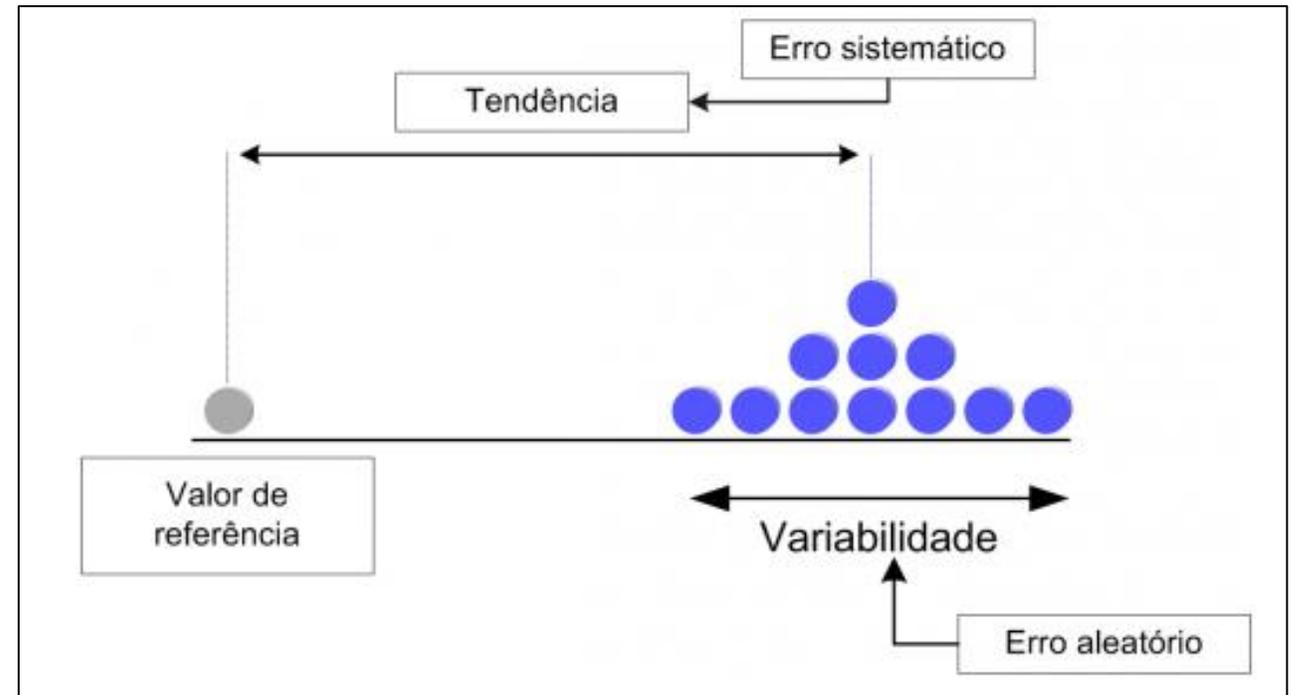
- DISPERSÃO E ACURÁCIA -



EXATIDÃO E PRECISÃO

Exatidão é o grau de concordância entre um valor medido e um valor verdadeiro.

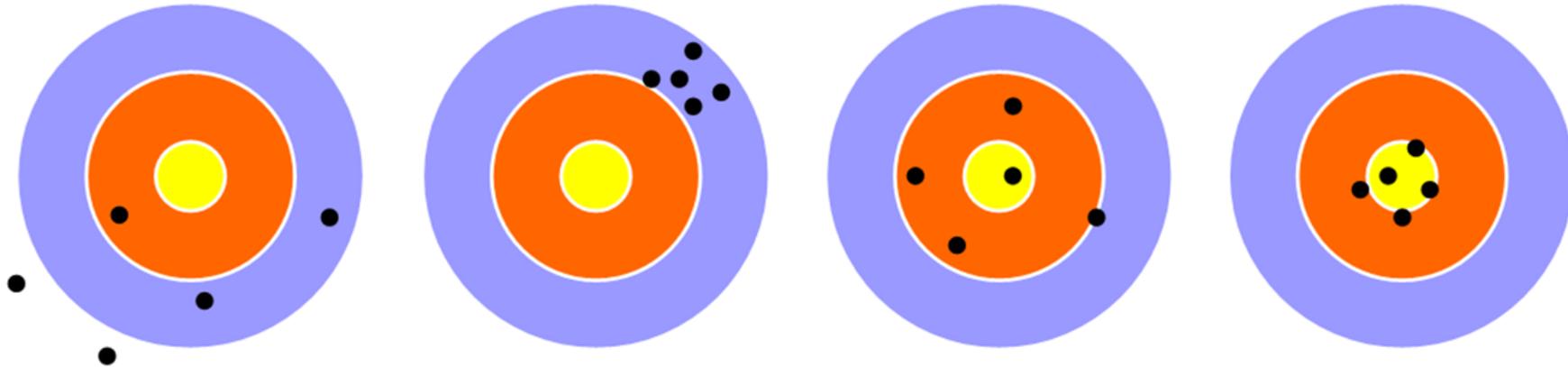
Precisão é a proximidade dos resultados obtidos por repetidas aferições de múltiplas alíquotas de uma única fonte de matriz.



EXATIDÃO E PRECISÃO

Exatidão é o grau de concordância entre um valor medido e um valor verdadeiro.

Precisão é a proximidade dos resultados obtidos por repetidas aferições.



PRECISÃO: NÃO
EXATIDÃO: NÃO

PRECISÃO: SIM
EXATIDÃO: NÃO

PRECISÃO: NÃO
EXATIDÃO: SIM

PRECISÃO: SIM
EXATIDÃO: SIM

COMO AVALIAR A EXATIDÃO E PRECISÃO?

DE ACORDO COM A **ANVISA/MAPA**

EXATIDÃO E PRECISÃO

COMO FAZER?

Preparar padrões de concentração conhecida (**Controles de Qualidade**), na matriz pretendida e em replicatas, de no mínimo 3 concentrações ao longo da faixa de trabalho. De preferência, utilizar concentrações diferentes dos pontos utilizados na curva de calibração.

Anvisa RDC 166/17 e MAPA



EXATIDÃO

Anvisa RDC 27/2012

Erro Padrão Relativo

$$EPR = \frac{(\bar{C}_{experimental} - C_{nominal})}{C_{nominal}} \cdot 100\%$$

Expressa o afastamento entre o valor real e o valor esperado

Critério: EPR \pm 15-20%

Anvisa RDC 166/2017 e MAPA

Recuperação

$$R = \frac{\bar{C}_{experimental}}{C_{nominal}} \cdot 100\%$$

Expressa a tendência de sub- ou superestimação do valor real com o esperado

Critério: 80 – 110%

EXATIDÃO

Critérios de aceitação (MAPA)

TABELA 4: Recuperação do analito em função da concentração.

Concentração do analito (%)	Razão do analito	Unidade	Recuperação (%)
100	1	100%	98-102
10	10^{-1}	10%	98-102
1	10^{-2}	1%	97-103
0,1	10^{-3}	0,1%	95-105
0,01	10^{-4}	100 ppm	90-107
0,001	10^{-5}	10 ppm	80-110
0,0001	10^{-6}	1 ppm	80-110
0,00001	10^{-7}	100 ppb	80-110
0,000001	10^{-8}	10 ppb	60-115
0,0000001	10^{-9}	1 ppb	40-120

PRECISÃO

Desvio Padrão Relativo (Coeficiente de variação)

$$DPR(CV) = \frac{s_r}{\bar{C}} \cdot 100\%$$

Expressa a dispersão dos dados

Critério: DPR ≤ 15-20%
(Anvisa RDC 27/2012)

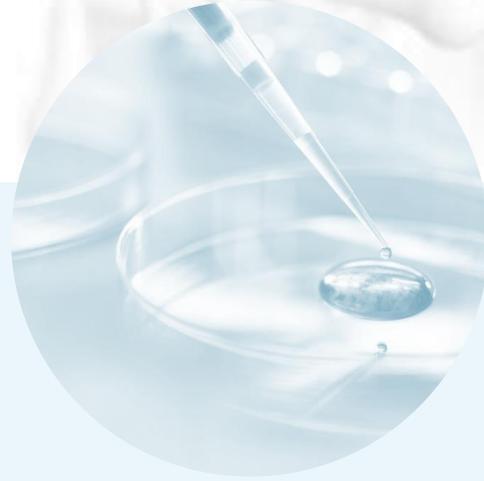
Tabela 3

Coeficiente máximo admitido, de acordo com a concentração do analito

Concentração (C)	Coeficiente de Variação (%)
C < 1 mg/kg	35
1 mg/kg ≤ C < 10 mg/kg	30
10mg/kg ≤ C < 100mg/kg	20
100 mg/kg ≤ C < 1000 mg/kg	15
1000 mg/kg ≤ C < 10000 mg/kg	10
10 mg/kg ≤ C < 100 mg/kg	7,3
100 mg/kg ≤ C < 1000 mg/kg	5,3
1000 mg/kg ≤ C < 10000 mg/kg	3,7
10 g/kg ≤ C < 100 g/kg	2,7
100 g/kg ≤ C < 1000 g/kg	2,0

MAPA





ありがとうございました。

LEANDRO OKA-DUARTE

LEANDRO.OKA@USP.BR