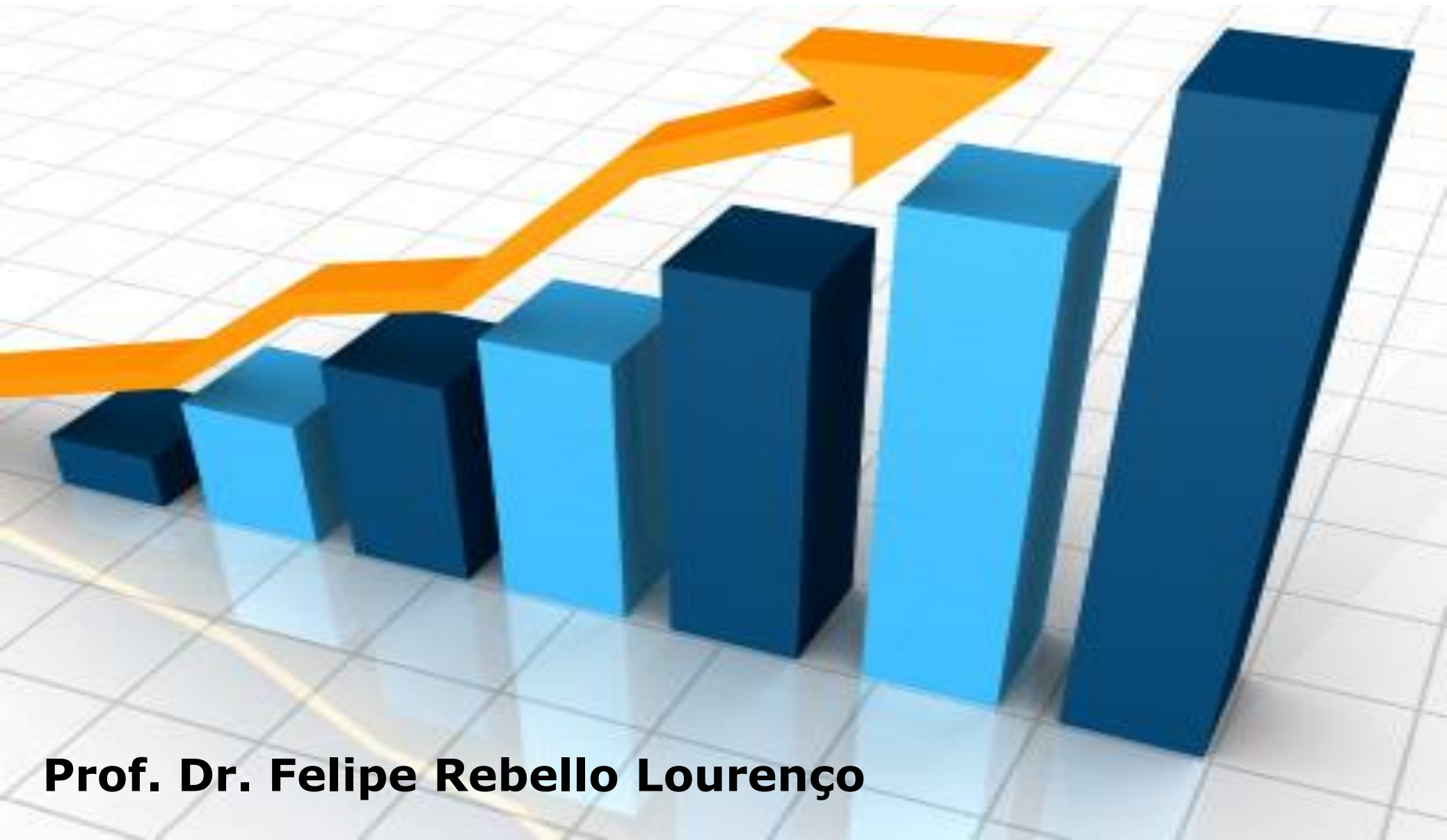


VALIDAÇÃO DE MÉTODO



Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço

DEFINIÇÃO DE VALIDAÇÃO



Validação é?

A 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.

(RDC 166/2017 – Anvisa)

CARACTERÍSTICAS DE PERFORMANCE



Validação de métodos analíticos:

- Especificidade/seletividade
- Exatidão
- Precisão
- Linearidade/Faixa
- Limite de Detecção/Quantificação
- Robustez

PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO



- Especificidade / Seletividade
 - Especificidade: “Um método que produz resposta para apenas um analito é chamado específico.”
 - Seletividade: “Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo.”

ESPECIFICIDADE/ SELETIVIDADE



- Impurezas
 - Orgânicas, inorgânicas, etc.
 - Substâncias relacionadas
 - Produtos de degradação
- Na ausência de SQR das impurezas
 - Hidrólise Ácida
 - Hidrólise Básica
 - Degradação térmica
 - Oxidação

ESPECIFICIDADE/ SELETIVIDADE

TIPO DE REAÇÃO	CAT.	PROD. DE DEGRADAÇÃO	EXEMPLOS
HIDRÓLISE <ul style="list-style-type: none"> ■ Ésteres ■ Lactonas ■ Amidas ■ Lactamas ■ Éteres 	■ Água	<ul style="list-style-type: none"> ■ Ácido + álcool ou fenol ■ Ácido hidróxi ■ Ácido + Amina ■ Aminoácido ■ Álcool e/ou fenol 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Ácido Acetilsalicílico ■ Ácido Ascórbico, Pilocarpina ■ Lidocaína, Peptídeos ■ Antibióticos beta-lactâmicos, Benzodiazepínicos ■ Glicosídeos
ALCOÓLISE <ul style="list-style-type: none"> ■ Ésteres ■ Lactonas ■ Amidas ■ Lactamas 	■ Álcool	<ul style="list-style-type: none"> ■ Éster + álcool ■ Éster hidróxi ■ Éster + Amina ■ Éster aminoácido 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Formas Farmacêuticas com excipientes contendo grupos hidróxi (etanol, glicerol, macrogols, etc)
CICLIZAÇÃO <ul style="list-style-type: none"> ■ Aminoácidos ■ Ácidos Hidroxicarboxílicos 		<ul style="list-style-type: none"> ■ Lactama, produtos de policondensação ■ Lactona, produtos de policondensação 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Inibidores da ACE (produtos de degradação: dicetopiperazina), peptídeos ■ Ácido Láctico

ESPECIFICIDADE/ SELETIVIDADE

TIPO DE REAÇÃO	CAT.	PROD. DE DEGRADAÇÃO	EXEMPLOS
OXIDAÇÃO <ul style="list-style-type: none"> ■ Fenóis ■ Olefinas ■ Eno-dióis ■ α-Cetóis ■ Álcoois Aromáticos ■ Aminas ■ Tioéteres 	<ul style="list-style-type: none"> ■ O_2 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Quinonas, Polímeros ■ Peróxidos, Aldeídos ■ α-Dicetonas ■ Cetonas ■ Aldeídos e Ácidos Carboxílicos ■ Aminóxidos ■ Sulfóxidos, Sulfonas 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Eserina \rightarrow Eserolina \rightarrow Rubreserina ■ Corticosteróides ■ Ácido Ascórbico \rightarrow Ácido Desidróxiascóbico ■ Corticosteróides \rightarrow 17-Cetoesteróides ■ Álcool Benzílico ■ Fenotiazinas sulfuradas ■ Fenotiazinas sulfuradas
ISOMERIZAÇÃO CIS-TRANS	<ul style="list-style-type: none"> ■ Luz 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Cis \rightarrow Trans ■ Trans \rightarrow Cis 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Cisplatina
EPIMERIZAÇÃO	<ul style="list-style-type: none"> ■ Ácido ou Base 		<ul style="list-style-type: none"> ■ Pilocarpina \rightarrow Isopilocarpina ■ Tetraciclina \rightarrow Epitetraciclina

PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO



- Exatidão (Acurácia)
 - Definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro

EXATIDÃO (ACURÁCIA)



- Materiais de Referência Certificados
 - Amostras simuladas (placebo)
 - Recuperação (“spike”)
- Comparações interlaboratórias
- Comparação de métodos

TESTES

t-STUDENT



H0: igualdade vs. H1: diferença

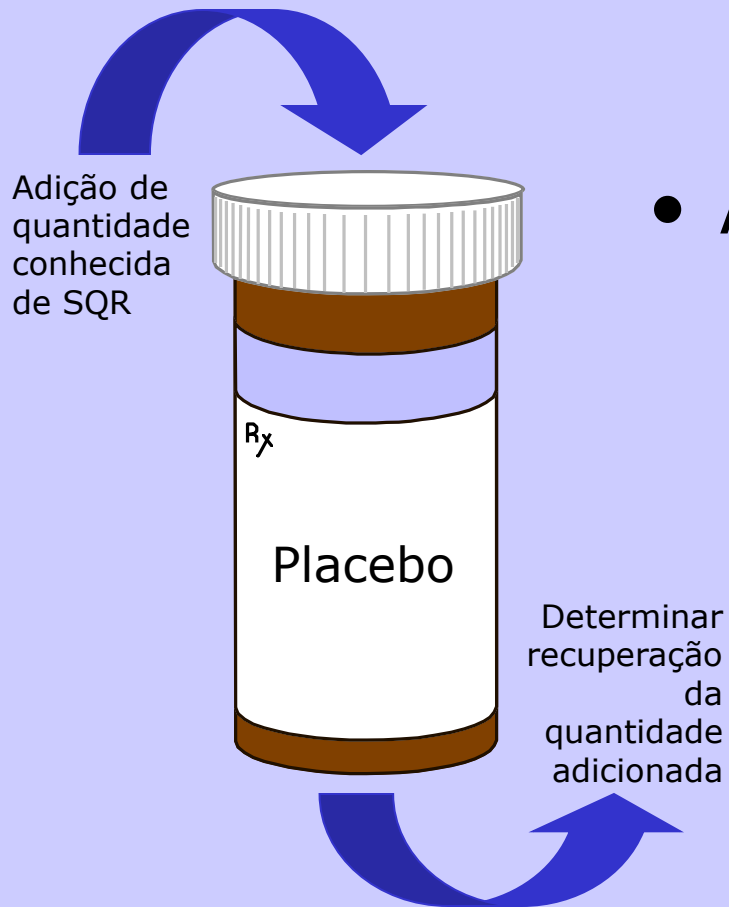
- Teste t simples
- Teste t para duas médias

H0: diferença vs. H1: equivalência

- TOST (Two One-Sided Test)

Formulados para rejeitar H0

EXATIDÃO: MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO



- Amostras simuladas (Placebo)

$$Rec = \frac{Conc. Experimental}{Conc. Teórica} \times 100$$

EXATIDÃO: TESTE t PARA 1 AMOSTRA

H0: $\mu = 100$

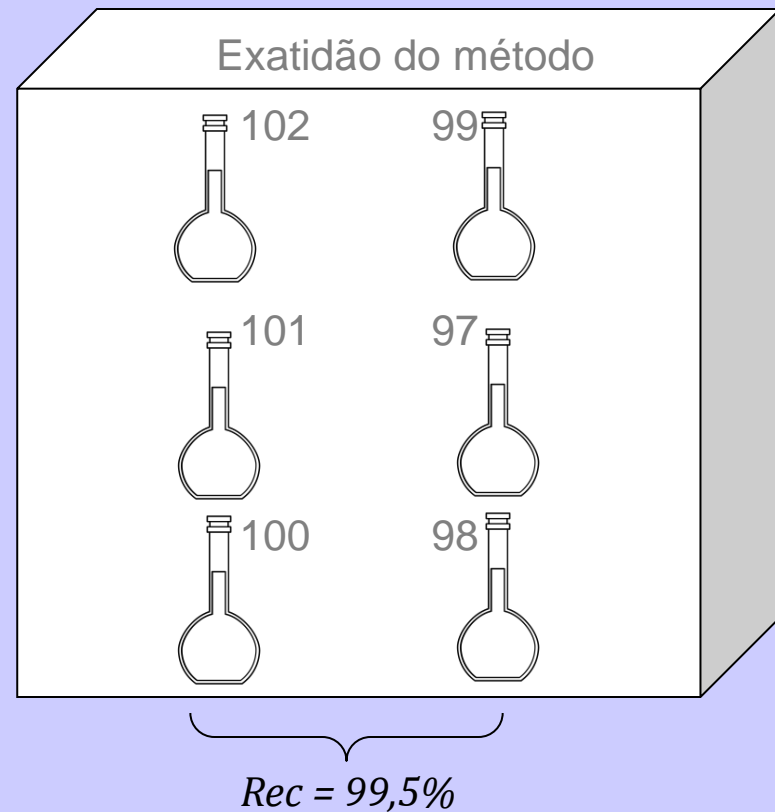
H1: $\mu \neq 100$

$$t = \frac{Rec - \mu}{s / \sqrt{n}}$$

→ Stat

→ Estatísticas Básicas

→ Teste t para 1 amostra...



EXATIDÃO: TESTE t PARA 1 AMOSTRA

Teste T para Uma Amostra: Rec

Estatísticas Descritivas

N	Média	DesvPad	EP Média	IC de 95% para μ
6	99,500	1,871	0,764	(97,537; 101,463)

μ : média de Rec

Teste

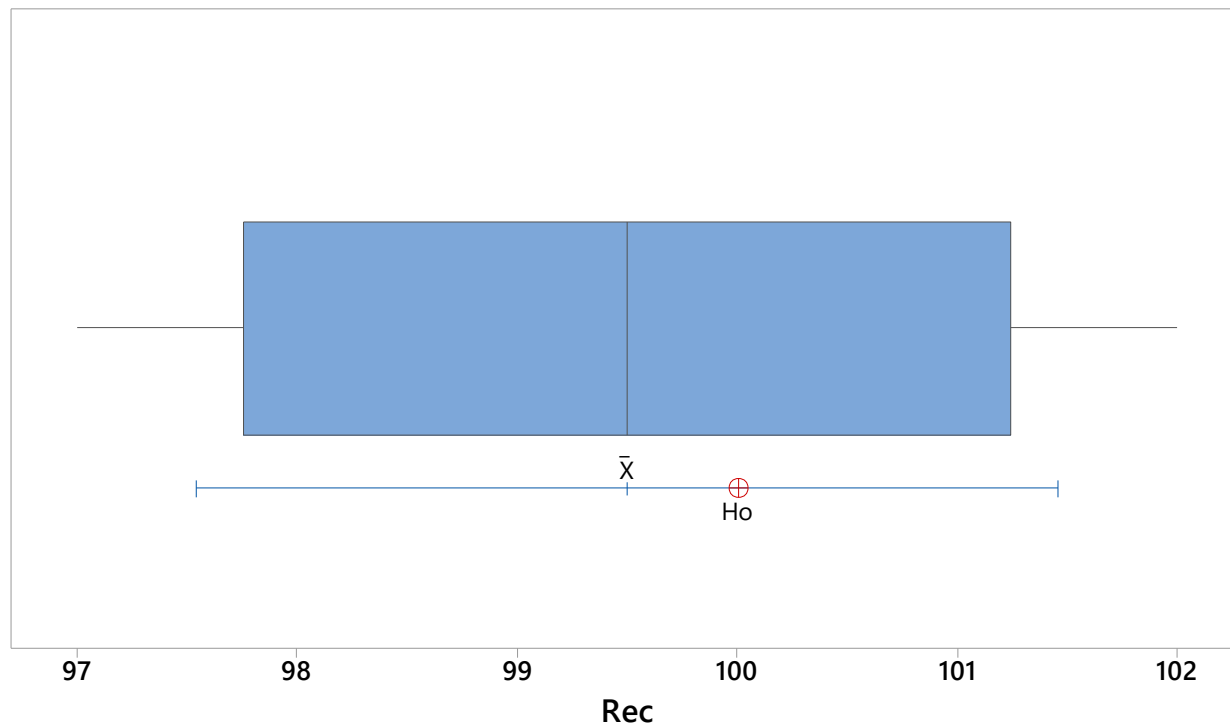
Hipótese nula $H_0: \mu = 100$
Hipótese alternativa $H_1: \mu \neq 100$

Valor-T	Valor-p
-0,65	0,542

Boxplot de Rec

EXATIDÃO: TESTE t PARA 1 AMOSTRA

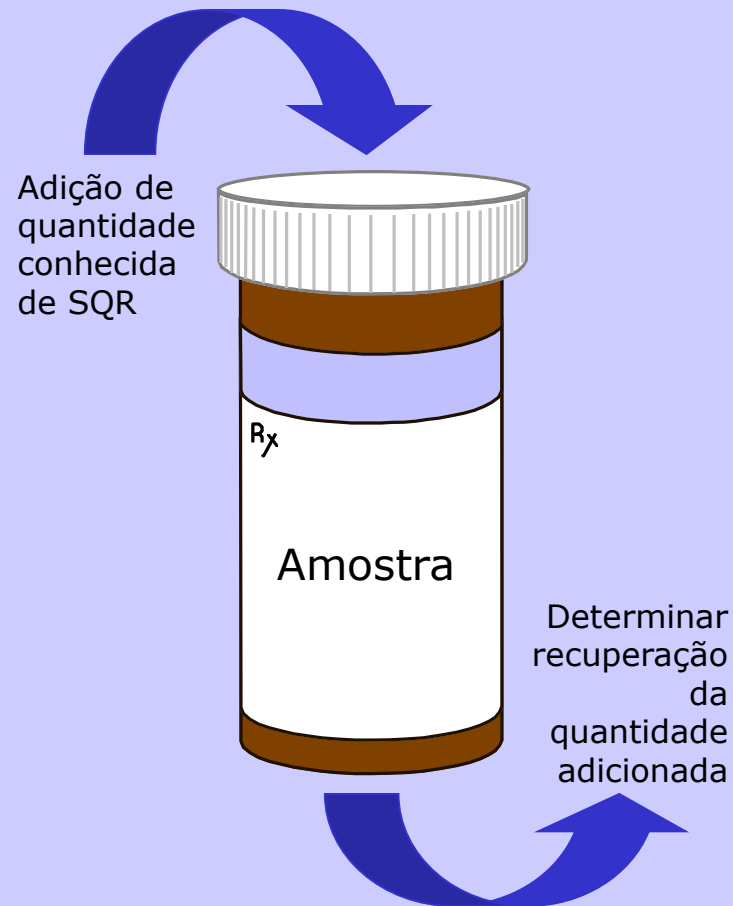
Boxplot de Rec
(com H_0 e intervalo de 95% de confiança t para a média)



EXATIDÃO: MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO

- Adição de padrão ("spike")

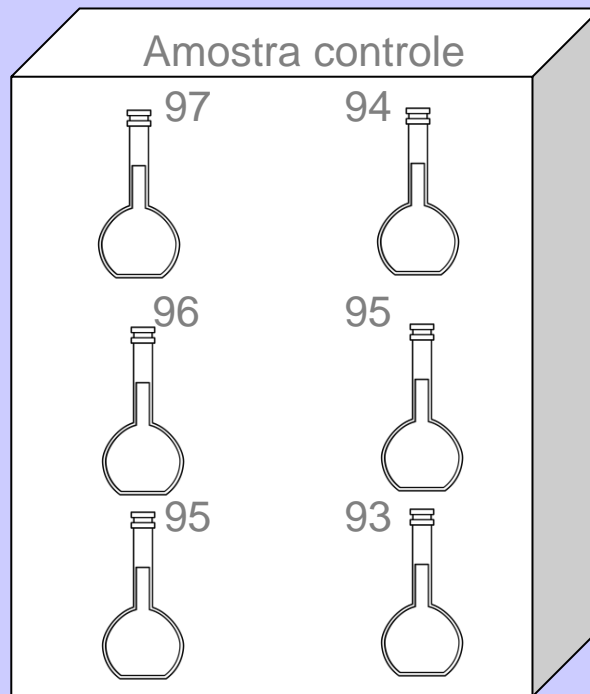
$$Rec = \frac{Conc. Ad. - Conc. controle}{Conc. Teórica} \times 100$$



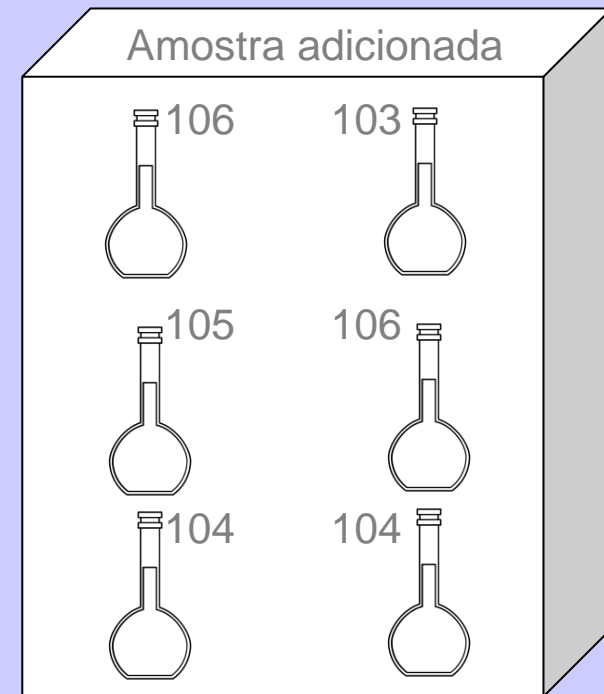
EXATIDÃO: TESTE t PARA DUAS AMOSTRAS

$$H_0: \mu_a - \mu_c = 10$$
$$H_1: \mu_a - \mu_c \neq 10$$

$$t = \frac{(X_a - X_c) - 10}{\sqrt{s_o^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$$



$$X_c = 95,0$$



$$X_a = 104,7$$

→ Stat

→ Estatísticas Básicas

→ Teste t para 2 amostras...

$$Rec = \frac{104,7 - 95,0}{10} \times 100 = 97,0\%$$

EXATIDÃO: TESTE t PARA DUAS AMOSTRAS

Teste T para Duas Amostras e IC: Amostra adicionada; ... tra controle

Método

μ_1 : média de Amostra adicionada

μ_2 : média de Amostra controle

Diferença: $\mu_1 - \mu_2$

Não assumiu-se igualdade de variâncias para esta análise.

Estatísticas Descritivas

Amostra	N	Média	DesvPad	EP Média
Amostra adicionada	6	104,67	1,21	0,49
Amostra controle	6	95,00	1,41	0,58

Estimativa da diferença

Diferença	IC de 95% para a Diferença
9,667	(7,947; 11,386)

Teste

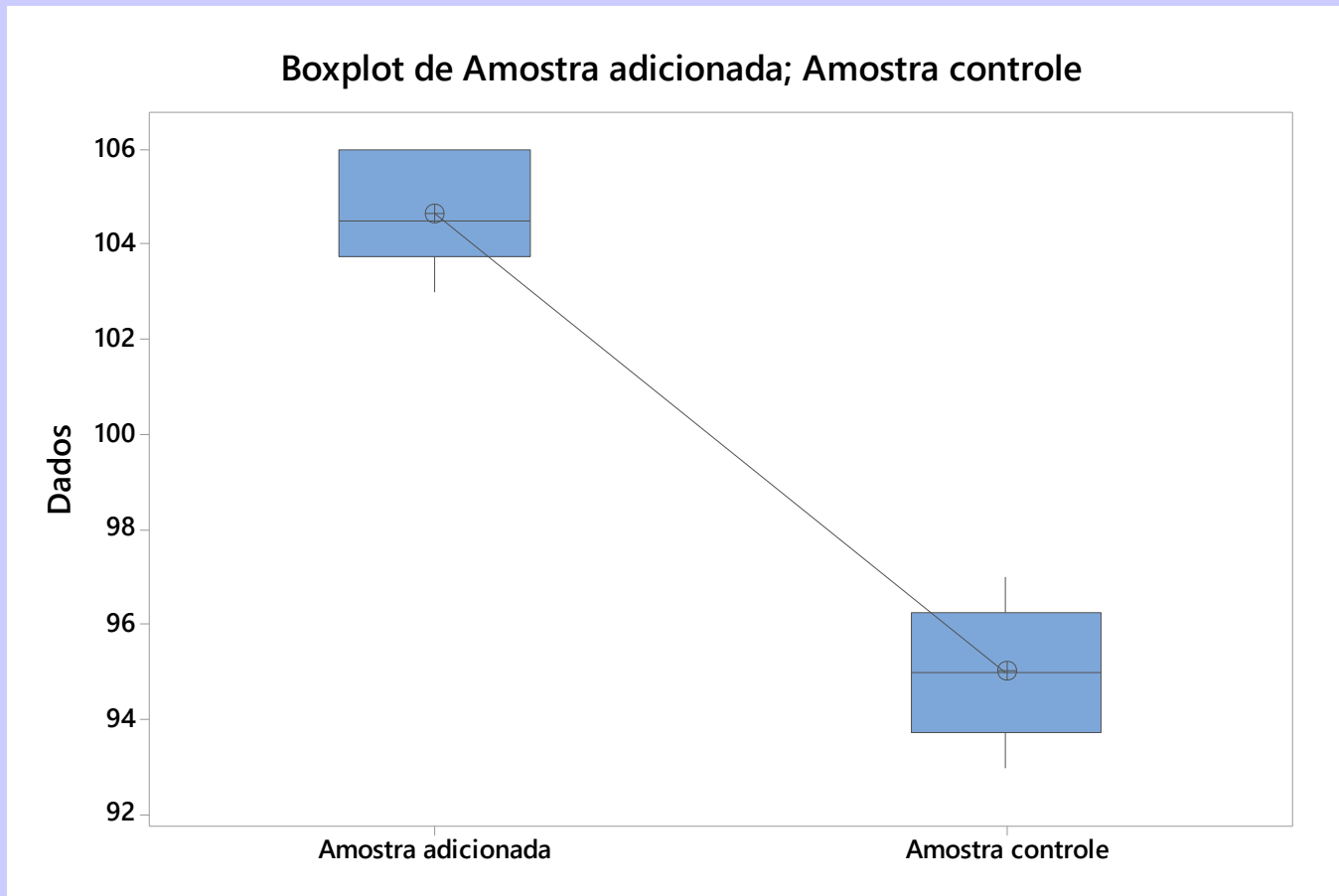
Hipótese nula $H_0: \mu_1 - \mu_2 = 10$

Hipótese alternativa $H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 10$

Valor-T	GL	Valor-p
-0,44	9	0,671

Boxplot de Amostra adicionada; Amostra controle

EXATIDÃO: TESTE t PARA DUAS AMOSTRAS

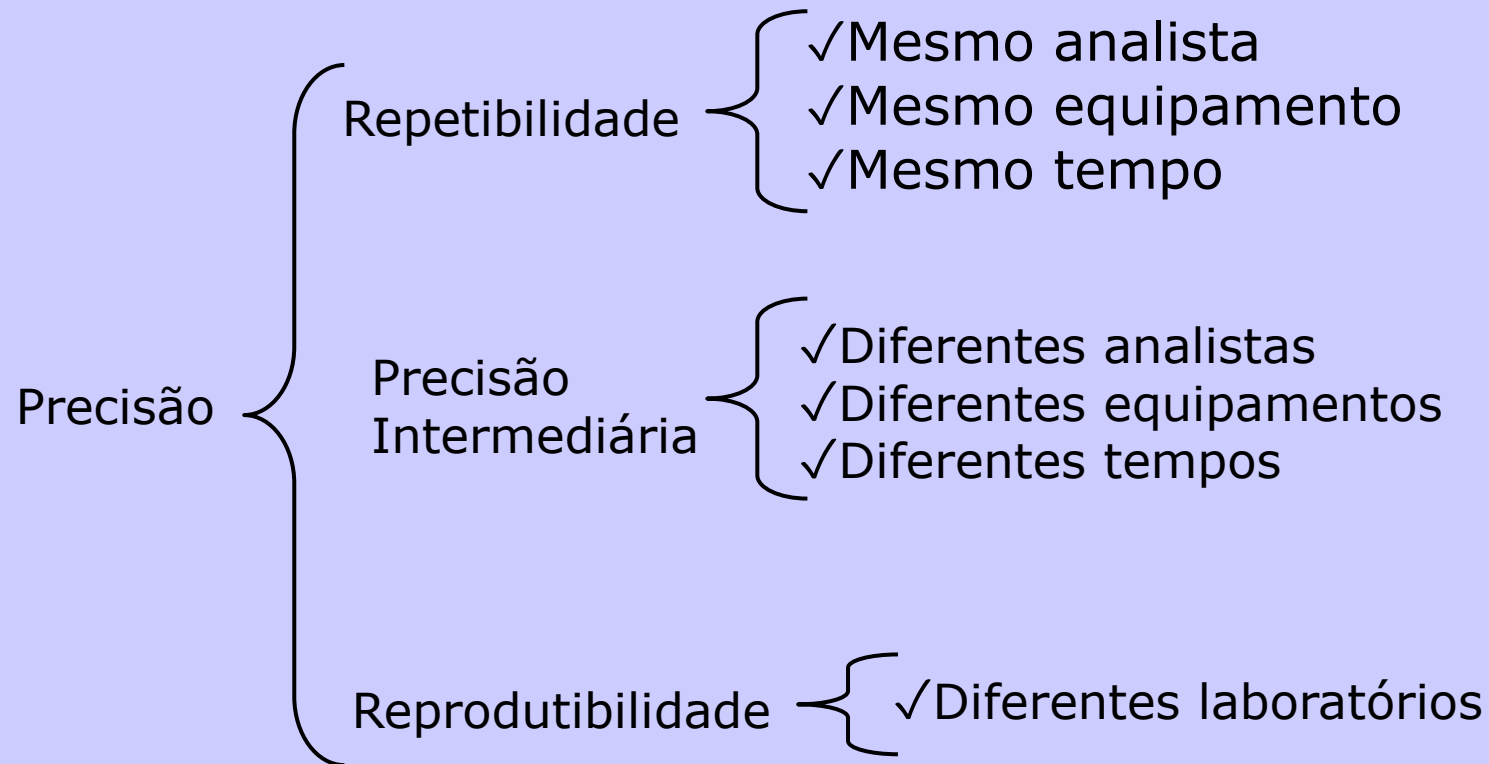


PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO

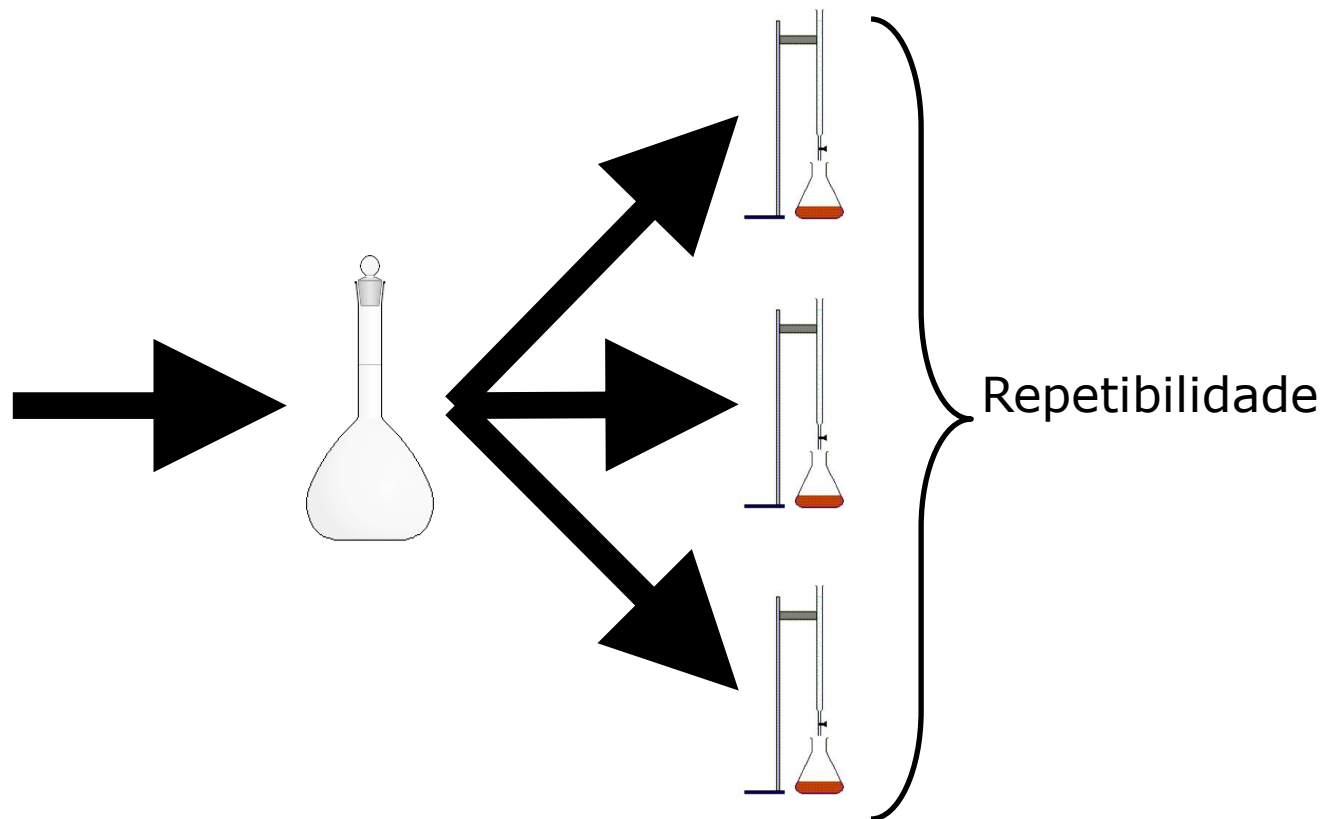


- Precisão
 - Precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, geralmente expressa como desvio padrão ou desvio padrão relativo.

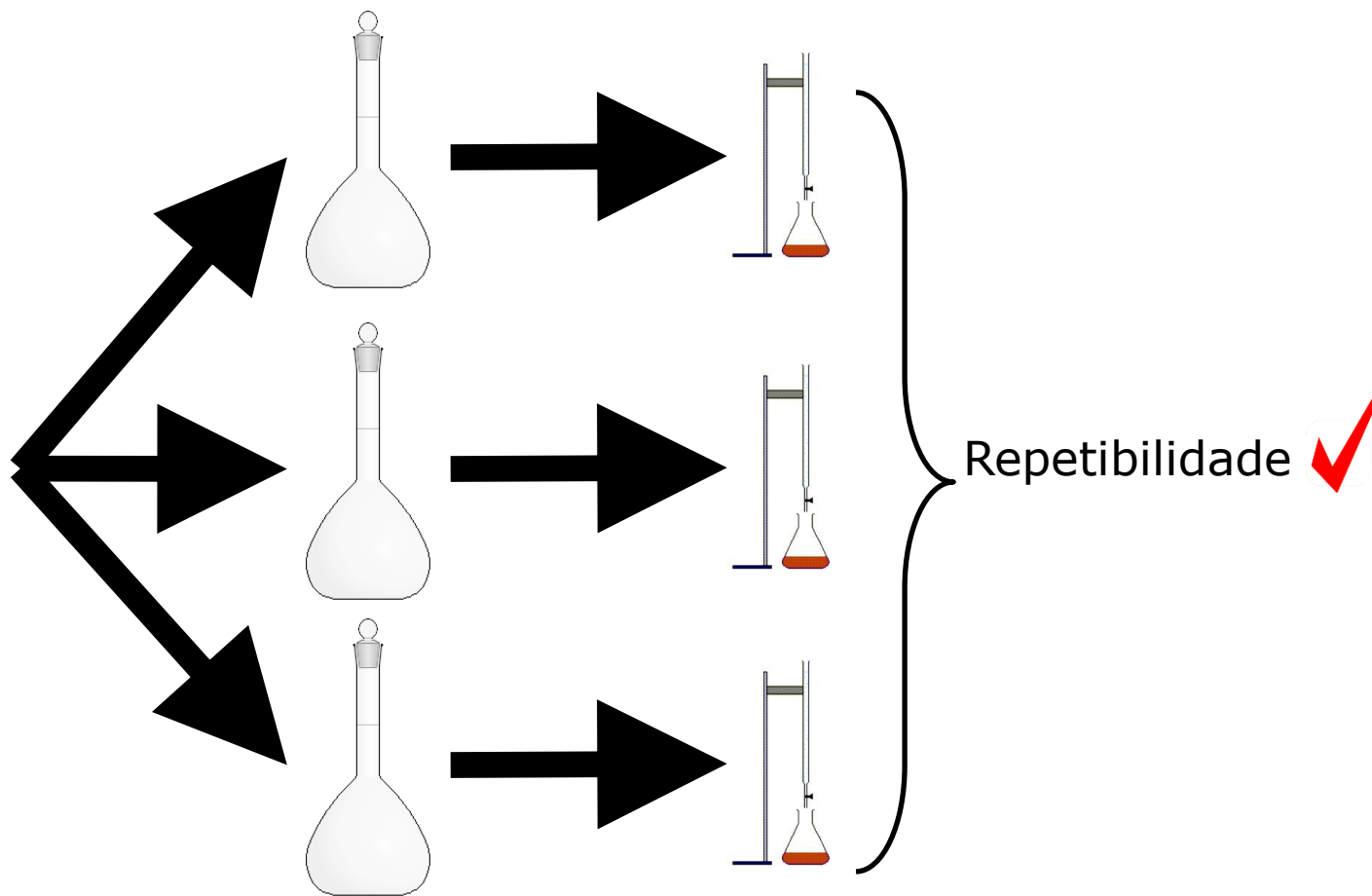
REPETIBILIDADE, PRECISÃO INTERMEDIÁRIA E REPRODUTIBILIDADE



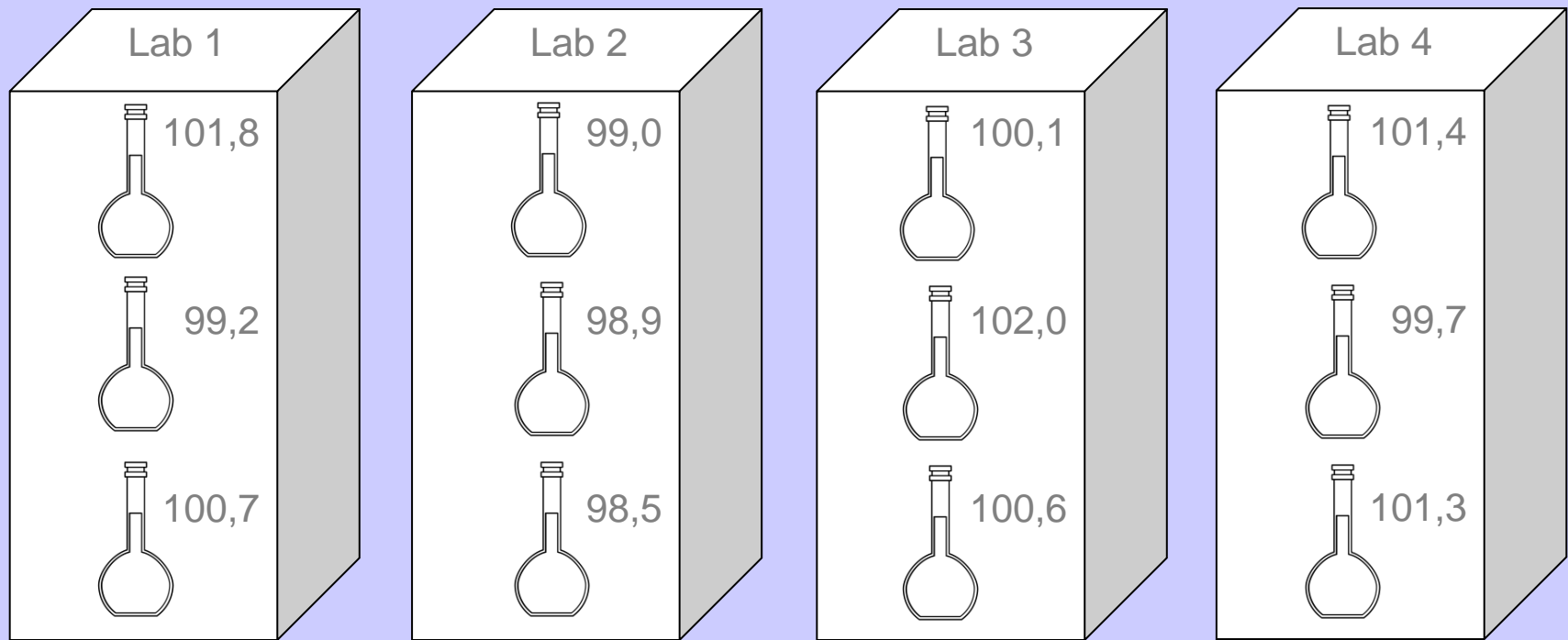
REPETIBILIDADE, PRECISÃO INTERMEDIÁRIA E REPRODUTIBILIDADE



REPETIBILIDADE, PRECISÃO INTERMEDIÁRIA E REPRODUTIBILIDADE



PRECISÃO: ANÁLISE DE VARIÂNCIA



PRECISÃO: ANÁLISE DE VARIÂNCIA

Fonte	g.l.	SQ	QM	F
Between	$k-1$	SQB	$\frac{SQB}{k-1}$	$\frac{QMB}{QMW}$
Within	$nk-k$	$SQW = SQT - SQB$	$\frac{SQW}{nk-k}$	
Total	$nk-1$	SQT		

REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

ANOVA com um fator: Resultado versus Laboratorio

Método

Hipótese nula	Todas as médias são iguais
Hipótese alternativa	Nem todas as médias são iguais
Nível de significância	$\alpha = 0,05$

Assumiu-se igualdade de variâncias para a análise

Informações dos Fatores

Fator	Níveis	Valores
Laboratorio	4	1; 2; 3; 4

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Laboratorio	3	8,780	2,9267	3,20	0,083
Erro	8	7,307	0,9133		
Total	11	16,087			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,955685	54,58%	37,55%	0,00%

Médias

Laboratorio	N	Média	DesvPad	IC de 95%
1	3	100,567	1,305	(99,294; 101,839)
2	3	98,800	0,265	(97,528; 100,072)
3	3	100,900	0,985	(99,628; 102,172)
4	3	100,800	0,954	(99,528; 102,072)

DesvPad Combinado = 0,955685

Gráfico de Intervalos de Resultado versus Laboratorio

Normplot dos Resíduos para Resultado

REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Laboratorio	3	8,780	2,9267	3,20	0,083
Erro	8	7,307	0,9133		
Total	11	16,087			

$$s_{Repe} = \sqrt{QM_{Erro}}$$

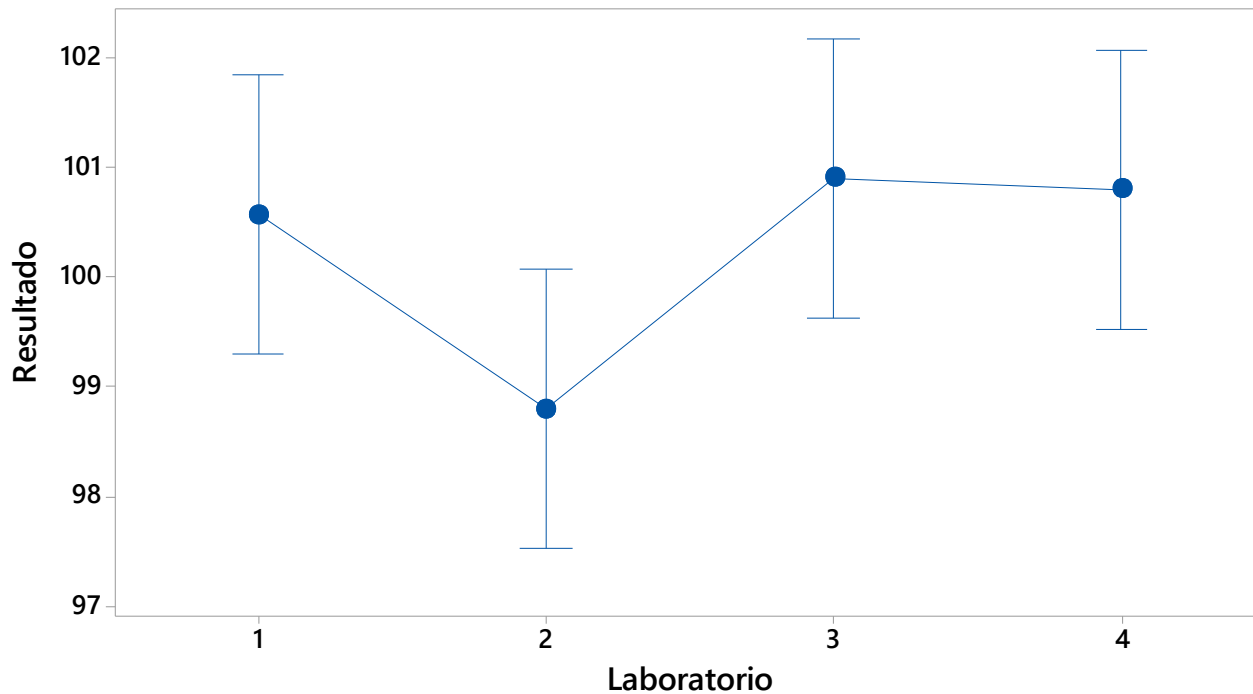
$$s_{Repe} = \sqrt{0,913} = 0,96$$

$$s_{PI} = \sqrt{QM_{Erro} + QM_{Dia}}$$

$$s_{PI} = \sqrt{0,913 + 2,927} = 1,96$$

REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

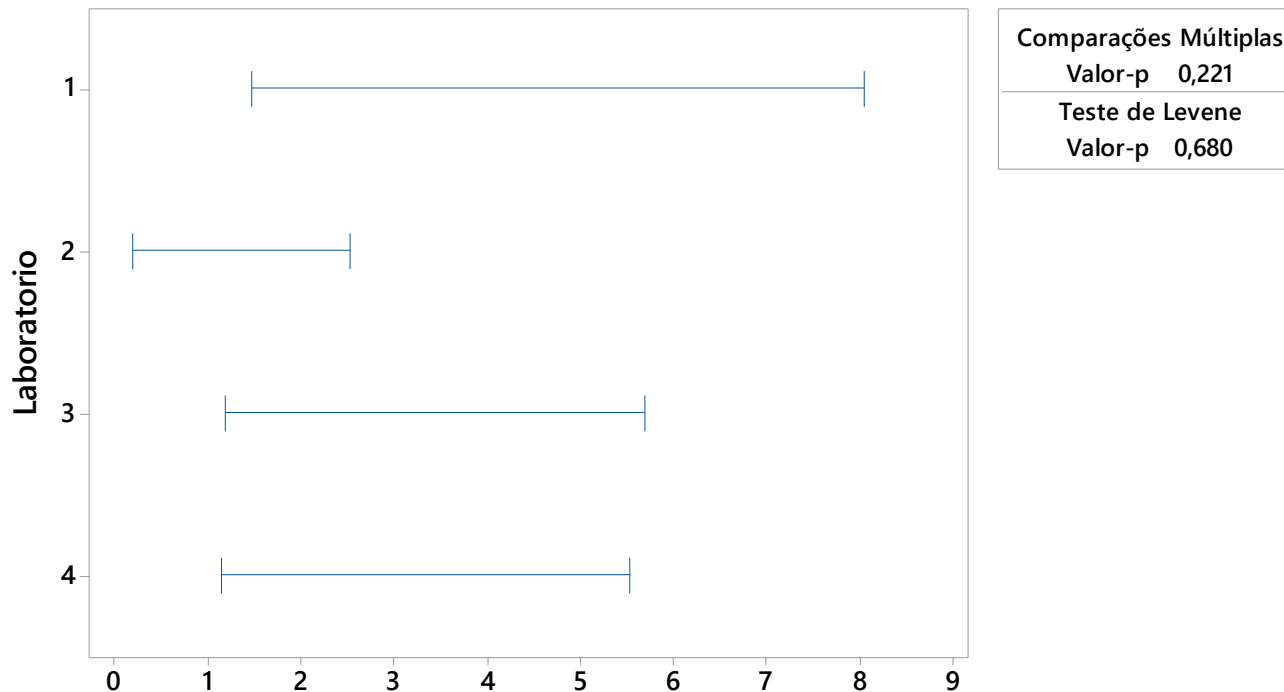
Gráfico de Intervalos de Resultado versus Laboratorio
IC de 95% para a Média



O desvio padrão combinado foi usado para calcular os intervalos.

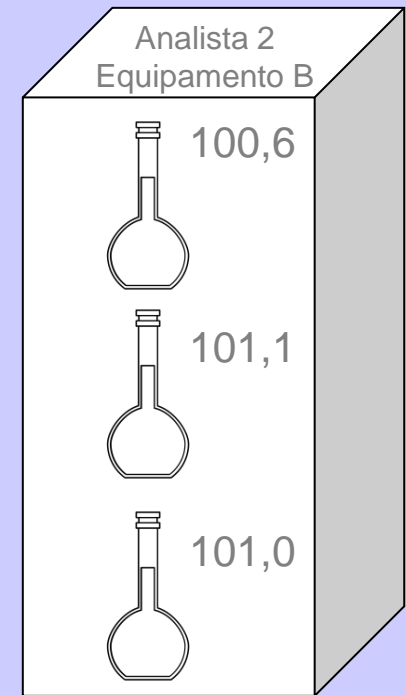
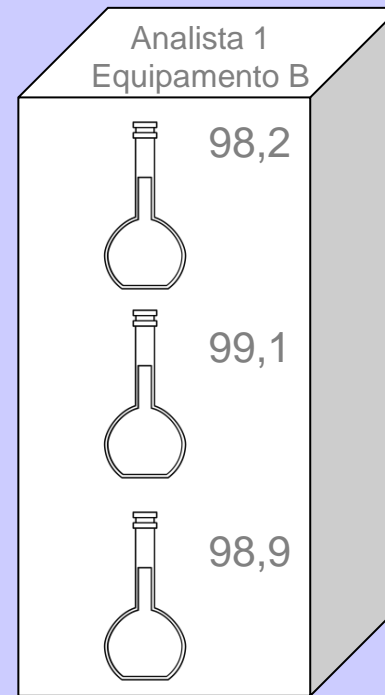
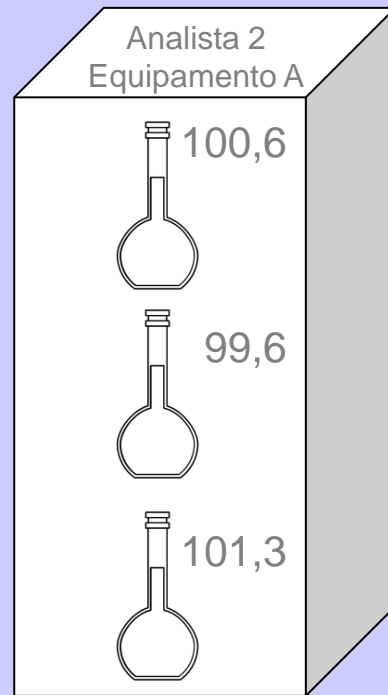
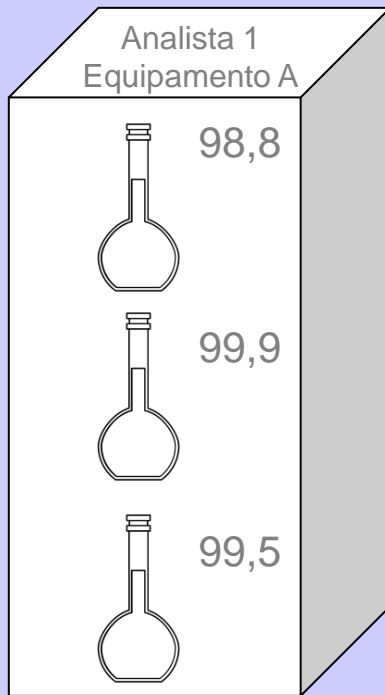
REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

Teste para Igualdade de Variâncias: Resultado versus Laboratório
Intervalos de comparação múltipla para o desvio padrão, $\alpha = 0,05$



Se os intervalos não se sobrepuserem, os desvios padrão correspondentes serão significativamente diferentes.

PRECISÃO: ANOVA 2-FATORES



REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Analista	1	7,2075	7,2075	19,66	0,002
Equipamento	1	0,1408	0,1408	0,38	0,553
Analista*Equipamento	1	1,1408	1,1408	3,11	0,116
Erro	8	2,9333	0,3667		
Total	11	11,4225			

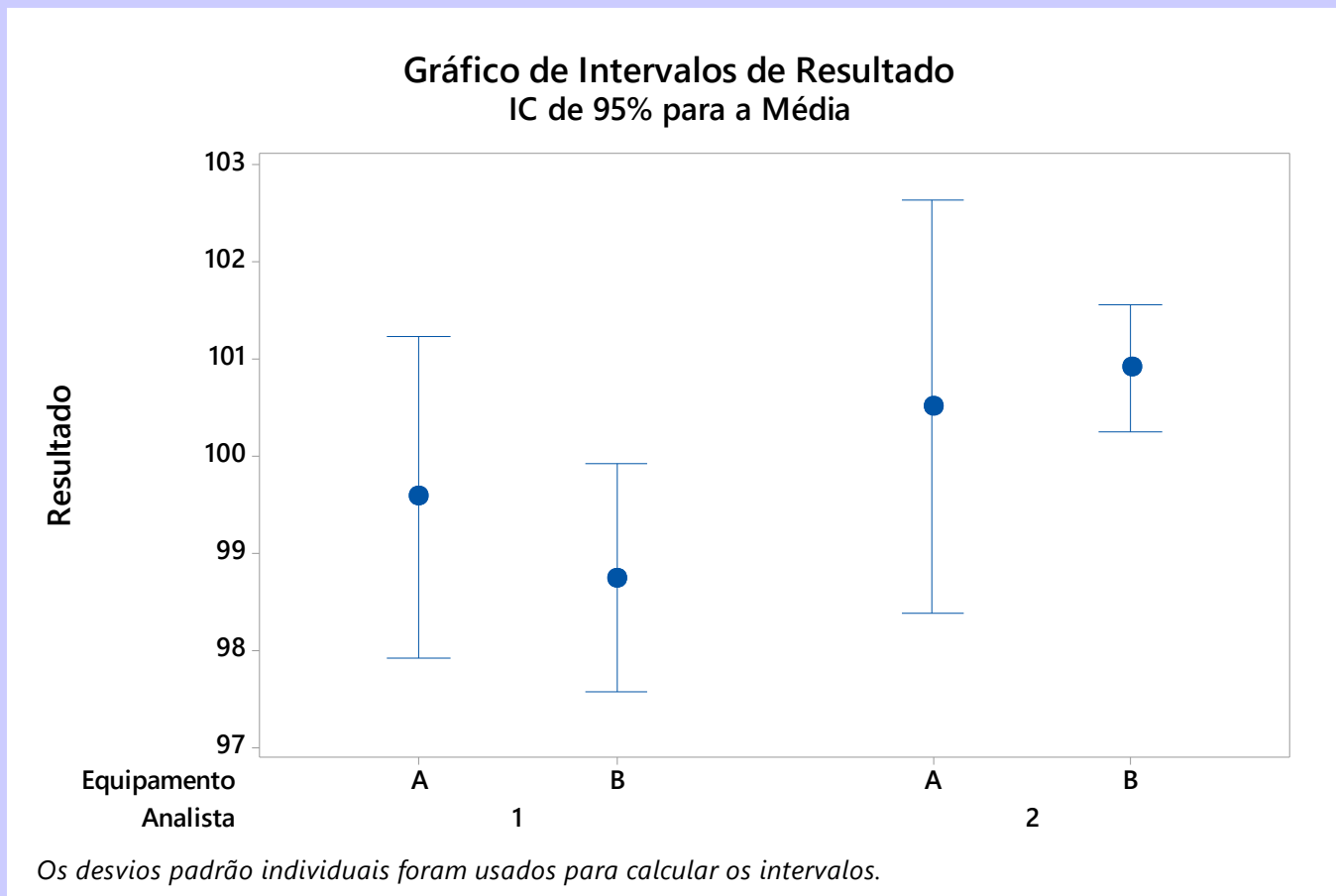
81,4%

1,6%

12,9%

4,1%

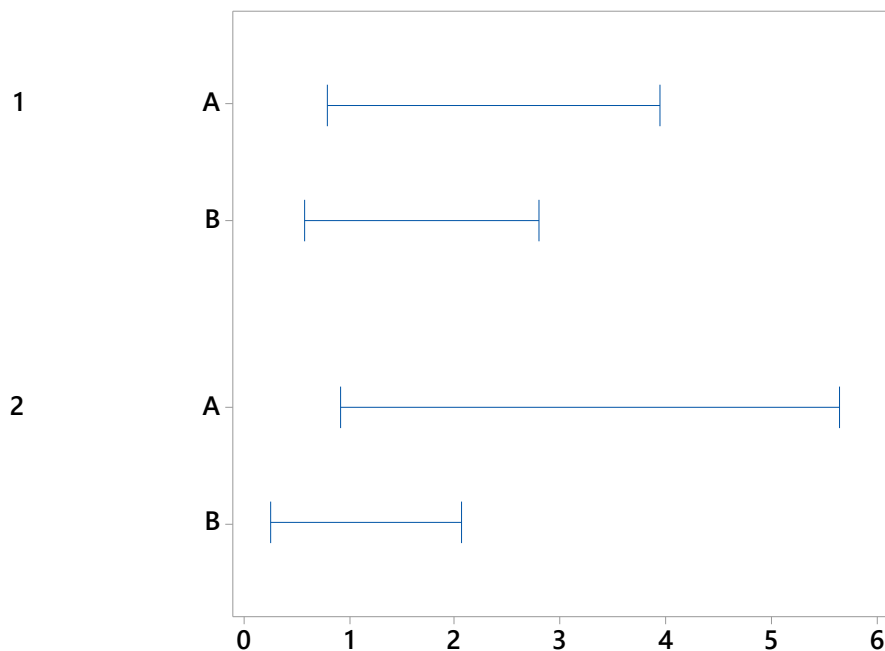
REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA



REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

Teste para Igualdade de Variâncias: Resultado versus Analista; Equipamento
Intervalos de comparação múltipla para o desvio padrão, $\alpha = 0,05$

Analista Equipamento

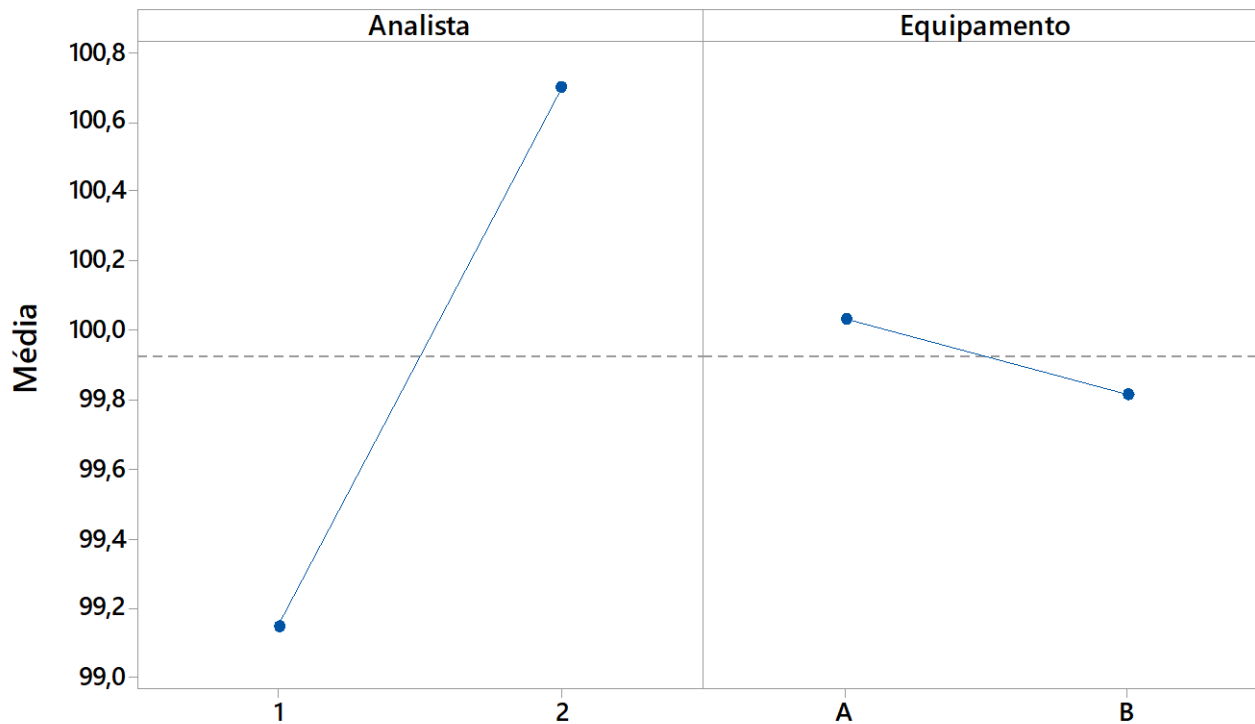


Comparações Múltiplas
Valor-p 0,431
Teste de Levene
Valor-p 0,742

Se os intervalos não se sobrepuserem, os desvios padrão correspondentes serão significativamente diferentes.

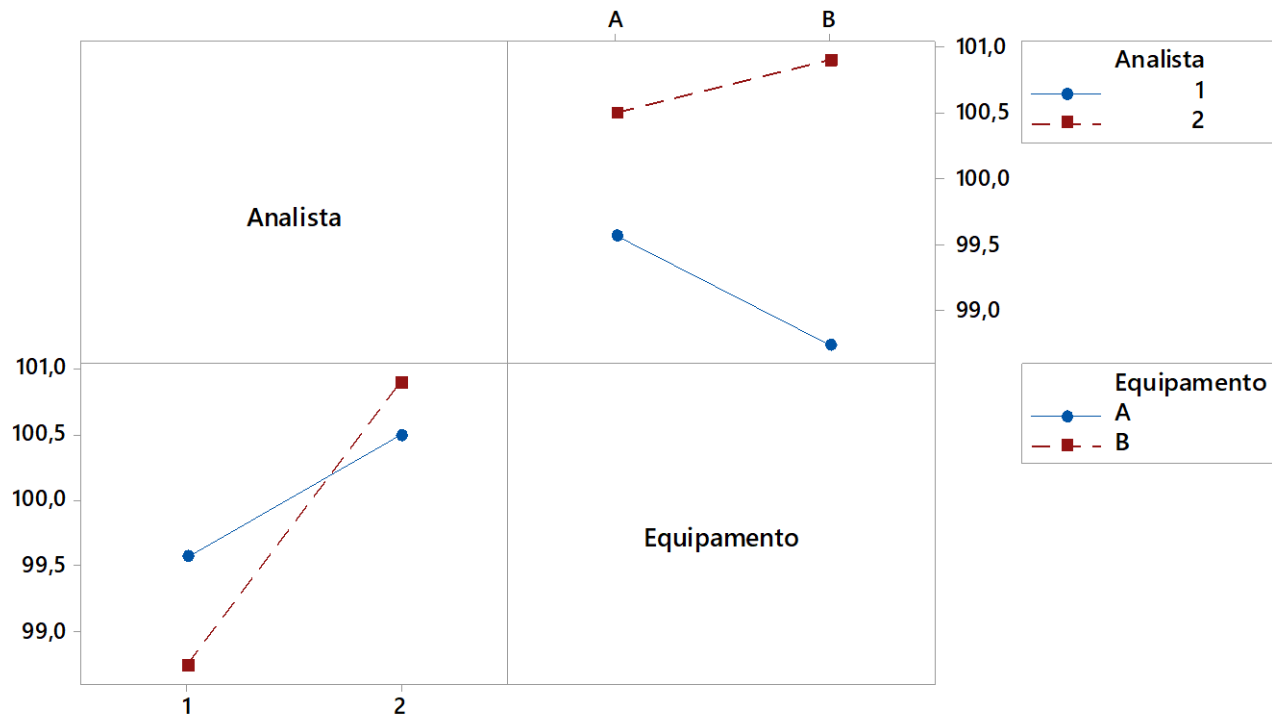
REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

Gráfico de Efeitos Principais para Resultado
Médias dos Dados

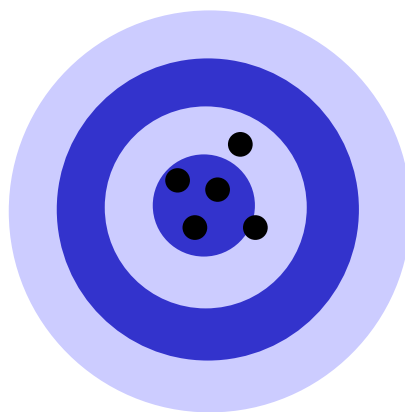


REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

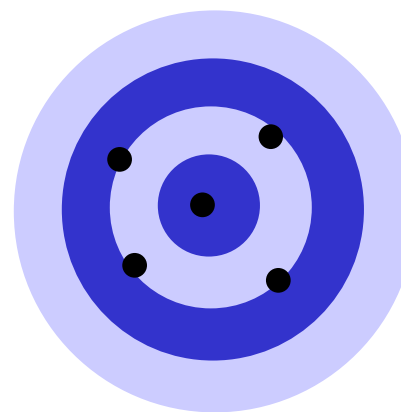
Gráfico de Interação para Resultado Médias dos Dados



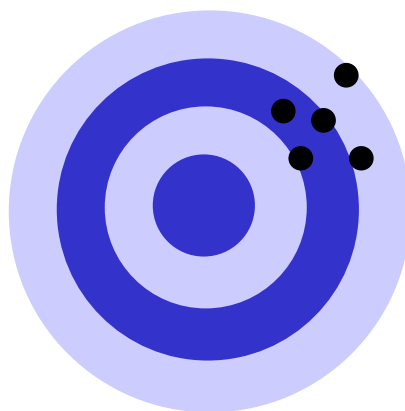
EXATIDÃO (ACURÁCIA) X PRECISÃO DO MÉTODO



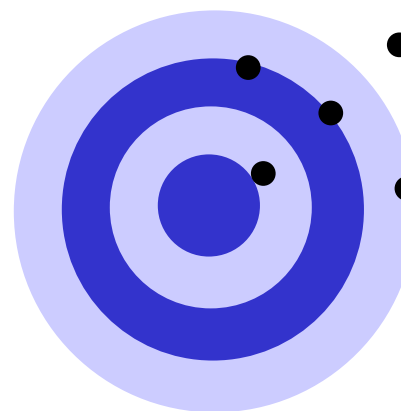
Exato
Preciso



Exato
Impreciso



Inexato
Preciso



Inexato
Impreciso

PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO



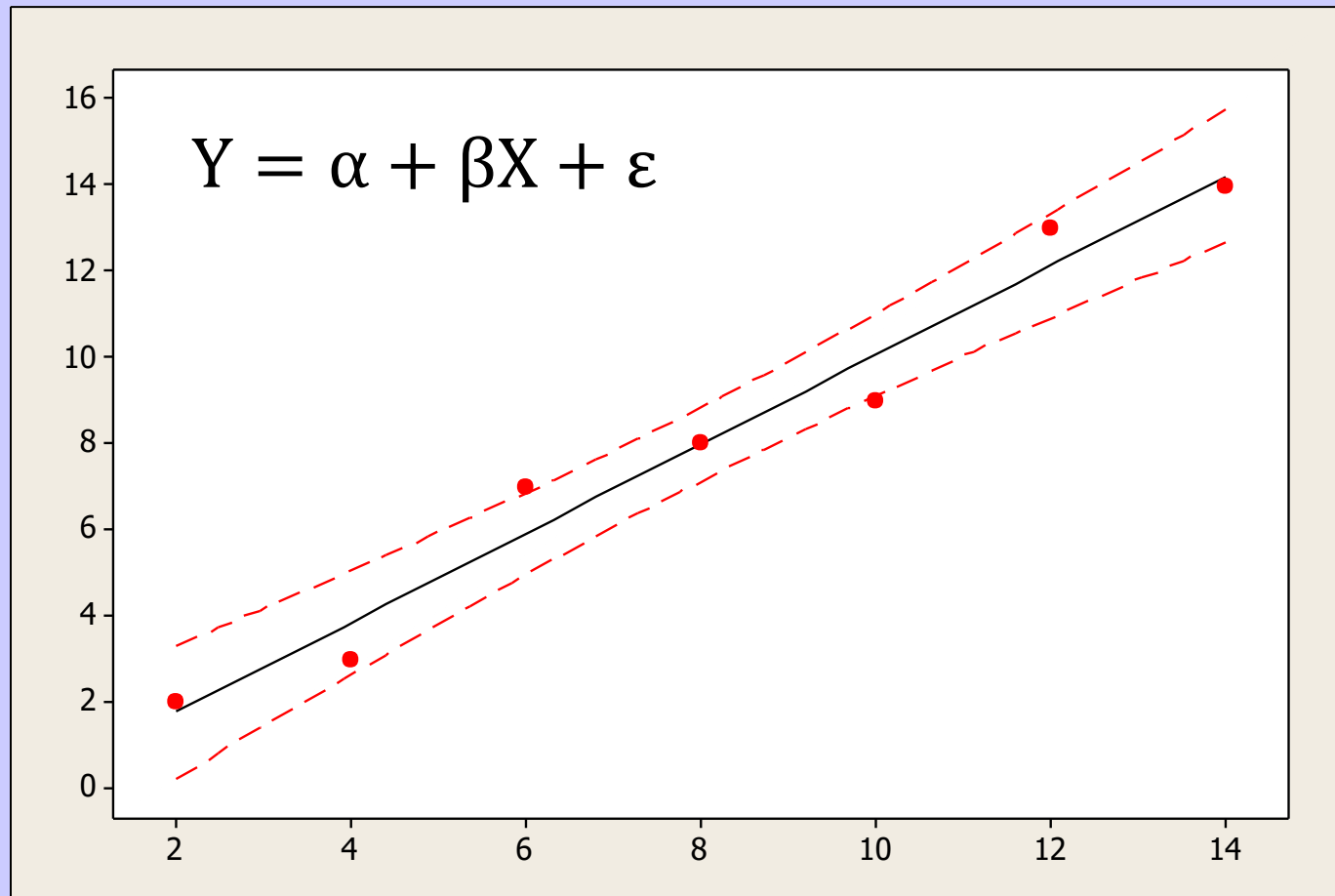
- Linearidade / Faixa linear
 - Capacidade do método de demonstrar que os resultados são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado

NOÇÕES DE REGRESSÃO?



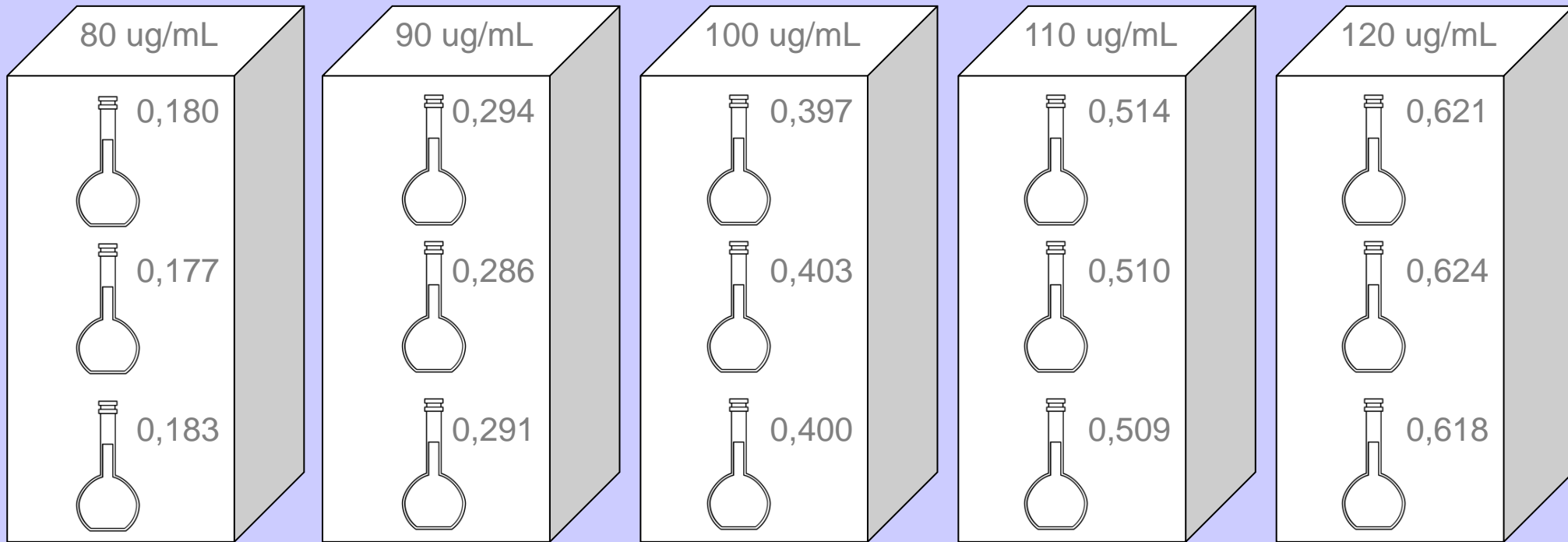
- Função de X que explica Y
- Método dos mínimos quadrados
- Regressão linear simples: $Y = a + bX$


REGRESSÃO LINEAR SIMPLES



Método dos mínimos quadrados

LINEARIDADE: REGRESSÃO LINEAR SIMPLES





LINEARIDADE: REGRESSÃO LINEAR SIMPLES

Minitab

→ Stat

→ Regressão

→ Gráfico de Linha Ajustada

→ Stat

→ Regressão

→ Regressão

→ Ajustar Modelo de Regressão

LINEARIDADE: REGRESSÃO LINEAR SIMPLES

Análise de Regressão: Resposta versus Concentração

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Regressão	1	0,364762	0,364762	46672,32	0,000
Concentração	1	0,364762	0,364762	46672,32	0,000
Erro	13	0,000102	0,000008		
Falta de ajuste	3	0,000001	0,000000	0,03	0,992
Erro puro	10	0,000101	0,000010	*	*
Total	14	0,364864			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,0027956	99,97%	99,97%	99,96%

Coefficientes

Termo	Coef	EP de Coef	Valor-T	Valor-P	VIF
Constante	-0,70220	0,00515	-136,22	0,000	
Concentração	0,011027	0,000051	216,04	0,000	1,00

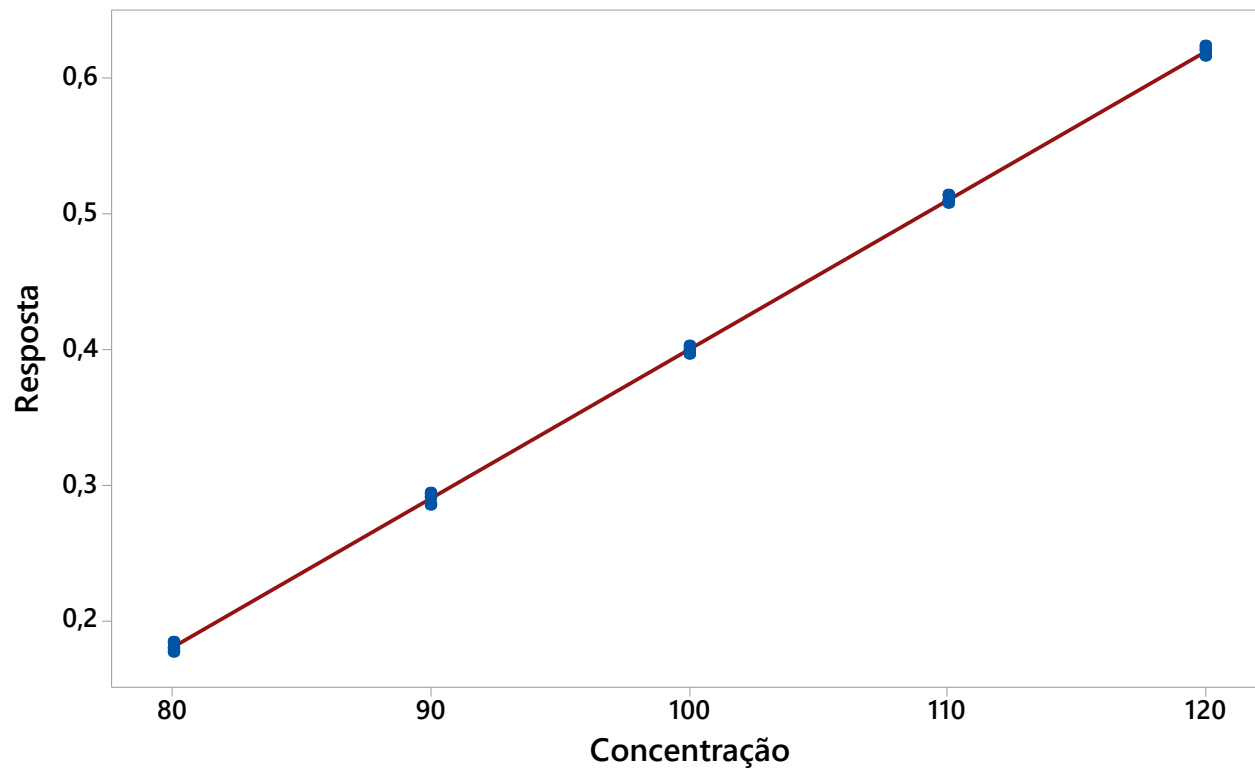
Equação de Regressão

Resposta = $-0,70220 + 0,011027$ Concentração

Gráficos de Resíduo de Resposta

LINEARIDADE: REGRESSÃO LINEAR SIMPLES

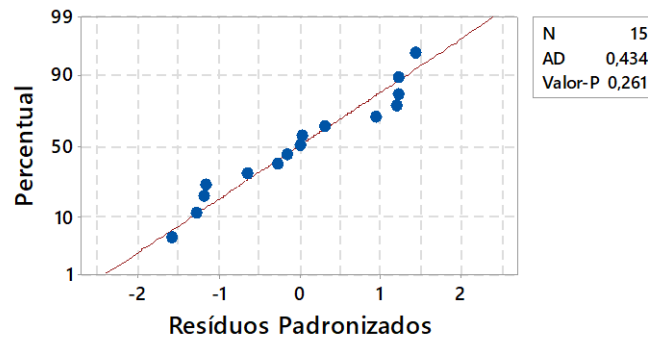
Gráfico de Dispersão de Resposta versus Concentração



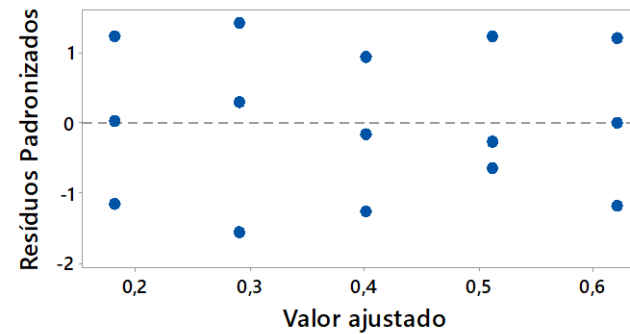
LINEARIDADE: REGRESSÃO LINEAR SIMPLES

Gráficos de Resíduo de Resposta

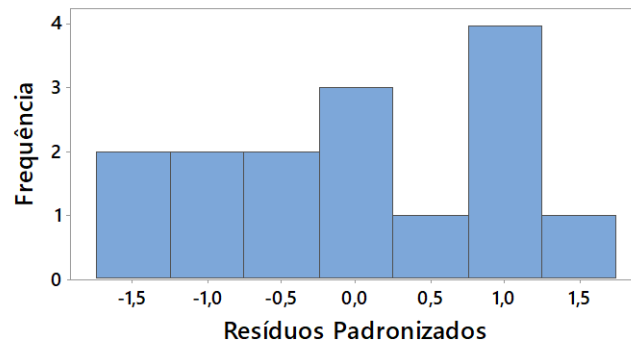
Gráfico de Probabilidade Normal



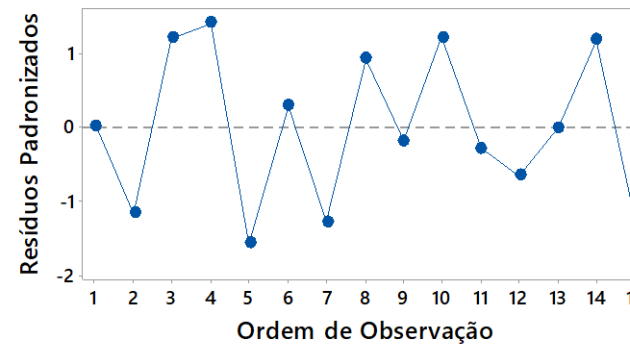
Versus Ajustados



Histograma

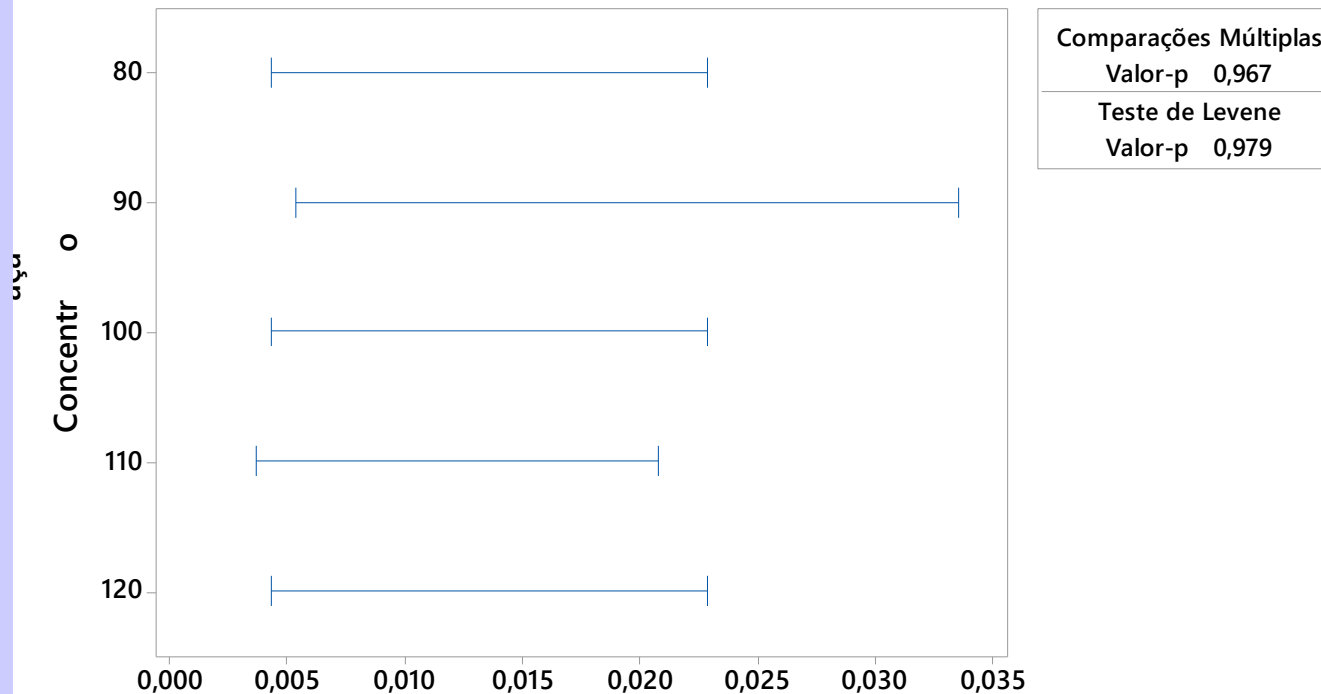


Versus Ordem



LINEARIDADE: REGRESSÃO LINEAR SIMPLES

Teste para Igualdade de Variâncias: Resposta versus Concentração
Intervalos de comparação múltipla para o desvio padrão, $\alpha = 0,05$



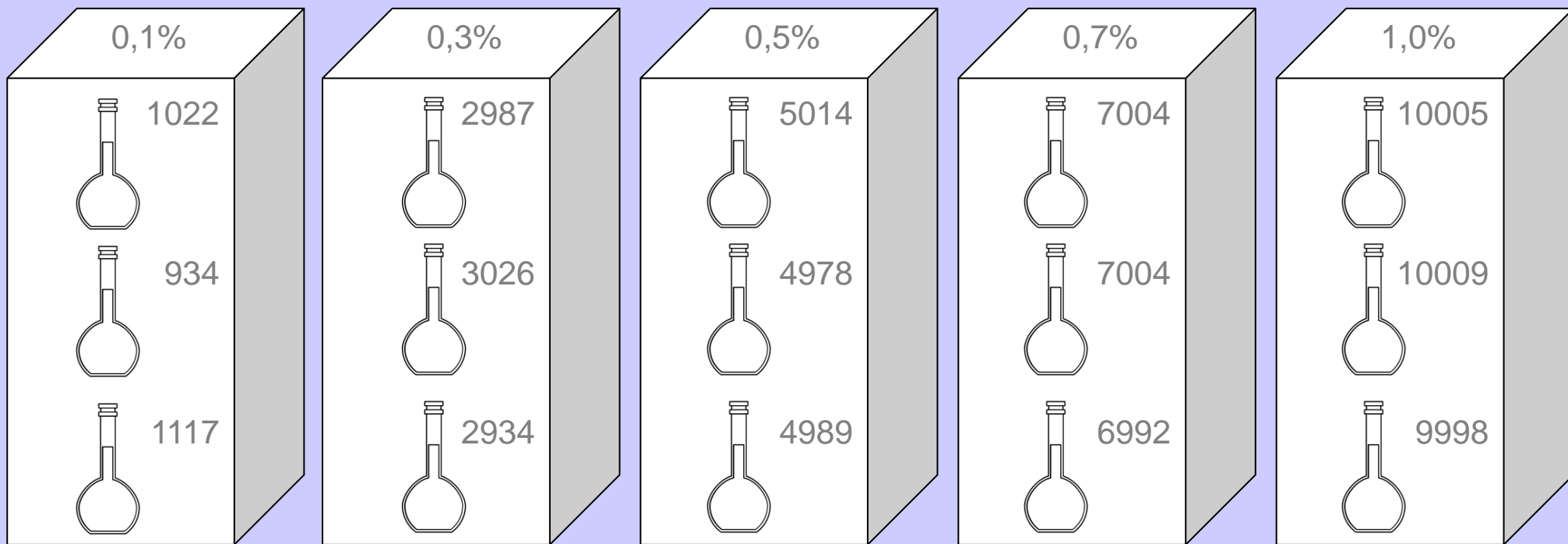
Se os intervalos não se sobrepuserem, os desvios padrão correspondentes serão significativamente diferentes.

PRESSUPOSIÇÕES BÁSICAS

A decorative header image featuring a 3D bar chart with bars in green, blue, and red, and a 3D pie chart with slices in green, blue, and red, set against a light blue background with a grid pattern.

1. Homocedasticidade
2. Independência dos dados
3. Distribuição normal

LINEARIDADE: REGRESSÃO LINEAR SIMPLES



LINEARIDADE: REGRESSÃO LINEAR SIMPLES

Análise de Regressão: Resposta versus Concentração

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Regressão	1	146142913	146142913	77189,93	0,000
Concentração	1	146142913	146142913	77189,93	0,000
Erro	13	24613	1893		
Falta de ajuste	3	2757	919	0,42	0,742
Erro puro	10	21856	2186	*	*
Total	14	146167526			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
43,5120	99,98%	99,98%	99,98%

Coefficientes

Termo	Coef	EP de		Valor-T	Valor-P	VIF
		Coef	Valor-T			
Constante	5,4	21,8	0,25	0,807		
Concentração	9991,2	36,0	277,83	0,000	1,00	

Equação de Regressão

Resposta = 5,4 + 9991,2 Concentração

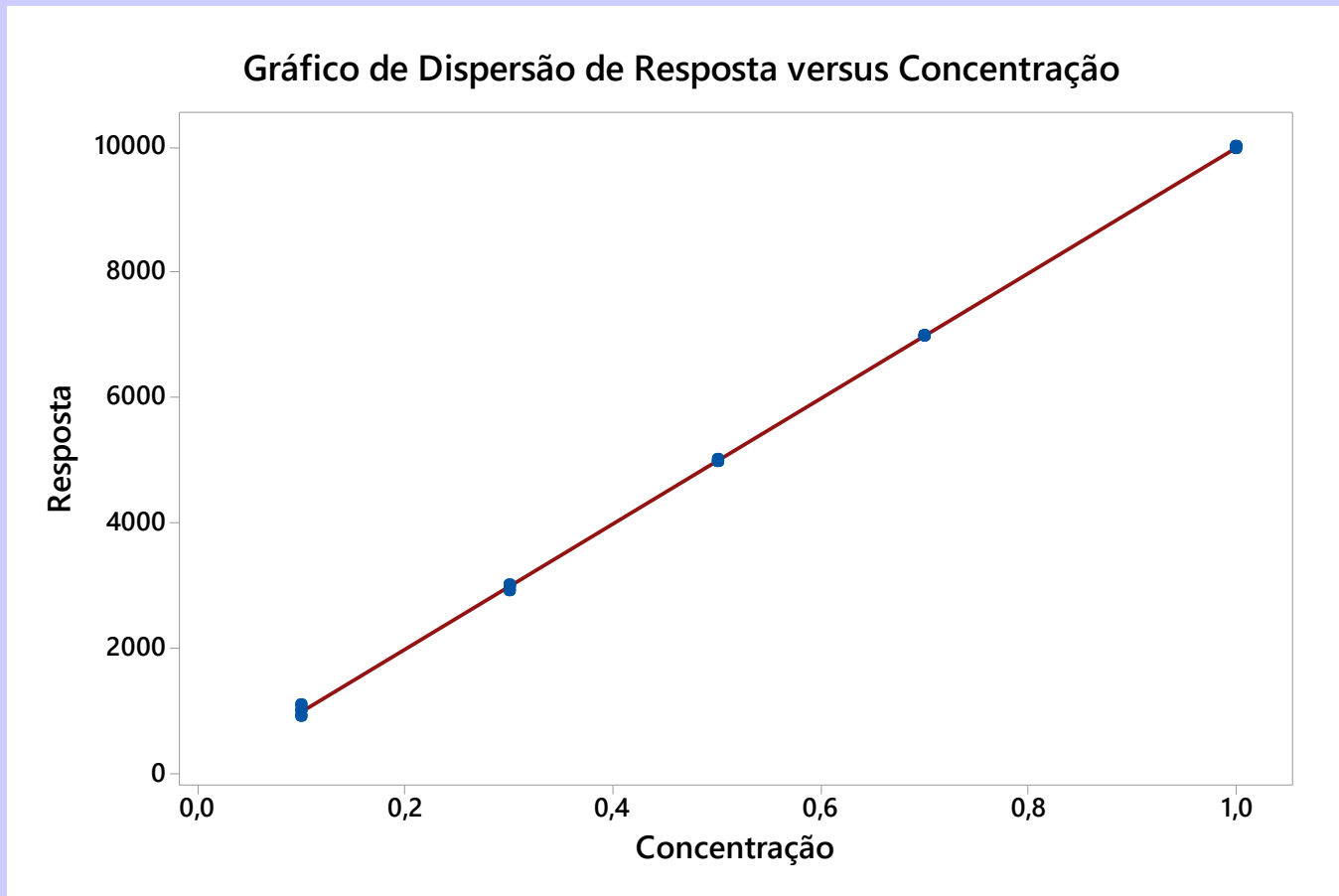
Ajustados e Diagnósticos para Observações Atípicas

Obs.	Resposta	Ajuste	Resíd	Resíd Pad	R
3	1117,0	1004,6	112,4	2,87	R

R Resíduo grande

Gráficos de Resíduo de Resposta

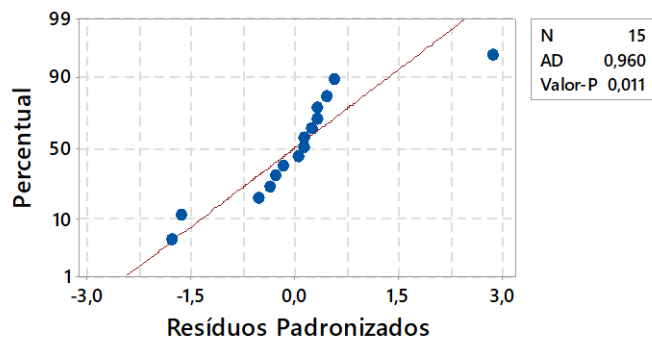
LINEARIDADE: REGRESSÃO LINEAR SIMPLES



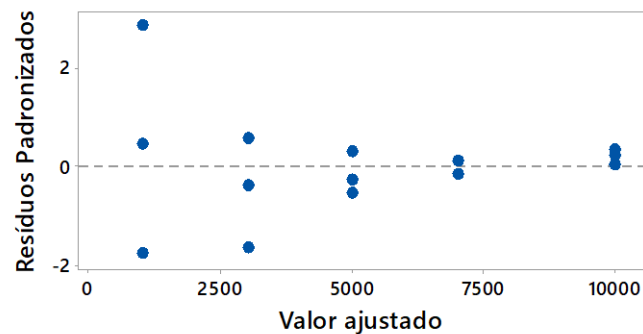
LINEARIDADE: REGRESSÃO LINEAR SIMPLES

Gráficos de Resíduo de Resposta

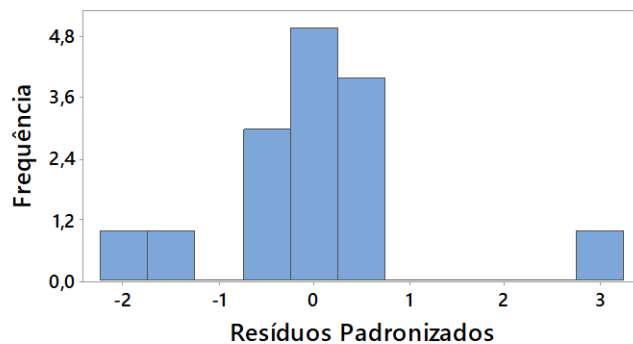
Gráfico de Probabilidade Normal



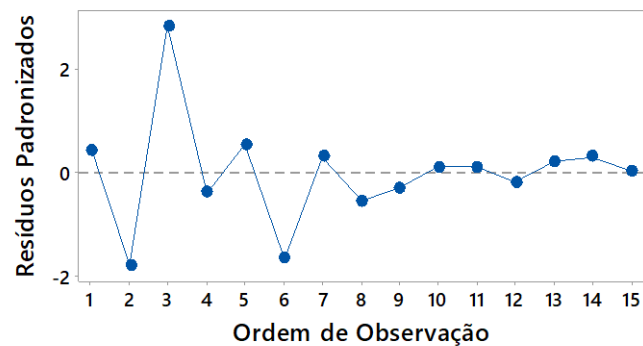
Versus Ajustados



Histograma

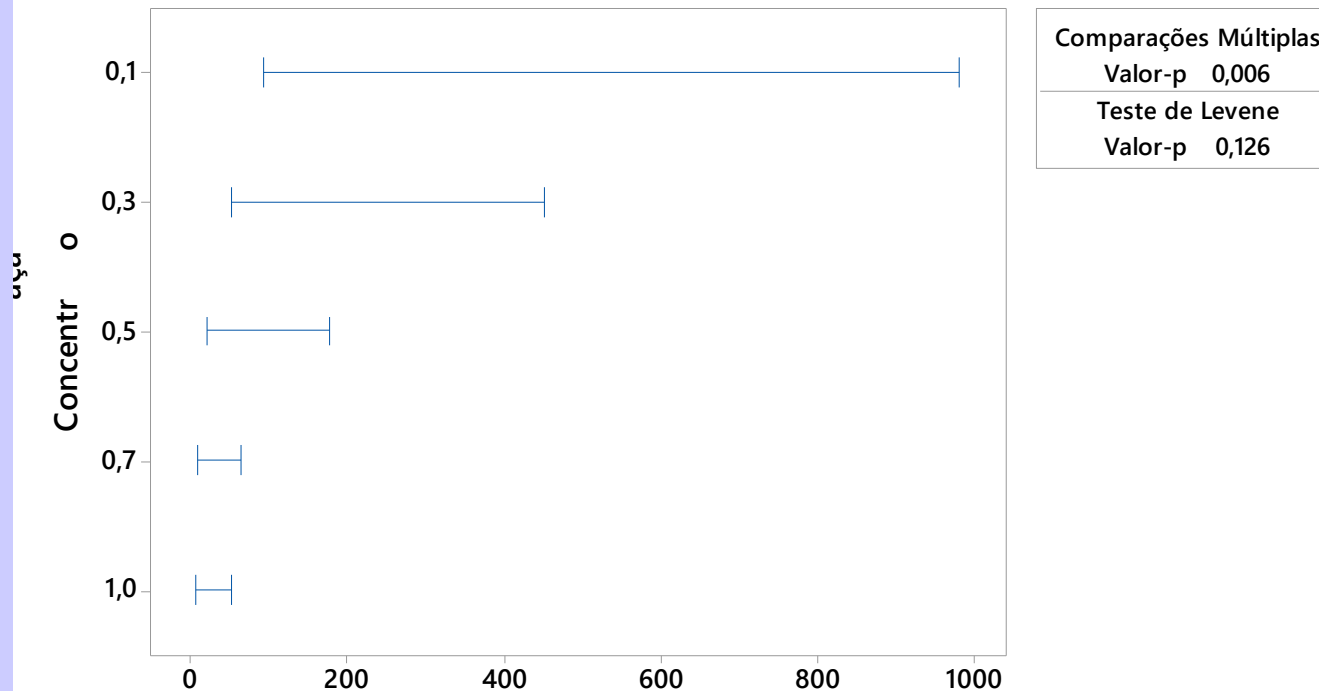


Versus Ordem



LINEARIDADE: REGRESSÃO LINEAR SIMPLES

Teste para Igualdade de Variâncias: Resposta versus Concentração
Intervalos de comparação múltipla para o desvio padrão, $\alpha = 0,05$



Se os intervalos não se sobrepuserem, os desvios padrão correspondentes serão significativamente diferentes.

REGRESSÃO POR MÍNIMOS QUADRADOS PONDERADOS

Pesos usualmente utilizados

$$\frac{1}{X}$$

$$\frac{1}{X^2}$$

$$\frac{1}{Y}$$

$$\frac{1}{Y^2}$$

$$\frac{1}{s^2}$$

$$\frac{1/s_i^2}{n \sum_i^n 1/s_i^2}$$

LINEARIDADE: REGRESSÃO LINEAR SIMPLES

Análise de Regressão: Resposta versus Concentração

Método

Pesos w

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Regressão	1	1872588	1872588	645869,91	0,000
Concentração	1	1872588	1872588	645869,91	0,000
Erro	13	38	3		
Falta de ajuste	3	2	1	0,22	0,878
Erro puro	10	35	4	*	*
Total	14	1872626			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
1,70274	100,00%	100,00%	100,00%

Coefficientes

Termo	Coef	EP de		Valor-T	Valor-P	VIF
		Coef	Coef			
Constante	-11,6	10,9	-1,06	0,308		
Concentração	10015,7	12,5	803,66	0,000	1,00	

Equação de Regressão

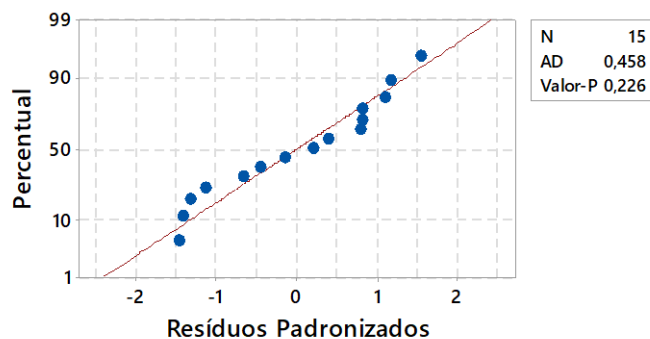
Resposta = -11,6 + 10015,7 Concentração

Gráficos de Resíduo de Resposta

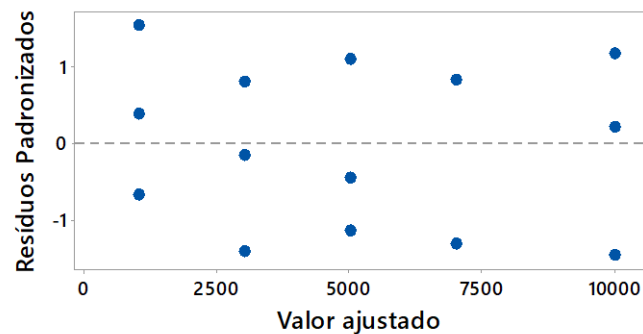
LINEARIDADE: REGRESSÃO LINEAR SIMPLES

Gráficos de Resíduo de Resposta

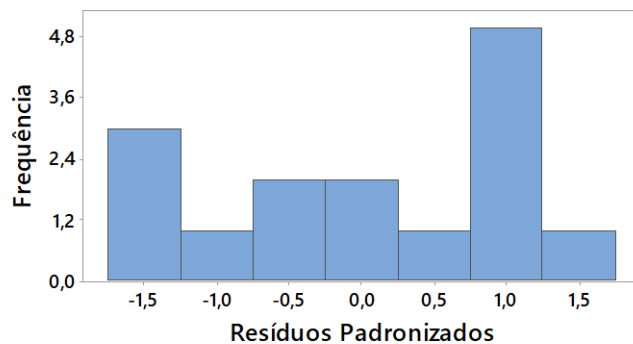
Gráfico de Probabilidade Normal



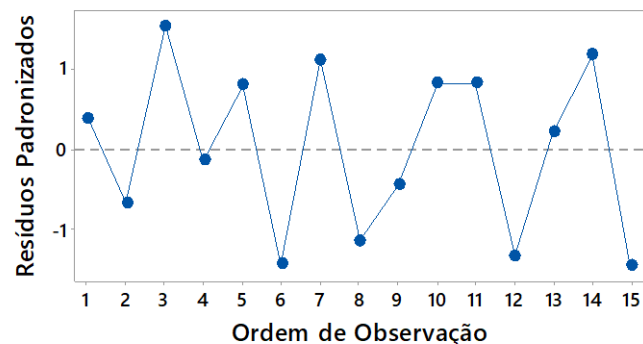
Versus Ajustados




Histograma



Versus Ordem

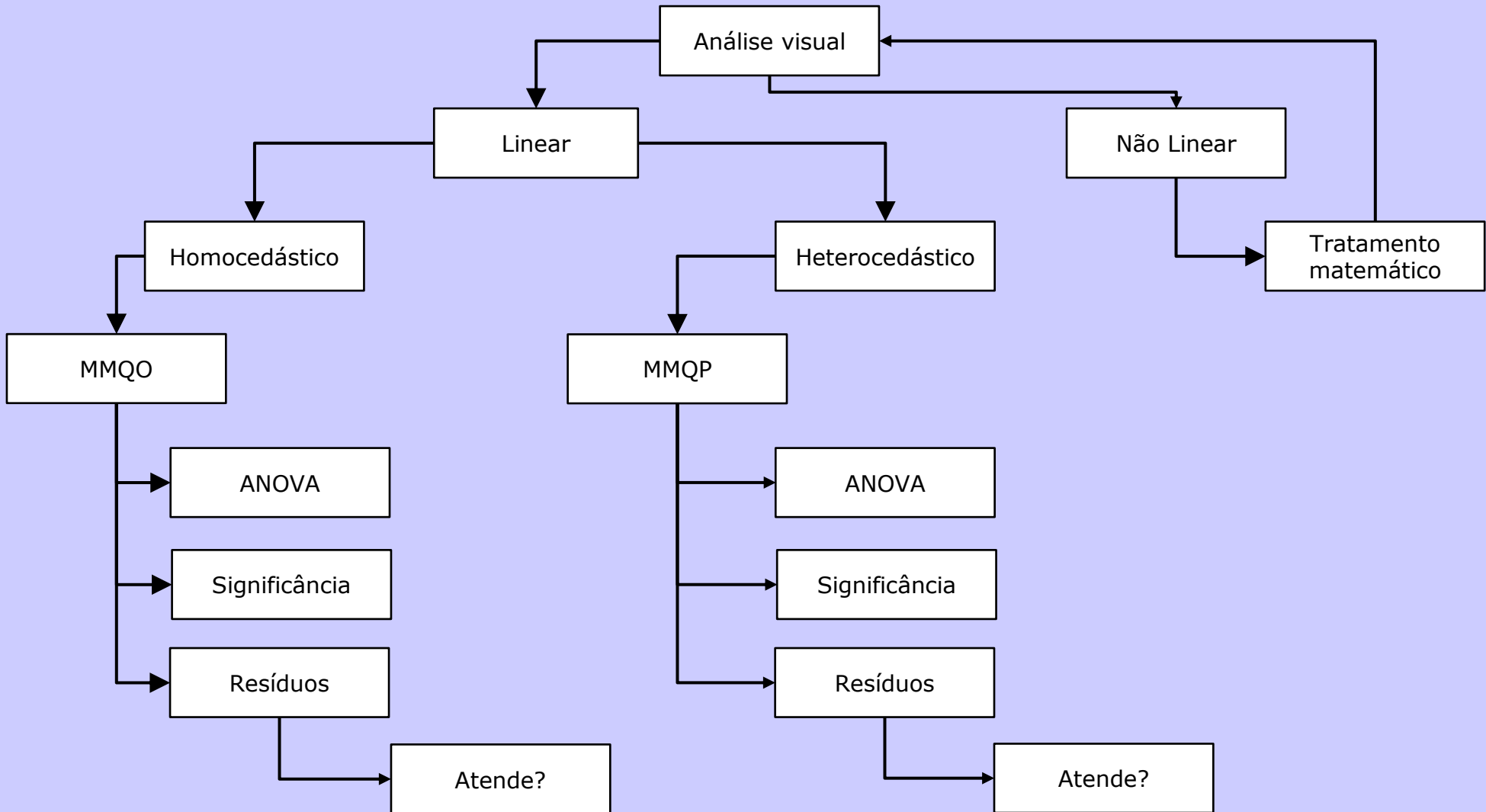


ADEQUAÇÃO DO AJUSTE LINEAR



1. Significância da regressão
2. Análise dos resíduos
3. Erro puro e falta de ajuste
4. Coeficiente de determinação (R^2)

REGRESSÃO POR MÍNIMOS QUADRADOS



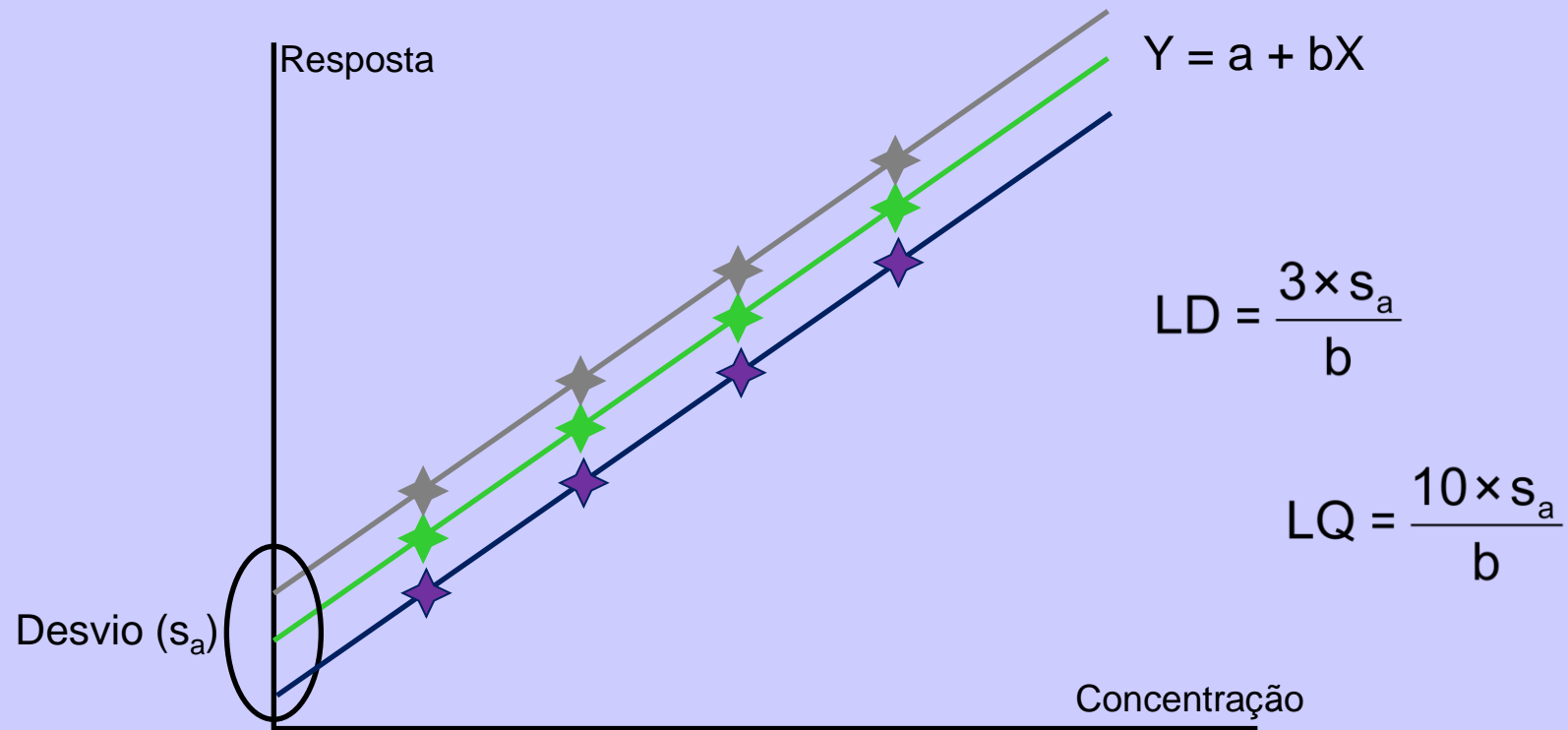
PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO



- Limite de Detecção / Quantificação
 - Detecção: menor quantidade de analito presente na amostra que pode ser detectada
 - Quantificação: menor quantidade de analito presente na amostra que pode ser quantificada

LIMITE DE DETECÇÃO

LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO



PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO

A decorative header image featuring a 3D bar chart with bars in green, blue, and red, set against a background of a computer keyboard.

- Robustez
 - É a medida de capacidade do método em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos.

ROBUSTEZ DO MÉTODO ANALÍTICO



Espectrofotometria	Cromatografia Líquida	Cromatografia Gasosa	Doseamento biológico
<ul style="list-style-type: none">✓Variação de pH✓Temperatura✓Diferentes fabricantes de solventes✓Variação do comprimento de onda	<ul style="list-style-type: none">✓Variação de pH da FM✓Variação da composição da FM✓Temperatura✓Diferentes colunas✓Fluxo da FM	<ul style="list-style-type: none">✓Temperatura✓Diferentes colunas✓Velocidade do gás de arraste✓Modo de injeção	<ul style="list-style-type: none">✓Variação de pH e composição do meio✓Temperatura e tempo de incubação✓Volume da camada inoculada✓Tipo e concentração do inóculo✓Pré-difusão / Pré-incubação

VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO



Nas condições otimizadas

- Especificidade/seletividade
- Linearidade
- Exatidão
- Precisão
- LD/LQ (quando aplicável)
- Faixa
- Robustez

Na região de operação do método (MODR)

- Exatidão
- Precisão

ESTRATÉGIAS DE CONTROLE



Devem ser estabelecidas considerando:

- O conhecimento obtido durante a etapa de desenvolvimento e validação (MODR);
- Pode incluir carta controle de parâmetros críticos (resolução entre picos, tempo de retenção, etc.);
- Garantia de boa relação entre o propósito do método e a sua performance (atendimento ao ATP).

MELHORIA CONÍNUA



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- BEIGUELMAN, B. Curso prático de bioestatística. Ribeirão Preto: Funpec Editora, 2002.
- CALLEGARI-JACQUES, S.M. Bioestatística: princípios e aplicações. Porto Alegre: Artmed, 2003.
- CAMPOS, M.S. Desvendando o Minitab. Rio de Janeiro: Qualitymark, 2003.
- CIENFUEGOS, F. Estatística aplicada ao laboratório. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2005.
- LEITE, F. Validação em análise química. 4ª Ed. Campinas: Editora Átomo, 2002.
- MONTGOMERY, D.C. Introdução ao controle estatístico da qualidade. 4ª Ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2004.
- NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 3ª Ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2007.
- PAGANO, M.; GAUVREAU, K. Princípios de bioestatística. São Paulo: Pioneira Thompson Learning, 2004.
- VIEIRA, S. Análise de variância (ANOVA). São Paulo: Atlas, 2006.
- VIEIRA, S. Bioestatística: tópicos avançados. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.
- VIEIRA, S. Introdução à bioestatística. 3ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 1980.



OBRIGADO!!!

Felipe R. Lourenço
feliperl@usp.br