

VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS: COMO FAZER? POR QUE ELA É IMPORTANTE?

Mary Ângela Fávaro Perez

A demonstração da qualidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem comprometer conclusões de estudos e conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação.

A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência.

Cada vez mais, empresas, artigos científicos e os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação de metodologias analíticas e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais com diretrizes a serem adotadas no processo de validação. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas de medição são adequados para o uso desejado.

Algumas definições sobre validações encontram-se a seguir:

“A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados” (ANVISA).

“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 Working Group).

“Confirmação por testes e apresentação de evidências objetivas de que determinados requisitos são preenchidos para um dado uso intencional” (ISO/IEC 17025).

A validação de métodos assegura a credibilidade destes durante o uso rotineiro, sendo algumas vezes mencionado como o “processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado para fazer” (USP).

“Avaliação sistemática de um procedimento analítico para demonstrar que está sob as condições nas quais deve ser aplicado” (WHO).

No âmbito geral de validação de métodos é possível distinguir dois tipos:

A *validação no laboratório*, que consiste em etapas de validação dentro de um único laboratório, seja para validar um método novo ou para verificar um método existente. A validação no laboratório é utilizada nas etapas preliminares do desenvolvimento de uma metodologia e na publicação de artigos para revistas científicas, em que são avaliadas todas as etapas de validação, sem verificar a reprodutibilidade.

A *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. Só assim a metodologia pode ser aceita como uma metodologia oficial para uma determinada aplicação.

Um método normalizado é aquele desenvolvido por um organismo de normalização ou outras organizações (por exemplo, ABNT, ASTM, ANSI ou APHA/AWWA/WEF), cujos métodos são aceitos pelo setor técnico em questão.

Um método não normalizado é aquele desenvolvido pelo próprio laboratório ou outras partes, ou adaptado a partir de métodos normalizados e validados. Por exemplo: métodos publicados em revistas técnicas, métodos de fabricantes de equipamentos, métodos utilizando conjuntos (*kits*) de ensaio, instrumentos portáteis, entre outros.

O laboratório deverá validar o método quando se tratar de um método não normalizado, criado/desenvolvido pelo próprio laboratório ou quando um método normalizado é usado fora do escopo para o qual foi concebido e também no caso de ampliação e modificação de método normalizado.

Todos os dados relevantes no estudo de validação de um método, como planejamento, experimentos e resultados obtidos, devem ser documentados e registrados de forma a possibilitar a rastreabilidade de todo o processo.

Documentações que registrem etapas da validação são necessárias também para fins de avaliação e podem ser exigidas por razões contratuais ou até mesmo por organismos regulamentadores.

Segundo o INMETRO (2010), depois de cumpridas todas as etapas do processo de validação, é importante elaborar o procedimento operacional de forma que o método possa ser implementado de maneira clara e sem ambigüidades.

É importante ressaltar que a validação não é gratuita, pelo contrário, custa caro, porém deve ser considerada um investimento e não uma despesa. Com o passar do tempo, seu custo pode ser zero. Como existe custo, faz-se validação por algum interesse, seja por exigência de clientes ou de fiscalização, para reduzir custos de reanálise. O certo é que, por sobrevivência ou por visão futura, a validação deve ser feita.

“Não ter validação é ter apenas um número, não um resultado”.

No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios: a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial).

Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, a Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003 e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de fevereiro/2010.

É importante esclarecer que *resoluções* são documentos com poder de lei, que devem ser obedecidas e *guias* são documentos que sugerem uma linha a ser seguida e são, portanto, abertos para interpretação. Os guias são recomendações e são intencionalmente vagos para deixar aos analistas a flexibilidade de adaptá-los de acordo com o método a ser usado.

As similaridades e diferenças entre o Inmetro e a Anvisa encontram-se na Tabela 1.

TABELA 1. Similaridades e diferenças entre o Inmetro e a Anvisa:

Inmetro	Anvisa
Seletividade	Especificidade e Seletividade
Faixa de trabalho e Faixa linear de trabalho	Intervalo
Linearidade - sensibilidade (inclinação da curva)	Linearidade
Limite de Detecção (LD)	Limite de Detecção (LD) (sensibilidade)
Limite de Quantificação (LQ)	Limite de Quantificação (LQ)
Tendência/Recuperação	Exatidão
Precisão	Precisão
Repetitividade	Repetibilidade (precisão intracorrida)
Precisão intermediária	Precisão intermediária (precisão intercorridas)
Reprodutibilidade	Reprodutibilidade (precisão interlaboratorial)
Robustez	Robustez

Seletividade (INMETRO) / Seletividade e Especificidade (ANVISA)*Inmetro*

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. Os interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal e a magnitude do efeito também pode depender da concentração.

Experimentos para avaliação da seletividade descritos na literatura sobre validação de métodos analíticos envolvem ensaios com padrões ou materiais de referência, amostras com e sem o analito, além da avaliação da capacidade de identificação do analito de interesse na presença de interferentes. Quando não há disponibilidade de interferentes, alguns autores sugerem a avaliação da habilidade de medição do analito por diferentes métodos, técnicas ou por meio de variações nas condições instrumentais.

Anvisa

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.

Para análise qualitativa (teste de identificação) é necessário demonstrar a capacidade de seleção do método entre compostos com estruturas relacionadas que podem estar presentes.

Em métodos cromatográficos, devem ser tomadas as precauções necessárias para garantir a pureza dos picos cromatográficos. A utilização de testes de pureza de pico (por exemplo, com auxílio de detector de arranjo de fotodiodos ou espectrometria de massas) é interessante para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente.

Faixa de trabalho e Faixa linear de trabalho (INMETRO) / Intervalo (ANVISA)*Inmetro*

A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado. A concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho.

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

Dentro da faixa de trabalho pode existir uma faixa de resposta linear e dentro desta, a resposta do sinal terá uma relação linear com o analito ou valor da propriedade.

Anvisa

O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método.

Linearidade*Inmetro*

Em geral, serão necessários vários níveis de concentração, no mínimo cinco, para construir a curva analítica. O número de replicatas em cada nível de concentração deve ser o mais próximo possível daquele empregado na rotina do laboratório.

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito e verificada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. Para tal, deve ser verificada a ausência de valores discrepantes para cada nível de concentração e a homocedasticidade dos dados, antes de fazer a regressão linear. A sensibilidade é a inclinação da curva analítica.

Anvisa

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.

Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes.

Se houver relação linear aparente após exame visual do gráfico, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. Se não houver relação linear, realizar transformação matemática. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser = 0,99.

Limite de Detecção

Inmetro

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito ou de uma propriedade, como por exemplo, análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método.

O limite de detecção para um procedimento analítico pode variar em função do tipo da amostra. É fundamental assegurar-se de que todas as etapas de processamento do método analítico sejam incluídas na determinação desse limite de detecção.

Para a validação de um método analítico, é normalmente suficiente fornecer uma indicação do nível em que a detecção do analito pode ser distinguida do sinal do branco/ruído.

É recomendado um mínimo de 7 replicatas para a determinação do LD.

Na Tabela 2 são apresentadas algumas metodologias para as medições quantitativas do limite de detecção.

TABELA 2. Metodologias para a determinação do Limite de Detecção segundo o INMETRO (2010).

Matriz	Determinação	Observações
Branco da amostra	$LD = X + t_{(n-1, 1-\alpha)} \cdot s$ sendo: X = média dos valores dos brancos da amostra; t é a abscissa da distribuição de Student, dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança e , s = desvio padrão amostral dos brancos da amostra.	A média e o desvio padrão dos brancos da amostra são dependentes da matriz. Válido somente quando os valores dos brancos apresentarem um desvio padrão amostral diferente de zero.
Ou		
Branco da amostra com adição da menor concentração aceitável do analito	$LD = 0 + t_{(n-1, 1-\alpha)} \cdot s$ sendo: t é a abscissa da distribuição de Student, dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança e , s = desvio padrão amostral dos brancos da amostra, com adição.	A “menor concentração aceitável” é aquela tida como a concentração mais baixa para a qual um grau aceitável de incerteza pode ser alcançado.

Anvisa

O limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. A sensibilidade é o limite de detecção do método analítico.

No caso de métodos não instrumentais (cromatografia em camada delgada, titulação, comparação de cor), esta determinação pode ser feita visualmente, onde o limite de detecção é o menor valor de concentração capaz de produzir o efeito esperado (mudança de cor, turvação, por exemplo).

Para métodos instrumentais como cromatográficos e absorção atômica, a estimativa do limite de detecção (LD) pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base ou pela equação a seguir:

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC}$$

Em que: DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação; IC é a inclinação da curva de calibração.

Limite de Quantificação

Inmetro

Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). Este limite, após ter sido determinado, deve ser testado com amostras independentes, para averiguar se a tendência e a precisão conseguidas são satisfatórias.

Na Tabela 3 são apresentadas algumas metodologias para as medições quantitativas do limite de quantificação.

TABELA 3. Metodologias para a determinação do Limite de Quantificação segundo o INMETRO (2010).

Matriz	Determinação
Branco da amostra	LQ = X + 5s ou LQ = X + 6s ou LQ = X + 10s, onde: X = média dos valores dos brancos s = desvio padrão amostral dos brancos
Branco com adição de concentrações variadas do analito, próximas ao LD	- Medir, uma vez cada replicatas independentes, a cada nível de concentração. - Calcular o desvio padrão amostral "s" do valor do analito, para cada concentração. - Fazer o gráfico "s" versus concentração e atribuir um valor para o LQ, por inspeção.

Anvisa

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

Pode ser determinado pela equação:

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC}$$

Em que: DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação; IC é a inclinação da curva de calibração.

O limite de quantificação também pode ser determinado por meio do ruído. Neste caso, determina-se o ruído da linha de base e considera-se como limite de quantificação aquela concentração que produza relação sinal-ruído superior a 10:1.

Tendência/Recuperação (INMETRO) / Exatidão (ANVISA)*Inmetro*

Os processos normalmente utilizados para avaliar a tendência de um método são, entre outros: uso de materiais de referência certificados (MRC), participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação.

A tendência, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos.

A tendência pode ser expressa como recuperação analítica, definida como:

$$Tendência = \frac{Valor\ observado\ x\ 100\ \%}{Valor\ esperado}$$

A exatidão é avaliada numericamente através da tendência.

Anvisa

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.

Várias metodologias para a determinação da exatidão estão disponíveis, como: padrões de referência¹, método de adição de padrão² e comparação de métodos (metodologia farmacopéica ou outro procedimento analítico validado).

A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra (Tabela 4), ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança.

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

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

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 pbb	40-120

¹Substância de pureza conhecida e/ou concentração conhecida.

²O método de adição padrão consiste na adição de quantidades conhecidas da substância de interesse que está sendo analisada a quantidades conhecidas da amostra, antes do seu preparo.

Precisão

Inmetro

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

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

$$CV = DPR = \frac{DP \times 100}{CMD}$$

Em que: DP é o desvio padrão e CMD é a concentração média determinada.

Anvisa

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis:

- Repetibilidade (precisão intracorrída)
- Precisão intermediária (precisão intercorrídas)
- Reprodutibilidade (precisão interlaboratorial)

A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas. O DPR é expresso pela mesma fórmula do Inmetro.

O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5%.

a) Repetitividade (INMETRO) / Repetibilidade (precisão intracorrída) (ANVISA)

Inmetro

As condições de repetitividade podem ser caracterizadas utilizando: **mesmo procedimento de medição, mesmo observador, mesmo instrumento usado sob mesmas condições, mesmo local e repetições no menor espaço de tempo possível.**

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

Anvisa

É a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação.

A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste.

b) Precisão intermediária (INMETRO) / Precisão intermediária (precisão intercorridas) (ANVISA)*Inmetro*

Refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como: **diferentes analistas, diferentes equipamentos e diferentes tempos**.

Esta medida de precisão representa a variabilidade dos resultados em um laboratório.

Anvisa

É a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em: **dias diferentes, com analistas diferentes e equipamentos diferentes**.

Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes.

c) Reprodutibilidade (INMETRO) / Reprodutibilidade (precisão interlaboratorial) (ANVISA)*Inmetro*

Embora a reprodutibilidade não seja um componente de validação de método executado por um único laboratório, é considerada importante quando um laboratório busca a verificação do desempenho dos seus métodos em relação aos dados de validação obtidos por meio de comparação interlaboratorial.

Variam-se: **analistas, equipamentos e laboratórios diferentes, período estendido**. O número de repetições dever igual ou maior que 7.

Anvisa

É a concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopéias. Estes dados não precisam ser apresentados para a concessão de registro.

Robustez*Inmetro*

Para determinar a robustez de um método de ensaio, pode-se recorrer ao teste de *Youden*. Trata-se de um teste que permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações. Convém salientar que quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança desse relacionamento à sua precisão.

Anvisa

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações para parâmetros analíticos. Constatando-se a susceptibilidade do método às variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento. Dependendo da análise empregada como espectrofotometria, cromatografia líquida ou gasosa a variação de alguns parâmetros podem resultar em variação na resposta do método.

Referências Bibliográficas

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n° 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF., 02 jun. 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 12 set. 2010.

INMETRO. Coordenação Geral de Acreditação. **DOQ-CGCRE-008**: orientação sobre validação de métodos analíticos. Rio de Janeiro, fev. 2010. 20 p. Revisão n° 03.

LEITE, Flávio. **Validação em análise química**. 5. ed. ampl. atual. Campinas, SP: Átomo, 2008. 357 p.

LUDWIG HUBER: **Validation of analytical methods and procedures**. Disponível em: <http://www.labcompliance.com/tutorial/methods/default.aspx#08_paramters>. Acesso em: 12 set. 2010.

RIBANI, M.; BOTTOLI, Carla B. G.; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel C. S. F.; MELO, Lúcio F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.