

GUIA DE Validação e Controle de Qualidade Analítica

*Fármacos em Produtos
para Alimentação Animal e
Medicamentos Veterinários*

CGAL/SDA

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Secretaria de Defesa Agropecuária

Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica

Fármacos em Produtos para Alimentação
Animal e Medicamentos Veterinários

MISSÃO
Ministério da Agricultura

Promover o desenvolvimento sustentável
e a competitividade do agronegócio em
benefício da sociedade brasileira

Brasília - DF

© 2011 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
Todos os direitos reservados. Permitida a reprodução desde que citada a fonte.
A responsabilidade pelos direitos autorais de textos e imagens desta obra é do autor.

Tiragem: 1.100
1ª edição - Ano 2011

Elaboração, distribuição e informações:
MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

Secretaria de Defesa Agropecuária - SDA
Coordenação Geral de Apoio Laboratorial - CGAL
Esplanada dos Ministérios, Bloco D, Anexo B, sala 440
CEP 70043-900 - Brasília - DF
Telefones: (61) 3218-2535

www.agricultura.gov.br
E-mail: cgal@agricultura.gov.br
Central de Relacionamento: 0800 704 1995

Equipe Técnica do Projeto:

Coordenação: Angelo de Queiroz Maurício

Concepção e Desenvolvimento Marcelo Cláudio Pereira

Consultoria e Revisão Técnico-Científica: Welington Ferreira de Magalhães (UFMG),

Contribuição: Luiza Cristina Albuquerque Cazarim

Apoio: Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários
Coordenação Editorial: Assessoria de Comunicação Social

Impresso no Brasil/Printed in Brazil

Catálogo na Fonte
Biblioteca Nacional de Agricultura – BINAGRI

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
Guia de validação e controle de qualidade analítica : fármacos em produtos
para alimentação e medicamentos veterinários / Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília :
Mapa/ACS, 2011.
72 p.

ISBN 978-85-7991-053-1

1. Alimentação animal. 2. Medicamento. 3. Controle de qualidade. 4.
Análise química. I. Secretaria de Defesa Agropecuária. II. Título. III. Título:
Fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários.

AGRIS Q55, L70
CDU 636.084.41

SUMÁRIO

1. Introdução	7
2. Validação	10
3. Plano Mestre de Validação	10
4. Revalidação do Procedimento Analítico	13
5. Classificação dos Ensaio Segundo sua Finalidade e Parâmetros Mínimos que devem ser avaliados de acordo com a Categoria do Ensaio Analítico	14
6. Parâmetros de desempenhos e Critérios de Aceitação	17
6.1 Seletividade	17
6.1.1 Procedimento de determinação da Seletividade	17
6.2 Efeito Matriz	20
6.2.1 Procedimento de determinação de Efeito Matriz	20
6.2.2 Avaliação do Efeito Matriz	22
6.2.3 Critérios de aceitação do Efeito Matriz	27
6.3 Linearidade (Curva de Calibração)	27

6.3.1 Procedimento de determinação da Linearidade	28
6.3.2 Critérios de Aceitação da Linearidade	29
6.4 Precisão	31
6.4.1 Procedimento de Determinação da Repetitividade	32
6.4.2 Procedimento de Determinação da Reprodutibilidade Intermediária ou Reprodutibilidade Intralaboratorial	33
6.4.3 Critérios de aceitação da Precisão	35
6.5 Limite de Detecção	37
6.6 Limite de Quantificação	38
6.6.1 Procedimento de Determinação do Limite de Quantificação	38
6.7 Veracidade/Recuperação	38
6.7.1 Determinação da Veracidade/Recuperação	40
6.7.2 Critérios de aceitação da Veracidade/Recuperação	44
6.8 Robustez	45
6.8.1 Procedimento da determinação da Robustez	46
6.9 Estudo de Estabilidade	49
6.9.1 Estabilidade dos Analitos nas Amostras	50

6.9.2 Estabilidade dos Analitos nas Soluções Padrão	51
7 Incerteza de Medição	52
7.1 Determinação da Incerteza Padrão Combinada e da Incerteza Expandida	53
7.2 Reportando a Incerteza Expandida	64
8. Verificação de Desempenho de Procedimentos Normalizados (Farmacopéicos e Outros Aceitos Oficialmente pelo MAPA)	65
8.1 Aplicação e Requisitos Mínimos	65
9. Rotina Analítica: Curvas de Calibração e Amostras de Controle de Qualidade (ACQs)	66
10. Expressão do Resultado Final	68
11. Referências Bibliográficas	70



1. Introdução


O objetivo deste Guia é estabelecer os parâmetros de desempenho e os requisitos de aceitação mínimos que devem ser atendidos para que um determinado procedimento analítico seja considerado validado. Neste documento também são apresentados procedimentos mínimos de controle da qualidade, que devem ser observados durante a rotina analítica.

Desenvolvido para ser utilizado como uma referência normativa sucinta e prática, este Guia é direcionado à validação de procedimentos analíticos destinados ao: controle de qualidade de medicamentos veterinários; controle de qualidade de fármacos em produtos para alimentação animal (utilizados como veículo na administração de medicamentos) e para a determinação de fármacos como contaminantes em rações (monitoramento de contaminação

cruzada). No entanto, considerando a abordagem abrangente utilizada neste Guia, nada impede que este seja aplicado também a procedimentos destinados à determinação de pureza de farmoquímicos e aos estudos de depleção de resíduos em matrizes de origem animal.

Devido ao fato de ser um documento sucinto, pode ser que o profissional que esteja trabalhando com este Guia sinta necessidade de maiores esclarecimentos sobre alguns tópicos abordados. Neste caso, recomendamos que as dúvidas sejam dirimidas por intermédio do Manual de Garantia da Qualidade Analítica, que é um documento elaborado de forma mais pormenorizada e consonante com os requisitos estabelecidos neste documento.

Elaborado para ser seguido obrigatoriamente pelos laboratórios da Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários, que atuam na área de Medicamentos Veterinários e Produtos Afins, este Guia também é uma ferramenta útil aos



laboratórios de controle de qualidade da indústria farmacêutica veterinária, uma vez que estabelece os parâmetros de desempenho e os critérios de aceitação que serão aplicados aos procedimentos analíticos pelos quais os produtos veterinários serão analiticamente monitorados (análise fiscal).

Alterações nos procedimentos, parâmetros e critérios estabelecidos poderão ser necessários devido à especificidade de determinados procedimentos analíticos ou peculiaridades do laboratório. Nestes casos, modificações poderão ser consideradas desde que sejam adequadamente justificadas, garantindo sua consistência científica e conceitual com os princípios deste Guia e o não comprometimento da rastreabilidade, da comparabilidade e da confiabilidade dos resultados analíticos gerados.


2. Validação

A validação de determinado procedimento analítico objetiva demonstrar que o mesmo é adequado aos objetivos propostos, ou seja, que os parâmetros de desempenho avaliados atendem aos critérios de aceitação preconizados. Trata-se de um estudo experimental e integralmente documentado.

A validação visa garantir a qualidade metrológica dos resultados analíticos, conferindo-lhes rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade para a tomada de decisões.

3. Plano Mestre de Validação

A validação de procedimento analítico deve ser demonstrada por intermédio de ensaios de laboratório com padrões e amostras similares ou idênticas aos produtos que serão analisados rotineiramente.




Para o planejamento e a execução da validação de um procedimento analítico deve-se, primeiramente, classificá-lo em uma das categorias elencadas na Tabela 1.

Em seguida, usando a Tabela 2, os parâmetros mínimos de desempenho analítico que serão estudados devem ser determinados, conforme a categoria atribuída ao ensaio analítico.

O planejamento, a preparação e a execução da validação devem seguir protocolos detalhados, devendo o laboratório manter os seguintes documentos e registros:

1. Plano de estudo para a validação, o qual deve contemplar os seguintes elementos:
 - a. Finalidade e âmbito de aplicação;
 - b. Responsável técnico do projeto;
 - c. Pessoal técnico envolvido e suas respectivas responsabilidades;

- d. Identificação das Unidades, equipamentos/instrumentos utilizados;
 - e. Procedimento Operacional Padrão (POP) de validação aplicável;
 - f. Parâmetros de desempenho a serem estudados e seus respectivos critérios de aceitação;
2. Experimentos de pré-validação (desenvolvimento e a otimização de um procedimento analítico);
 3. Experimento de validação;
 4. Características de desempenho dos equipamentos/instrumentos;
 5. Qualificação dos materiais (padrões, reagentes, amostras, alíquotas, entre outros);
 6. Dados (registros) e conclusão da pré-validação;
 7. Dados (registros) e conclusão da validação;

- 
8. POP para a execução do procedimento analítico na rotina;
 9. Relatório Final de Validação.

4. Revalidação do Procedimento Analítico

O procedimento analítico deve ser revalidado nos seguintes casos:

- Mudanças na composição do produto acabado, que possam interferir na resposta do procedimento analítico;
- Alterações nos procedimentos analíticos e/ou especificações dos insumos/equipamentos/instrumentos.

5. Classificação dos Ensaio segundo sua Finalidade e Parâmetros Mínimos que devem ser avaliados de acordo com a Categoria do Ensaio Analítico.

Nas tabelas abaixo, os ensaios físico-químicos foram agrupados em categorias distintas e, posteriormente, para cada categoria são indicados os parâmetros mínimos de desempenho que devem ser avaliados durante a validação do procedimento analítico.

Tabela 1

Classificação dos ensaios segundo sua finalidade

Categoria	Finalidade do Teste
I	Testes quali-quantitativos para a determinação do princípio ativo em medicamentos veterinários, matérias-primas, produtos para alimentação animal e matrizes de origem biológicas.
II	Testes quali-quantitativos para a determinação de impurezas e produtos de degradação em medicamentos veterinários e matérias-primas e ensaios limite.
III	Testes de desempenho (e.g.: dureza, friabilidade, viscosidade).
IV	Testes de identificação para ingrediente ativo (e.g.: identificação de substância por espectroscopia no infravermelho).
V	Testes quali-quantitativos para determinação de traços de fármacos em ração (contaminação cruzada).

Tabela 2

Parâmetros que devem ser estudados na validação do procedimento analítico, de acordo com sua finalidade e categoria

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV	Categoria V
		Quali-Quantitativo	Ensaio Limite			
Seletividade	Sim	Sim	Sim	*	Sim	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não	Sim
Precisão	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim
Limite de Detecção	*	Não	Sim	*	Sim	Sim
Limite de Quantificação	*	Sim	Não	*	Não	Sim
Veracidade/Recuperação	Sim	Sim	*	*	Não	Sim
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim

* Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.



6. Parâmetros de Desempenho e Critérios de Aceitação

6.1 Seletividade

Seletividade é a propriedade de um sistema de medição, utilizado com um procedimento de medição especificado, segundo a qual o sistema fornece valores medidos para um ou vários mensurandos, tal que os valores de cada mensurando sejam independentes uns dos outros ou de outras grandezas associadas ao fenômeno, corpo ou substância em estudo.


6.1.1 Procedimentos de Determinação da Seletividade

Os procedimentos utilizados para demonstrar a seletividade vão depender do objetivo desejado da análise. Em geral, a verificação da seletividade do procedimento analítico deve ser realizada a partir da comparação entre

os sinais (resposta instrumental) advindos da leitura da amostra processada e do analito de interesse, em solução aquosa ou orgânica.

Para análise qualitativa (teste de identificação) é necessário demonstrar a capacidade de seleção entre compostos com estruturas relacionadas, que podem estar presentes. Isto deve ser confirmado pela obtenção de resultados positivos (preferivelmente em relação à material de referência conhecido) em amostras contendo o analito, comparativamente com resultados negativos obtidos com amostras que não contém o analito, mas sim compostos estruturalmente semelhantes.

Para análise quantitativa (teor) e análise de impurezas, a seletividade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras (fármaco ou medicamento) contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado



por esses materiais. Quando a impureza ou o padrão do produto de degradação não estiverem disponíveis, pode-se comparar os resultados do teste das amostras contendo impurezas ou produtos de degradação com os resultados de um segundo procedimento bem caracterizado (por exemplo metodologia farmacopeica ou outro procedimento validado). Estas comparações devem incluir amostras armazenadas sob condições de estresse (por ex. luz, calor umidade, hidrólise ácida/básica, oxidação).

Em procedimentos cromatográficos, deve-se tomar as precauções necessárias para garantir a resolução, adequada separação (pureza) dos picos cromatográficos. A utilização de testes de resolução 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.


6.2 Efeito Matriz

Efeito Matriz é um estudo de seletividade que objetiva averiguar possíveis interferências causadas pelas substâncias que compõem a matriz amostral gerando, basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal instrumental ou resposta instrumental.

O estudo de efeito matriz é imprescindível quando se deseja trabalhar com uma curva de calibração do analito em solvente, ou seja, com uma curva de calibração não matrizada.

6.2.1 Procedimento de determinação do Efeito Matriz:

Preparar uma curva de calibração do analito puro em solvente (CCAS) com no mínimo 5 níveis I de concentração ($I \geq 5$);



Analisar, usando a CCAS, amostras elaboradas no mínimo em 3 níveis de fortificação. Um mínimo J de 6 réplicas ($J \geq 6$) por nível de fortificação de:

- a. Analito em solvente puro (amostra não matrizada);
- b. Analito em extrato da matriz branca (amostra matrizada).

Após as análises replicadas dessas fortificações, realizadas usando a CCAS, proceder à avaliação dos resultados das concentrações do analito obtidas nas fortificações analisadas como indicado.

Caso o laboratório não disponha de amostras brancas para a obtenção do extrato da matriz branca, procedimentos alternativos poderão ser usados para a determinação do efeito matriz (e.g.: determinação da concentração do analito pelo método de adição-padrão versus a determinação da concentração do analito utili-


zando curva de calibração em solvente puro). Entretanto, a curva de adição-padrão deverá conter no mínimo cinco níveis de concentração e o número de replicatas por nível deverá ser, no mínimo, igual a seis réplicas independentes.

Uma vez identificada a presença de efeito matriz, o método de adição-padrão deve ser empregado.

6.2.2 Avaliação do Efeito Matriz

Utilizando os dados obtidos dos experimentos, usando a CCAS, de análise do analito em solvente e dos extratos de matriz fortificados, deve-se aplicar o teste F (Fischer-Snedecor), de homogeneidade de variâncias, para verificar se as variâncias das amostras não-matrizadas e matrizadas podem ser consideradas estatisticamente iguais, em cada nível i de fortificação.

Para tanto, aplica-se os seguintes cálculos para cada nível i de concentração (fortificação) comparando-se amostras não-matrizadas com aquelas matrizadas:


$$F_{calc,i} = \frac{s_{i1}^2}{s_{i2}^2} \quad (\text{Equação 01})$$

Onde:

$s_{i,1}^2$ e $s_{i,2}^2$ são as variâncias das replicatas das amostras não-matrizadas e matrizadas, em cada nível de concentração, com a maior variância no numerador.

Uma vez calculado o F , deve-se obter o valor crítico tabelado de $F_{crit, \alpha, \nu_{i1}, \nu_{i2}}$, com $\nu_{i,1} = n_{i,1} - 1 \geq 5$ graus de liberdade no numerador e $\nu_{i,2} = n_{i,2} - 1 \geq 5$ graus de liberdade no denominador. Adotar um nível de significância $\alpha = 0,05$ (5%) ou nível de confiança $1 - \alpha = 0,95$ (95%).

Se em um dado nível de concentração i o valor de $F_{calc,i}$ for menor que o $F_{crit, \alpha, \nu_{i1}, \nu_{i2}}$, as variâncias desse nível

de concentração podem ser consideradas iguais, ou seja, a matriz não tem efeito importante sobre a precisão do procedimento nesse nível de fortificação i considerado. Neste caso, os desvios-padrão desses dois grupos de análises podem ser agrupados e a igualdade das médias dos dois conjuntos de amostras pode ser testada com a distribuição t de Student: comparação das médias de concentração do nível i .

Desse modo, calculam-se:

1. $\bar{x}_{i,1}$ e $\bar{x}_{i,2}$ = médias das concentrações do analito em amostras “com matriz” (extrato matriz fortificado) e “sem matriz” (analito puro em solvente puro), respectivamente, em cada nível de concentração (fortificação);
2. $s_{i,1}$ e $s_{i,2}$ = desvios-padrão das concentrações do analito no i -ésimo nível de fortificação;
3. O valor da estatística $t_{\text{calc},i}$:

$$t_{calc,i} = \frac{|\bar{x}_{i,1} - \bar{x}_{i,2}|}{\sqrt{s^2 \left(\frac{1}{n_{i,1}} + \frac{1}{n_{i,2}} \right)}} \quad (\text{Equação 02})$$

Onde:

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)} \quad (\text{Equação 03})$$

Sendo: n_1 e n_2 são os números de replicatas nas amostras 1 e 2 (não matrizada e matrizada ou vice-versa).

O valor crítico tabelado de $t_{crit,\alpha,\nu}$ é obtido, para cada nível i , a partir da tabela da distribuição de Student para $(\nu = n_{t,1} + n_{t,2} - 2)$ graus de liberdade e nível de significância $\alpha = 0,05$ (5%) ou nível de confiança $1 - \alpha = 0,95$ (95%).

Se em um dado nível de concentração i o valor de $F_{calc,i}$ for maior que o $F_{crit,\alpha,\nu_1,\nu_2}$, as variâncias não podem ser

consideradas estatisticamente iguais no nível de fortificação i considerado. Verifica-se então o efeito de matriz com a distribuição t de Student, usando a seguinte equação:

$$t_{calc,i} = \frac{|\bar{x}_{i,1} - \bar{x}_{i,2}|}{\sqrt{s^2 \left(\frac{1}{n_{i,1}} + \frac{1}{n_{i,2}} \right)}} \quad (\text{Equação 04})$$

Neste caso, para a obtenção do valor crítico tabelado $t_{crit, \alpha, \nu}$, o número de graus de liberdade, para cada nível i , é igual a:

$$\nu_i = \frac{\left(\frac{s_{i,1}^2}{n_{i,1}} + \frac{s_{i,2}^2}{n_{i,2}} \right)^2}{\frac{\left(\frac{s_{i,1}^2}{n_{i,1}} \right)^2}{n_{i,1} + 1} + \frac{\left(\frac{s_{i,2}^2}{n_{i,2}} \right)^2}{n_{i,2} + 1}} - 2 \quad (\text{Equação 05})$$

6.2.3 Critérios de Aceitação do Efeito Matriz

Se o valor de $t_{\text{calc},i}$ calculado pela Equação 02 ou pela Equação 04, conforme o caso, for menor que o $t_{\text{crit},\alpha,\nu}$, pode-se concluir que a matriz não afeta o ensaio no i -ésimo nível de fortificação.

Se o valor de $t_{\text{calc},i}$ calculado pela Equação 02 ou pela Equação 04, conforme o caso, for maior que o $t_{\text{crit},\alpha,\nu}$, pode-se concluir que a matriz tem um efeito estatisticamente significativo sobre o resultado.

Para aceitação da não existência de efeito matriz, não deve haver efeito matriz em nenhum nível de concentração das fortificações.

6.3 Linearidade (Curva de Calibração)

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


A faixa de trabalho linear da curva de calibração deve, necessariamente, contemplar a faixa de concentração esperada para a amostra de ensaio. Sempre que possível, o valor esperado para a amostra de ensaio deve se situar em torno do centro da curva de calibração.

6.3.1 Procedimento de Determinação da Linearidade

O número de níveis de concentração das soluções padrão de calibração, designado por I , deve ser no mínimo cinco, $I \geq 5$.

Cada i -ésimo nível de concentração deve ter sua solução preparada independentemente no mínimo três vezes, $J \geq 3$. Isso resultará em um número total N_x de soluções de calibração independentes igual à $N_x = I \times J$.

Cada uma das N_x soluções de calibração deve ser medida (injetada, apresentada) no instrumento de medição analítica um número L de vezes. Isso resultará em um número total de leituras da resposta instrumental igual a $N_y = I \times J \times L = N_x \times L$. Se $L = 1$ então $N_x = N_y$.



Recomenda-se que o número total de respostas instrumentais N_y seja igual ou superior a 30 ($N_y \geq 30$)

Todas as N_y leituras instrumentais devem ser feitas aleatoriamente.

Os ajustes das curvas de calibração não devem ser forçados a passar pela origem.

6.3.2 Critérios de Aceitação da Linearidade

Se os desvios-padrão de repetitividade da resposta instrumental em cada nível de concentração, s_{y_i} , da curva de calibração não forem estatisticamente iguais, sugerindo heteroscedasticidade, significa que os dados da calibração devem ser tratados pelo método dos mínimos quadrados ponderado – MMQP.


No caso de homoscedasticidade podem ser usados ambos os métodos dos mínimos quadrados – MMQO ou o MMQP. Observação: O MMQO é um caso particular do

MMQP, assim no caso de homocedasticidade ambos os métodos levam ao mesmo resultado.

Em ambos os casos, MMQO e MMQP, os parâmetros da reta de calibração, o intercepto e a inclinação, devem ser estimados, assim como suas incertezas (desvios padrão), s_a e s_b , respectivamente, e a covariância, $s_{ab}^2 = \text{cov}(a,b)$, entre eles.

A qualidade da curva de calibração e de sua linearidade será avaliada através da inspeção visual do gráfico da reta de calibração e do gráfico de resíduos gerados pela regressão linear. Os pontos experimentais deverão estar próximos e aleatoriamente distribuídos ao redor da reta ajustada. Os pontos no gráfico dos resíduos deverão estar aleatoriamente distribuídos ao redor do eixo x, não apresentando nenhum comportamento regular ou tendência funcional.

Quando o MMQO for usado, o teste t indicado na referência Miller e Miller 2005 sobre o coeficiente de corre-



lação ou determinação poderá ser usado para estabelecer a adequação da curva de calibração.

Para maiores detalhes consultar o “Manual de Garantia da Qualidade Analítica”, publicado pelo MAPA/SDA/CGAL.

6.4 Precisão

Precisão é a estimativa da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas.

As três maneiras de expressá-la são por meio da repetitividade, da precisão intermediária (ou reprodutibilidade interna ou intralaboratorial) e da reprodutibilidade.

A reprodutibilidade de um procedimento analítico somente pode ser estimada através da participação de um ensaio interlaboratorial colaborativo.

6.4.1 Procedimento de Determinação da Repetitividade


Para se determinar a repetitividade deve-se preparar e analisar um conjunto de amostras constituídas de matrizes brancas fortificadas, no mínimo em três níveis de concentração, com as substâncias a analisar.

Para cada nível, a análise deve ser realizada em, pelo menos, seis réplicas independentes.

Calcular a concentração determinada para cada amostra replicada.

Calcular as concentrações médias, os desvios-padrão de repetitividade (s_r) e os coeficientes de variação de repetitividade (%) das amostras fortificadas em cada nível de concentração.

Calcular, por nível, a concentração média, o desvio-padrão de repetitividade (s_r) e o coeficiente de variação (CV) para as amostras fortificadas em cada nível de concentração.



Caso o laboratório não disponha de amostras brancas, poderá fazer uso do método de adição-padrão. Neste caso, a curva de adição-padrão deverá ter no mínimo 5 níveis de concentração e ser realizada, em pelo menos, seis réplicas independentes.

6.4.2 Procedimento de Determinação da Reprodutibilidade Intermediária ou Reprodutibilidade Intralaboratorial

Para determinar a reprodutividade intermediária ou reprodutividade intralaboratorial deve-se preparar e analisar um conjunto de amostras constituídas de matrizes brancas fortificadas, no mínimo em três níveis de concentração, com as substâncias a analisar.

Para cada nível, a análise deve ser realizada em, pelo menos, seis réplicas independentes.

Repetir estes passos pelo menos mais duas vezes em dias diferentes, variando sempre que possível os operadores, os instrumentos, as condições ambientais, lotes de reagentes e solventes, entre outros fatores experimentais.

Calcular a concentração detectada para cada amostra replicada.

Calcular a concentração média os desvios padrão de reprodutibilidade (S_r) e os coeficientes de variação para cada nível de concentração das amostras fortificadas.

Caso o laboratório não disponha de amostras brancas, poderá fazer uso do método de adição-padrão. Neste caso, a curva de adição-padrão deverá ter no mínimo cinco níveis de concentração e ser realizada, em pelo menos, seis réplicas independentes.

6.4.3 Critérios de aceitação da Precisão

Em condições de repetitividade, o coeficiente de variação deve tipicamente situar-se abaixo de dois terços dos valores apresentados na Tabela 3, conforme a concentração.

No caso de análises repetidas de uma amostra em condições de reprodutibilidade intralaboratorial, o coeficiente de variação intralaboratorial da média não deve exceder aos valores especificados na Tabela 3.

Precisão estimada em Função da Concentração do Analito no Produto/Matriz.

Tabela 3

Coefficiente máximo admitido, de acordo com a concentração do analito

Concentração (C)	Coefficiente de Variação (%)
$C < 1 \text{ mg/kg}$	35
$1 \text{ mg/kg} \leq C < 10 \text{ mg/kg}$	30
$10 \text{ mg/kg} \leq C < 100 \text{ mg/kg}$	20
$100 \text{ mg/kg} \leq C < 1000 \text{ mg/kg}$	15
$1000 \text{ mg/kg} \leq C < 10000 \text{ mg/kg}$	10
$10 \text{ mg/kg} \leq C < 100 \text{ mg/kg}$	7,3
$100 \text{ mg/kg} \leq C < 1000 \text{ mg/kg}$	5,3
$1000 \text{ mg/kg} \leq C < 10000 \text{ mg/kg}$	3,7
$10 \text{ g/kg} \leq C < 100 \text{ g/kg}$	2,7
$100 \text{ g/kg} \leq C < 1000 \text{ g/kg}$	2,0

6.5 Limite de Detecção

Limite de Detecção do equipamento é definido como a concentração do analito que produz um sinal de três vezes a razão sinal/ruído do equipamento.

Para a determinação do Limite de Detecção deve-se:

1. Diluir o padrão, a critério do analista, até um nível de concentração mínima detectável;
2. Injetar em triplicata e calcular o valor médio;
3. Estimar a concentração correspondente a um sinal que equivalha a três (3) vezes o ruído.

6.6 Limite de Quantificação

Limite de Quantificação do procedimento analítico é definido como o nível mais baixo de concentração no qual foi demonstrado que os critérios de veracidade e precisão foram atendidos, desde que a relação sinal/ruído seja superior a seis ($S/R \geq 6$).

6.6.1 Procedimentos de Determinação do Limite de Quantificação

Para estimativa do limite de quantificação deverá ser utilizadas amostras brancas fortificadas, no caso de observada a presença de efeito matriz; ou padrão em solução, no caso de demonstrada a ausência de efeito matriz.

6.7 Veracidade/Recuperação

O vocabulário internacional de metrologia define a veracidade como: “grau de concordância entre a média



de um número infinito de valores medidos repetidos e um valor de referência”.

A veracidade é a concordância entre a média de um número suficientemente grande de resultados de um ensaio e o valor de referência aceito convencionalmente como verdadeiro.

A veracidade está inversamente relacionada ao erro sistemático ou a correção ou ao fator de correção.

A recuperação mede a tendência total do procedimento analítico e, portanto, é uma expressão de sua veracidade.

Não se deve confundir a recuperação com a eficiência de extração ou de digestão da amostra. A recuperação tem por objetivo corrigir o resultado da análise dos erros sistemáticos oriundos dos efeitos de extração ou digestão e das perdas advindas de todas as etapas da marcha analítica, realizadas até a leitura da resposta instrumental, tais


como, limpeza (clean-up), diluições ou pré-concentração, derivatizações, secagens, etc.

Para tanto, pode-se usar o fator de recuperação, f_{rec} , que é um fator de correção, e é, portanto, um fator multiplicativo; ou usar uma correção de recuperação, C_{rec} , que é uma parcela aditiva.

Recomenda-se fortemente que seja utilizado na determinação analítica um Padrão Interno (composto, geralmente com características estruturais similares ao analito, adicionado aos padrões de calibração e amostras em concentrações conhecidas e constantes, para facilitar a determinação do analito).

6.7.1 Determinação da Veracidade/Recuperação

A determinação da veracidade deve ser feita por intermédio de ensaios de recuperação utilizando-se material de referência certificado - MRC. Caso não haja MRC dis-



ponível, a determinação da recuperação deve ser feita por intermédio de matriz branca fortificada.

Para determinar a veracidade/recuperação deve-se analisar 6 réplicas de material de referência certificado – MRC ou de amostra/matriz branca, antes e após fortificação com os padrões de calibração, em no mínimo 3 níveis de concentração.

Quando a recuperação é obtida a partir de fortificações de matriz branca, o fator de recuperação f_{rec} é calculado através da equação:

$$f_{rec} = \frac{C_f - C_{nf}}{C_{ad}} \times 100$$

(Equação 06)

Onde:

C_f = concentração medida após fortificação da matriz branca;

C_{nf} = concentração medida na matriz branca não fortificada, i.e., antes da fortificação; e

C_{ad} = concentração do analito puro adicionado à matriz branca.

Quando a recuperação é obtida a partir do uso do MRC, o fator de recuperação é calculado através da equação:

$$f_{rec,MRC} = \frac{C_{med}}{C_{MRC}} \times 100 \quad (\text{Equação 07})$$

Onde:

C_{med} = concentração medida na análise do MRC;

C_{MRC} = concentração declarada no certificado do MRC.

Dependendo se o estudo de determinação da recuperação foi feito com MRC ou com Matriz branca fortificada, a correção de recuperação C_{rec} é calculada através das seguintes equações, respectivamente:

$$C_{rec} = C_{nf} + C_{ad} - C_f \quad (\text{Equação 08})$$

$$C_{rec,MRC} = C_{MRC} - C_{med} \quad (\text{Equação 09})$$

O fator de recuperação médio, ou a correção de recuperação média, e o coeficiente de variação (CV) devem ser calculados em cada nível de concentração do estudo de veracidade/recuperação.

Sempre que na rotina analítica for utilizada curva de calibração em solvente (CCAS), os resultados deverão ser corrigidos pela recuperação.

6.7.2 Critérios de aceitação da Veracidade/Recuperação

A veracidade do procedimento medida pela Equação 06 ou Equação 07 deve estar compreendida nos intervalos especificados na Tabela 4 ao redor de 100%, de acordo com as respectivas concentrações. Excepcionalmente, valores fora das faixas poderão ser aceitos desde que devidamente justificados.

Tabela 4

Faixa de Aceitação do Fator de Veracidade/Recuperação

Concentração (C)	Intervalos (%)
$C < 1 \mu\text{g/kg}$	50 a 120
$1 \mu\text{g/kg} \leq C < 10 \mu\text{g/kg}$	70 a 110
$10 \mu\text{g/kg} \leq C < 100\mu\text{g/kg}$	80 a 110
$100 \mu\text{g/kg} \leq C < 1000 \mu\text{g/kg}$	80 a 110
$1000 \mu\text{g/kg} \leq C < 10000 \mu\text{g/kg}$	80 a 110
$10 \text{mg/kg} \leq C < 100 \text{mg/kg}$	90 a 107
$100 \text{mg/kg} \leq C < 1000 \text{mg/kg}$	95 a 105
$1000 \text{mg/kg} \leq C < 10000 \text{mg/kg}$	97 a 103
$10 \text{g/kg} \leq C < 100 \text{g/kg}$	98 a 102
$100 \text{g/kg} \leq C \leq 1000 \text{g/kg}$	98 a 102



6.8 Robustez

O estudo da robustez de um procedimento analítico procura avaliar o quão sensível o resultado analítico é às variações nas condições experimentais do procedimento analítico.


Esse estudo deve ser realizado demonstrando a estabilidade do procedimento sob diferentes condições (tempo, temperatura, pH, entre outras), diferentes fabricantes de insumos, colunas cromatográficas entre outras variações.

Todas as possíveis variações de condições experimentais, que podem ocorrer durante a rotina analítica, devem estar respaldadas pelos estudos de robustez do procedimento analítico e seus efeitos estimados.

6.8.1 Procedimento de Determinação da Robustez

As etapas do estudo de robustez são:

1. Identificar os possíveis fatores que possam influenciar os resultados.
2. Variar levemente cada fator em pelo menos dois níveis (tratamentos). Essas variações devem ser da mesma ordem daquelas que podem ocorrer durante o uso do procedimento analítico na rotina.
3. Realizar um teste de robustez utilizando a abordagem clássica variando um fator de cada vez, ou utilizando a abordagem do planejamento fatorial completo ou fracionário. Essa última abordagem é preferível, uma vez que exige menor número de experimentos sendo mais rápida, eficiente e econômica.



4. Identificados na etapa anterior os fatores que têm efeitos mais significativos sobre o resultado da medição analítica, um novo estudo mais detalhado é realizado apenas com esses fatores mais significativos de forma a estabelecer a faixa de variação aceitável desses fatores que não comprometa a veracidade e a precisão o resultado analítico.


5. Os fatores que afetam significativamente o resultado analítico e as faixas permitidas de suas variações devem ser explicitamente identificados no procedimento de análise, ressaltando-se os cuidados especiais com esses fatores.

Caso seja verificado através do estudo de robustez que a função resposta do procedimento analítico não é influenciada ou é fracamente influenciada por pequenas variações dos fatores, as condições experimentais, o procedimento analítico é classificado como: "Procedimento Analítico Robusto e adequado para as análises de rotina".

Nesse caso, relatar apenas as restrições de variabilidade das condições experimentais que mais influenciam no resultado analítico, estabelecendo as suas variações permitidas para uso do procedimento analítico na rotina.

Caso seja verificado através do estudo de robustez que a função resposta do procedimento analítico é fortemente influenciada por pequenas variações dos fatores, as condições experimentais, o procedimento analítico poderá ser classificado em uma das seguintes classes:

1. "Procedimento Analítico Não Robusto e inadequado para as análises de rotina".
2. "Procedimento Analítico de Uso Restrito". Nesse caso deverão ser detalhadamente relatadas as restrições de variabilidade e de controle das condições experimentais que serão permitidas para uso do procedimento analítico.



3. "Procedimento Analítico Não Robusto e inadequado para as análises de rotina" na faixa de variação estudada dos fatores de influência.

6.9 Estudos de Estabilidade

A estabilidade dos analitos deve ser demonstrada simulando as condições as quais o laboratório submete as amostras e os padrões.

Os estudos de estabilidade podem ser realizados de forma concorrente aos ensaios de rotina.

Admite-se um padrão como estável quando for observada uma degradação máxima de até 2%, em relação a uma referência recém-preparada analisada.


6.9.1 Estabilidade dos Analitos nas Amostras

O estudo visa a demonstrar a estabilidade dos analitos nas matrizes no período entre o recebimento da amostra e o início da análise. Aplica-se às amostras de origem animal (tecidos e urina), uma vez que para os medicamentos e rações, a estabilidade do analito já deve ter sido realizada por ocasião do registro.

O período de tempo estudado deve ser superior ao tempo máximo previsto de armazenamento para o início da análise da amostra.

6.9.2 Estabilidade dos Analitos nas Soluções Padrão

A estabilidade das soluções padrão deve ser demonstrada sempre que não houver alguma referência prévia para o seu prazo de validade.



A estabilidade da solução padrão deve ser estudada nas condições e no período de armazenamento nos quais a solução padrão é armazenada no laboratório.

Recomenda-se comparar a resposta instrumental gerada por uma solução padrão armazenada com a resposta instrumental gerada por uma solução padrão recém preparada (a partir de um padrão dentro do prazo de validade).

O estudo deve ser realizado em todos os tipos de solução padrão partindo da solução padrão estoque, passando pela solução padrão intermediária, até a solução padrão de trabalho.


Caso o estudo de estabilidade seja feito em uma solução diluída, essa estabilidade pode ser considerada para soluções mais concentradas, desde que ambas sejam armazenadas sob mesmas condições.

7. Incerteza de Medição

A incerteza de medição é um parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas.

A incerteza final do resultado de uma medição, resultado de uma combinação das incertezas de múltiplas fontes, é chamada de Incerteza Padrão Combinada, representada pelo símbolo $\mu_c(y)$. Onde y representa o mensurando, o resultado analítico.

Em química analítica, para a maioria dos fins, deve-se usar uma incerteza expandida, U . A incerteza expandida dá um intervalo dentro do qual se crê encontrar-se o valor do mensurando, com um maior grau de confiança. U é obtido pela multiplicação da incerteza padrão combinada, $\mu_c(y)$, por um fator de abrangência k . A escolha do fator k é baseada na probabilidade de abrangência desejada e no grau de liberdade efetivo da incerteza combinada.



Para a maioria das aplicações a probabilidade de abrangência é de 95%, k é 2.

7.1 Determinação da Incerteza Padrão Combinada e da Incerteza Expandida

Para se calcular a incerteza deve-se utilizar a metodologia Top-Down, considerando apenas as fontes de incerteza principais: a incerteza de reprodutibilidade intra-laboratorial, μ_{repro} , a incerteza da recuperação, μ_{recup} , e a incerteza de calibração do instrumento analítico, μ_{calib} .

Para se calcular a incerteza, proceder da seguinte forma:

1. Medir seis réplicas de amostra de MRC ou de matriz branca fortificada em cada um dos três níveis de concentração (baixa, média alta) da faixa de trabalho;

2. Calcular os desvios padrão de reprodutibilidade intralaboratorial $s_{\text{repro},i} = \mu_{\text{repro},i}$, das concentrações das replicatas em cada um dos três níveis de concentração. Essa é uma estimativa da incerteza do Tipo A;

Se o resultado final da concentração for corrigido pela recuperação, então a incerteza da medição da correção de recuperação, $\mu_{\text{rec},i} = \mu(C_{\text{rec}})$, será aproximada pela incerteza da reprodutibilidade intralaboratorial, $\mu_{\text{rec},i} = s_{\text{repro},i}$.

Se uma faixa para a correção de recuperação, C_{rec} , ou para o fator de recuperação, f_{rec} , é permitida e o resultado não é corrigido pela recuperação, então a incerteza da recuperação é feita por uma estimativa do Tipo B através da Equação 10 ou da Equação 11, respectivamente.

$$\mu_{\text{rec}} = \frac{C_{\text{rec max}} - C_{\text{rec min}}}{2\sqrt{3}} \quad (\text{Equação 10})$$

$$\mu_{rec} = \frac{2(f_{rec\ max} - f_{rec\ min})}{\sqrt{3}(f_{rec\ max} + f_{rec\ min})} \quad (\text{Equação 11})$$

A incerteza da calibração do instrumento analítico, μ_{calib} depende dos valores da própria concentração do analito calculada (estimada, interpolada) na curva de calibração, c_{analCC} , das incertezas (desvios padrão) do intercepto, s_a , e da inclinação, s_b , assim como da covariância entre elas, $cov(a,b)$. Esses três últimos valores são obtidos através do método dos mínimos quadrados ordinário, MMQO, ou ponderado, MMQP, conforme mostrado no Guia de Validação do PNCRC. Assim, μ_{calib} é dado pela Equação 12.

$$\mu_{calib}(c_{analCC}) = \sqrt{\frac{s^2(RI_{anos})/k + s^2(a) + c_{analCC}^2 s^2(b) + 2c_{analCC} cov(a,b)}{b^2}}$$

(Equação 12)

Usando a Equação 13 calcula-se a incerteza padrão combinada da concentração do analito na amostra de ensaio $\mu(c_{anal})$, combinando-se as fontes de incerteza de amostragem, de reprodutibilidade intra-laboratorial, de recuperação e da calibração do instrumento analítico:


$$\begin{aligned} \mu(C_{anal}) &= \sqrt{\mu_{amostragem}^2 + \mu_{repro}^2 + (C_{rec}\mu_{rec})^2 + (C_{calib}\mu_{calib})^2} = \\ &= \mu(C_{anal}) = \sqrt{\mu_{amostragem}^2 + \mu_{repro}^2 + (C_{rec}\mu_{rec})^2 + \left(\frac{C_{anal}}{C_{analCC}} \mu_{calib}\right)^2} \end{aligned}$$

(Equação 13)

Onde:

c_{anal} é a concentração do analito na amostra de ensaio;

c_{analCC} é a concentração do analito interpolada na curva de calibração;



μ_{repro} é a incerteza de reprodutibilidade obtida dos dados de participação em ensaios colaborativos (reprodutibilidade) ou dos dados de precisão intermediária

μ_{precint} (ou reprodutibilidade intralaboratorial), conforme sua disponibilidade;


μ_{calib} é a incerteza devida a previsão da concentração do analito na curva de calibração;

μ_{ecup} é a incerteza associada à estimação ou com a faixa permitida da recuperação, conforme o resultado seja corrigido ou não corrigido por ela, respectivamente;

$\mu_{\text{amostragem}}$ é a incerteza devida ao processo de amostragem que leva à amostra que chega ao laboratório. Ela é a maior fonte de incerteza do resultado analíti-

co, mas é em geral desconhecida. Nesse caso assumir o valor zero e reportar que a incerteza declarada não leva em consideração a incerteza de amostragem;

$c_{\text{calib}} = c_{\text{anal}}/c_{\text{analCC}}$ é o coeficiente de sensibilidade para a incerteza de calibração obtido da equação do mesurando escrita como uma função da concentração do analito interpolada na curva de calibração. Esse coeficiente de sensibilidade decorre do fato de que as unidades de concentração da curva de calibração podem não ser as mesmas do resultado final, assim como da existência de outras medições (massas, volumes, etc) além da resposta instrumental do instrumento de medição analítica;



c_{rec} é o coeficiente de sensibilidade associado ao fator de correção da recuperação $FC_{rec} = 1/f_{rec}$, e nesse caso é igual à concentração do analito não corrigida pelo fator de recuperação, $c_{rec} = c_{anal}$. Se na equação do mensurando for usado uma correção de recuperação, C_{rec} , e não o fator de correção da recuperação, FC_{recup} , esse coeficiente de sensibilidade será unitário, $c_{rec} = 1$ em unidades de c_{anal} ;

RI_{amos} é a resposta instrumental (absorvância, área de pico, tensão elétrica, etc) para a solução da amostra de ensaio injetada no instrumento analítico;

K é o número de replicatas independentes de análise da mesma amostra de ensaio desde a extração/abertura/digestão

da amostra de ensaio até sua leitura no instrumento analítico.

Para se calcular a Incerteza Padrão Combinada Expandida deve-se utilizar a Equação 14, abaixo:

$$U = u(c_{anal}) \times k \text{ (Equação 14)}$$

Exemplo de Cálculo de Incerteza

Consideremos o exemplo da análise do metal cádmio em uma dada amostra por absorção atômica. Os dados da curva de calibração (ver Exemplo A.5 do Guia EURACHEM de cálculo de incerteza e também o Guia de Validação do PNCRC) ajustados pelo MMQP levou aos seguintes valores para os parâmetros da reta de calibração: $\alpha = 3,4276 \cdot 10^{-3}$, $s_a = 4,090 \cdot 10^{-4}$, $b = 2,555488 \cdot 10^{-1} \text{ kg/mg}$, $s_b = 1,3984 \cdot 10^{-3} \text{ kg/mg}$ e $\text{cov}(a,b) = -4,1109 \cdot 10^{-7} \text{ kg/mg}$.

A faixa para o fator de recuperação permitida para o ensaio é de 90% a 110%, ou $f_{\text{recmin}} = 0,9$ e $f_{\text{recmax}} = 1,1$.

Uma dada amostra foi analisada duas vezes $K = 2$, dando uma resposta instrumental média $RI_{\text{amos}} = 0,19$, com desvio padrão de $s(RI_{\text{amos}}) = 3,5271 \cdot 10^{-3}$.

A concentração do analito na curva de calibração é, portanto, $c_{\text{analCC}} = 0,73009 \text{ mg/kg}$.

A solução de abertura da amostra passou por uma pré-concentração antes de sua leitura na absorção atômica, tal que 100 ml da solução de abertura foi evaporada até atingir 10 mL. Logo houve um fator de pré-concentração de 10 vezes. Logo a concentração do analito na amostra de ensaio é $c_{\text{anal}} = 0,07009 \text{ mg/mol}$. Nesse nível de concentração do analito na amostra, a incerteza de reprodutibilidade interna do procedimento é estimada em $u_{\text{repro}} = s_{\text{repro}} = 3,6504 \times 10^{-3} \text{ mg/kg}$.

Com base nesses dados obtemos que a incerteza combinada da concentração de Cd na amostra é $u_c(c_{\text{anal}}) = 0,005669 \text{ mg/kg}$, conforme mostrado nos cálculos a seguir (notar a coerência das unidades de medição). Esse resultado é insignificamente (0,35%) menor que o valor $u_c(c_{\text{anal}}) = 0,005689 \text{ mg/kg}$ encontrado levando em conta todas as demais incertezas de pesagem de medição de volume em um cálculo de incerteza pela metodologia Bottom-Up ou ISO GUM.

Calculando a concentração do analito na amostra:

$$c_{\text{anal}} = c_{\text{analCC}} \times \frac{1}{10} = \frac{0,19 - 3,4276 \times 10^{-3}}{2,555488 \times 10^{-1} \text{ kg/mg}} \times 0,1 =$$

$$= 0,73009 \text{ mg/kg} \times 0,1 = 0,073009 \text{ mg/kg}$$

Usando a Equação 11:

$$\mu_{\text{rec}} = \frac{2 \times (1,1 - 0,9)}{\sqrt{3 \times (1,1 + 0,9)^2}} = \frac{2 \times 0,2}{\sqrt{3 \times 2^2}} = 0,05773$$

Usando a Equação 12:

$$\mu_{calib} = \left\{ \frac{(3,5271 \times 10^{-3})^2 / 2 + (4,090 \times 10^{-4})^2 + (0,73009)^2 \dots}{(2,555488 \times 10^{-1})^2} \dots \right. \\ \left. \frac{\dots \times (1,3984 \times 10^{-3})^2 + 2 \times 0,73009 \times (-4,11 \times 10^{-7})}{(2,555488 \times 10^{-1})^2} \right\}^{1/2}$$

$$= (1,047383 \times 10^{-4} \text{ mg}^2/\text{kg}^2)^{1/2} = 1,023417 \text{ mg/kg}$$

Usando a Equação 13:

$$\mu(c_{anal}) = \left\{ (0 \text{ mg/kg})^2 + (3,6504 \times 10^{-3} \text{ mg/kg})^2 + \dots \right.$$

$$(0,073009 \text{ mg/kg} \times 0,057735)^2 +$$

$$\left. + \left(\frac{0,073009 \text{ mg/kg}}{0,73009 \text{ mg/kg}} \times 1,0234 \times 10^{-2} \text{ mg/kg} \right)^2 \right\}^{1/2} =$$

$$\left\{ (0 \text{ mg/kg})^2 + (3,6504 \times 10^{-3} \text{ mg/kg})^2 + (4,2152 \times 10^{-3} \text{ mg/kg})^2 \dots \right.$$

$$\dots + (1,0234 \times 10^{-3} \text{ mg/kg}^2)^2 \}^{1/2} =$$

$$\{0 \text{ mg}^2/\text{kg}^2 + 1,3325 \times 10^{-5} \text{ mg}^2/\text{kg}^2 + 1,7768 \times 10^{-5} \text{ mg}^2/\text{kg}^2 \dots$$

$$+ 1,0473 \times 10^{-6} \text{ mg}^2/\text{kg}^2 \}^{1/2} =$$

$$\{3,214 \times 10^{-5} \text{ mg}^2/\text{kg}^2 \}^{1/2} = 0,0056692 \text{ mg/kg}$$

7.2 Reportando a Incerteza Expandida

O resultado x deve ser expresso juntamente com a incerteza expandida U , calculada usando um fator de abrangência $k=2$.

Desta forma, o resultado deve ser expresso da seguinte forma: “(Resultado): $(x \pm U)$ (unidades)”.

Periodicamente, recomenda-se que a incerteza seja recalculada e reavaliada por intermédio do uso das ACQs.



8. Verificação de Desempenho de Procedimentos Normalizados (Farmacopéicos e outros oficializados pelo Mapa)

A verificação de desempenho de um determinado procedimento normalizado consiste em um processo experimental documentado que objetiva comprovar se o procedimento avaliado opera adequadamente dentro das condições analítica do laboratório.

A verificação de desempenho de um procedimento normalizado é uma “validação simplificada”.

8.1 Aplicação e Requisitos Mínimos

A verificação de desempenho é aplicável aos procedimentos normalizados desde que não seja feita nenhuma alteração nos procedimentos, especificações e técnica analítica descritas na norma.

Dentro deste contexto, a avaliação de desempenho consiste em determinar basicamente:


- I. Veracidade/recuperação;
- II. Precisão.

Esses dois parâmetros de desempenho avaliados deverão atender aos critérios de aceitação estabelecidos neste Guia.

Na determinação da veracidade/recuperação e da precisão, a curva de calibração deverá conter no mínimo cinco níveis de concentração. A veracidade/recuperação e a precisão devem ser determinadas em três níveis de concentração (baixa; média; alta), cada nível deve ser analisado, no mínimo, em seis réplicas.

9. Rotina Analítica: Curvas de Calibração, Curva Adição-Padrão e Amostras de Controle de Qualidade (ACQs)

Todos os procedimentos adotados na rotina analítica deverão ser respaldados pelos estudos de validação do procedimento.



A curva de calibração ou a curva de adição-padrão utilizada na rotina deve conter pelo menos cinco níveis, devendo ser elaborada conforme estudada na validação do procedimento.

Os valores de veracidade/recuperação obtidos pelas ACQs devem estar dentro dos limites estabelecidos na Tabela 4 e na Tabela 3, quando aplicável, de acordo com as respectivas concentrações. Caso contrário, a corrida analítica deverá ser invalidada.

Produtos com a concentração já determinada ou padrões internos podem ser utilizados como ACQs.


Toda batelada analítica deve obrigatoriamente ser adicionada de ACQs, preferencialmente, os níveis de concentração das ACQs devem, periodicamente, ser alternados entre baixa, média e alta concentração.

O laboratório deve, obrigatoriamente, fazer uso de cartas controle para monitorar as ACQs.

Adicionalmente, a cada seis meses, os laboratórios deverão realizar uma verificação de desempenho (internal check samples) por intermédio de amostras rigorosamente elaboradas e distribuídas para serem analisadas junto com as amostras da rotina analítica. O objetivo é estabelecer um controle interno e independente, ou seja, sem o conhecimento prévio dos analistas diretamente envolvidos nas análises.

10. Expressão do Resultado Final

Os resultados das análises de amostras de ensaio de rotina oriundos de curvas de calibração obtidas a partir de padrões de calibração de analitos puros em solução, ou a partir de extrato de matriz branca fortificado com o analito, devem ser corrigidos pela recuperação obtidos naquela batelada de análises, no nível de concentração mais próximo do resultado da amostra analisada.



A correção de recuperação ou o fator de recuperação médios, da batelada de análises no nível de concentração mais próximo do resultado da amostra de ensaio, deverá sempre ser relatado no certificado oficial de ensaio, juntamente com o resultado da medição.

O resultado final deve ser reportado junto com a incerteza da medição.



11. Referências Bibliográficas

AOAC: Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals.

EC (European Commission) Commission Decision 2002/657/CE of 12 august 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Communities, 2002, L 221/8.

EURACHEM/CITAC Guide: "Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, second Edition, 2000.

EURACHEM / CITAC Guide, "Measurement uncertainty arising from sampling A guide to methods and approaches" Produced jointly with EUROLAB, Nordtest and the UK RSC Analytical Methods Committee First Edition 2007.


Guidelines on Good Laboratory Practice in Residue Analysis, CAC/CL 40-1993, Rev.1-2003.

International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products – VICH: Validation of Analytical Procedures: Methodology.

International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products – VICH: Validation of Analytical Procedures: Definition and Terminology.

International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products – VICH: Impurities in New Veterinary Medicinal Products.

International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products – VICH: Impurities in New Veterinary Drug substances.



Manual de Garantia da Qualidade Analítica: Resíduos e Contaminantes em Matrizes de Origem Animal e Vegetal. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília – 2011.

Miller, James N.; Miller, Jane C., “Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry”, 5th Edition, 268 pages, Pearson Prentice Hall, Harlow, England, 2005, ISBN-10: 0-13-129192-0, ISBN-13: 978-0131291928.

Vocabulário Internacional de Metrologia - VIM: Conceitos Fundamentais e Gerais e Termos Associados.

ISBN 978-857991-053-1



9 788579 910531

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PAÍS RICO E PAÍS SEM POBREZA