

Manual de Garantia da Qualidade Analítica

Áreas de Identidade e Qualidade de Alimentos e de Insumos



Coordenação-Geral de Apoio Laboratorial
Divisão de Ensaio Químicos

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

Secretaria de Defesa Agropecuária
Coordenação-Geral de Apoio Laboratorial
Divisão de Ensaio Químicos

Manual de Garantia da Qualidade Analítica

Áreas de Identidade e Qualidade de Alimentos e de Insumos

Missão Mapa

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

Brasília/DF

MAPA

2015

© 2015 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: 1.000 exemplares

Ano 2015

Elaboração, distribuição, informações:

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIAE ABASTECIMENTO

Secretaria de Defesa Agropecuária

Coordenação Geral de Laboratórios - CGAL

Esplanada dos Ministérios, Bloco D, Anexo B, sala 131

CEP: 70043-900 - Brasília - DF

Tel.: (61) 3218.2417

Fax.: (61) 3223.5350

www.agricultura.gov.br

Catálogo na Fonte

Biblioteca Nacional de Agricultura – BINAGRI

Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

Manual de garantia da qualidade analítica : áreas de identidade e qualidade de alimentos e de insumos / Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília : MAPA/ACS, 2015.

51 p.

ISBN 978-85-7991-093-7

1. Controle de qualidade. 2. Análise química I. Secretaria de Defesa Agropecuária. II. Título.

wwAGRIS Q55, L70

CDU 636.084.41

Equipe Técnica

Coordenação

Angelo de Queiroz Mauricio (CGAL/SDA/MAPA)

Erick Soares Lins (CGAL/SDA/MAPA)

Concepção e Revisão Técnico-Científica

Prof. Dr. Igor Renato Bertoni Olivares - Instituto de Química/USP

Maria de Fátima Martins Pinhel – Lanagro/SP

Priscila Moser – Lanagro/RS

Redação, Desenvolvimento e Colaboração

Prof. Dr. Igor Renato Bertoni Olivares - Instituto de Química/USP

Maria de Fátima Martins Pinhel – Lanagro/SP

Priscila Moser – Lanagro/RS

Maria de Fátima Zanini Vieira – Lanagro/SP

Dra. Cláudia Hoffmann Kowalski Schroder – Lanagro/SP

Flavia Consolini – Lanagro/SP

Thiago Charão de Oliveira – Lanagro/RS

Marta Severo – Lanagro/RS

João Becker – Lanagro/RS

Paulo Gustavo Celso – Lanagro/RS

Fabiano Barreto – Lanagro/RS

Adriana Claudia Chagas – Lanagro/GO

Alanna Renata de Oliveira Santiago – Lanagro/GO

Luiz Sávio Medeiros Teixeira – Lanagro/GO

Zelita de Oliveira Lopes Brasil – Lanagro/GO

Francisco Jairo Rodrigues da Fonseca – Lanagro/GO

Nélio Fleury Filho – Lanagro/GO

Marco Aurélio Luiz Barcelos – Lanagro/GO

Alinny Freitas Silva – Lanagro/GO

Adriane Reis Cruvinel – Lanagro/GO

Roseli Chela Fenille – Lanagro/GO

Ricardo Belizário – Lanagro/PA

Lilian Cristina da Silva Magalhães Costa – Lanagro/PA

Antonio Pinheiro do Nascimento Neto – Lanagro/PA

Paulo Roberto de Barros Salomão David – Lanagro/PE

Maria de Fátima Ventura de Almeida – Lanagro/PE

Flávia Coelho – Lanagro/MG

Eduardo Esteves – Lanagro/MG

Consultoria Técnica

Profª Doutora Suzanne Rath - Instituto de Química/ Unicamp

Sumário

Parte 01 - Introdução e requisitos gerais.....	7
1.0 Propósito.....	8
2.0 Escopo	8
3.0 Responsabilidades	8
3.1 Evitando contaminação	9
3.2 Padrões de Trabalho (Analíticos), de Referência e MRC.....	9
3.3 Rastreabilidade de Padrões de Trabalho (Analíticos)	10
3.4 Preparação, Uso e Armazenamento de Soluções Padrão	10
3.5 Reagentes e suas Soluções	11
3.6 Recepção, Armazenamento e Preparação de Amostras	11
3.7 Desenvolvimento e Otimização do Procedimento Analítico	12
3.8 Validação de Procedimentos Analíticos.....	13
3.9 Conduções do Processo de validação e verificação/confirmação de desempenho.....	16
3.10 Rastreabilidade Metrológica	17
Parte 02 – Validação de métodos para as áreas IQA (Identidade e Qualidade de Alimentos) e IQI (Identidade e Qualidade de nsumos).....	19
1.0 Introdução	20
1.1 Campo de aplicação.....	20
1.2 Validação e Verificação/Confirmação de desempenho (itens 5.4.2 e 5.4.5 da ISO/IEC 17025:2005)	20
1.3 Cálculo de Incerteza (item 5.4.6 da ISO/IEC 17025:2005).....	20
1.4 Controle de Qualidade (item 5.9 da ISO/IEC 17025:2005).....	20
2.0 Objetivos.....	20
3.0 Procedimentos	21
3.1 Verificação/confirmação de desempenho	21
3.2 Validação intralaboratorial.....	22

3.2.1 Cálculos e Critérios	22
3.2.1.1 Linearidade e faixa de trabalho	22
3.2.1.2 Seletividade	23
3.2.1.3 Precisão (repetitividade) / Exatidão	24
3.2.1.4 Precisão intermediária	25
3.2.1.5 Limite de quantificação	26
3.2.1.6 Teste de robustez	27
3.3 Cálculo de incerteza de medição (abordagens “bottom up” e “validation based”).....	27
3.3.1 Incerteza da Linearidade (curva de calibração).....	28
3.3.2 Incerteza da precisão intermediária.....	29
3.3.3 Incerteza de equipamentos.....	30
3.3.4 Incerteza de soluções.....	30
3.3.5 Cálculo da incerteza combinada e expandida.....	31
3.4 Controle de Qualidade.....	31
3.4.1 Cartas de controle das médias.....	32
3.4.2 Cartas de controle de amplitude.....	33

Anexo A – Fluxograma Validação, Verificação/Confirmação de Desempenho.....	35
---	-----------

Anexo B – Especificidades de métodos de IQA e IQI.....	37
---	-----------

B.1 Determinação de teor de Medicamentos Veterinários.....	38
--	----

B.2 Análise de Histamina para controle de pescado e seus derivados.....	40
---	----

Anexo C – Glossário.....	41
---------------------------------	-----------

Anexo D – Referências Bibliográficas.....	44
--	-----------

Parte 01
Introdução e requisitos gerais

1.0 Propósito

Definir os procedimentos para verificação/confirmação de desempenho de métodos normalizados, validação de métodos não normalizados, cálculo da incerteza com base nestes resultados (quando aplicável) e ferramentas para controle de qualidade intralaboratorial dos resultados na rotina.

Este Manual foi elaborado com o objetivo de estabelecer parâmetros e critérios de aceitação aplicáveis à validação de métodos analíticos e à rotina analítica dos laboratórios públicos e privados que pertencem ou desejam pertencer à Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários (que compreendem os Lanagros e laboratórios credenciados).

A validação, verificação de desempenho, cálculo de incerteza e controle de qualidade intralaboratorial, segundo os requerimentos deste Manual, visa garantir a qualidade metrológica dos resultados analíticos, conferindo-lhes rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade.

2.0 Escopo

Este Manual aplica-se às áreas abaixo relacionadas, as quais pertencem à Divisão de Ensaio Químicos da Coordenação Geral de Apoio Laboratorial que compreende:

Área de Identidade e Qualidade de Alimentos - IQA:

- Físico-Química de Bebidas e Vinagres - BEV
- Físico-Química de Produtos de Origem Animal e Água – POA
- Físico-Química de Produtos de Origem Vegetal – POV

Área de Identidade e Qualidade de Insumos - IQI:

- Agrotóxicos e Afins – AGR
- Fertilizantes e Afins – FER
- Medicamentos Veterinários e Afins – MEV
- Físico-Química de Alimentos para Animais – ALA

3.0 Responsabilidades

Os parâmetros e critérios descritos neste documento devem ser observados por todos os laboratórios que realizam ensaios pertencentes à Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários, atuantes nas áreas mencionadas no item 2.0.

Laboratórios que pretendam solicitar credenciamento ou ampliação de escopo nessas áreas também devem atender aos requerimentos presentes neste Manual.

Alterações nos procedimentos de validação, parâmetros e critérios estabelecidos poderão ser necessários devido à especificidade de determinados métodos de ensaio 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 Manual e o não comprometimento da rastreabilidade, da comparabilidade e da confiabilidade dos resultados analíticos gerados.

3.1 Evitando Contaminação

O laboratório e as áreas afins (recepção, armazenamento de amostras, armazenamento de reagentes, lavagem de vidrarias e instrumentos, sala de preparo e extração, descarte em geral) necessitam ser planejados tendo em vista diminuir ao máximo a possibilidade de contaminações.

Procedimentos operacionais devem ser escritos de forma a padronizar todas as operações realizadas, contemplando desde a recepção das amostras até a emissão dos resultados. Sempre que possível, o fluxo de amostras, instrumentos, reagentes e vidrarias deve ser unidirecional.

Reagentes e soluções de altas concentrações devem ser manipulados em locais distintos daqueles onde são preparadas as soluções de baixa concentração. Na impossibilidade deve ser demonstrada, por intermédio de controles, a ausência de contaminação cruzada.

Especial atenção deve ser dispensada ao sistema de exaustão utilizado, de forma a minimizar os riscos de contaminação.

O controle de insetos e roedores, no laboratório e em suas proximidades, somente poderá ser efetuado se devidamente autorizado pelo responsável do laboratório e deve ser feito sob seu controle, de preferência, sem a utilização de substâncias químicas voláteis ou altamente impregnantes.

Artigos de borracha, plásticos e lubrificantes são fontes frequentes de interferência e devem ser usados com cautela. Quando necessário, o selamento de recipientes deve ser feito com PTFE – Politetrafluoroetileno (teflon) ou silicone.

3.2 Padrões de Trabalho (Analíticos), de Referência e MRC

Na validação devem ser utilizados materiais/padrões de referência certificados, produzidos por produtores acreditados na ISO GUIA 34. Caso os materiais/padrões certificados não estejam disponíveis podem ainda ser empregados materiais de referência internos, amostras fortificadas ou ainda amostras com valores conhecido.

A utilização de material/padrão de trabalho é permitida, desde que o material/padrão de trabalho seja, devidamente, rastreável a um material/padrão de referência, que por sua vez tenha sido calibrado com um MRC.

Os Materiais de referência certificados – MRC, materiais/padrões de referência, padrões de trabalho (analíticos) e demais padrões devem ser armazenados em local seco, quando necessário protegido da luz, de preferência em baixas temperaturas

e sempre sob condições controladas e monitoradas, visando diminuir as taxas de degradação, contaminação ou perdas por evaporação. As condições de armazenamento prescritas pelos fornecedores dos MRC e demais padrões devem ser estritamente observadas.

3.3 Rastreabilidade de Padrões de Trabalho (Analíticos)

Os padrões de trabalho (analíticos) devem possuir rastreabilidade sobre seu uso, qualidade, procedência e origem.

As seguintes informações devem constar para a correta rastreabilidade:

1. Código de identificação (CAS);
2. Identificação da substância (IUPAC, DCB/DCI, nome comum);
3. Procedência;
4. Origem;
5. Prazo de validade;
6. Pureza;
7. Análises suplementares;
8. Quantidade adquirida;
9. Quantidade utilizada e destinação;
10. Quantidade restante;
11. Responsável pelas informações.

3.4 Preparação, Uso e Armazenamento de Soluções Padrão

O processo de preparação das soluções padrão deve ser devidamente registrado, identificando os componentes e as respectivas quantidades. As soluções devem ser devidamente rotuladas e datadas, acondicionadas em recipientes adequados e hermeticamente fechados, para evitar perdas de solventes voláteis e contaminações, e armazenadas à temperatura adequada seguindo orientações do produtor.

Recomenda-se que a preparação das soluções padrão deve ser baseada em sua massa, usando balanças com resolução de pelo menos 0,1 mg para massas de até 100mg e 0,01mg para massas inferiores a 100 mg, deve-se evitar pesar massas de padrões inferiores a 10 mg. A massa de tara (do recipiente de pesagem) nunca deve ser inferior a 0,1g, massa (carga) mínima de calibração das balanças analíticas, que são balanças da classe I (Portaria Inmetro nº 236 de 1994), pois elas não podem ser calibradas abaixo de cem vezes a sua divisão de verificação.

Recomenda-se que logo após o seu preparo e acondicionamento em frasco adequado, as soluções padrão sejam pesadas. Recomenda-se que essa pesagem seja refeita antes e após a utilização de qualquer volume dessas soluções. As datas e valores dessas pesagens e os nomes dos técnicos que prepararam ou utilizaram a

solução padrão devem ser anotados para controle (cadeia de custódia).

Soluções padrão estoque (de referência) e de trabalho armazenadas devem ser comparadas com soluções recém preparadas, para se averiguar se há diferenças nas concentrações, e desta forma estabelecer o prazo de validade de utilização.

O estabelecimento dos prazos de validade deve fazer parte dos procedimentos de validação do método analítico, caso o laboratório opte em trabalhar com armazenamento de soluções. Admite-se que a determinação do prazo de validade seja conduzida de forma concorrente à rotina analítica.

O laboratório, para preparo de soluções padrão, deve avaliar quanto a necessidade em ser climatizado e garantir que todas as operações sejam realizadas sob uma faixa de temperatura previamente estabelecida.

3.5 Reagentes e suas Soluções

As especificações técnicas dos reagentes analíticos devem ser compatíveis com a finalidade de seu uso, de forma a evitar a ocorrência de contaminações e/ou interações que venham interferir na qualidade dos resultados analíticos.

Os reagentes devem ser preferencialmente armazenados em suas embalagens originais, nas condições preconizadas pelo fabricante. O laboratório deve manter controle efetivo sobre o estoque e validade dos reagentes.

3.6 Recepção, Armazenamento e Preparação de Amostras

As amostras recebidas no laboratório devem ser avaliadas em relação aos aspectos de inviolabilidade e adequabilidade do recipiente de contenção, identificação, conservação e quantidade encaminhada. Estando as amostras de acordo com os requisitos de recepção, elas devem ser cadastradas e receber um código, numérico ou alfanumérico, ao qual serão rastreáveis, no mínimo, as seguintes informações:

1. Origem;
2. Data de recepção;
3. Estado de conservação;
4. Quantidade;
5. Tipo de amostra (especificação).

Após a recepção, as amostras devem ser encaminhadas para a preparação, antes da análise, ou armazenadas de acordo com as suas peculiaridades e requisitos específicos.

3.7 Desenvolvimento e Otimização do Procedimento Analítico

O desenvolvimento e a otimização de um procedimento analítico não constituem sua validação e sim a precedem, como mostrado na Figura 01. No entanto, quando feito pelo laboratório, essas atividades trazem muita expertise na execução do procedimento analítico e muitas informações úteis para o planejamento e condução da validação.

A validação de um procedimento analítico sem sua prévia otimização intralaboratorial, pode resultar no não atendimento dos requisitos de validação e perda de tempo, trabalho e recursos do laboratório.

A otimização interna do procedimento analítico inclui as calibrações dos instrumentos de medições, a verificação (qualificação) da adequação dos instrumentos de medições e das instalações do laboratório ao procedimento analítico. A verificação da adequação dos reagentes e demais insumos analíticos, o treinamento dos analistas, etc.

Na otimização do procedimento analítico é feito um estudo dos efeitos dos diversos fatores experimentais que podem afetar o resultado analítico, procurando-se estabelecer as condições experimentais que produzam um resultado com exatidão e precisão adequados ao propósito de uso do resultado analítico.

O procedimento de otimização pode usar os planejamentos fatoriais seqüenciais, a metodologia de análise de superfície de respostas (Barros Neto; Scarminio; Bruns, 2007); (Ellison; Barwick; Farrant; 2009); (Massart; 1997); (Miller; 2005) ou os algoritmos ou métodos SIMPLEX (Barros Neto; Scarminio; Bruns, 2007); (Massart; 1997); (Miller; 2005); (Algoritmo Simplex; 2010). As informações obtidas durante a otimização do procedimento analítico constituem um estudo prévio de sua robustez.

Quando for necessário desenvolver um procedimento analítico para uma combinação analito-matriz (um dado analito em uma dada matriz) de interesse, recomenda-se por iniciar uma pesquisa quanto à disponibilidade de algum procedimento já desenvolvido para aquele analito, ou outra substância com propriedades químicas semelhantes, na matriz de interesse ou em uma matriz semelhante. Caso exista, pode ser utilizado esse procedimento sem alterações para a análise de um MRC, ou uma amostra de controle, ou uma matriz branca fortificada, da combinação analito-matriz de interesse. Desta maneira é avaliada a veracidade e a precisão, i.e., a exatidão, desse procedimento. Caso a exatidão do procedimento original não atenda ao propósito de uso, são necessárias alterações desse procedimento visando sua adaptação à combinação analito-matriz de interesse.

Durante o desenvolvimento e otimização de um procedimento analítico, especial atenção deve ser dada a algumas de suas etapas, como discutido a seguir:

- 1.No processo de extração, digestão ou abertura a alíquota de amostra utilizada deve ser totalmente desintegrada, excetuando os casos onde isto

não é necessário ou é inapropriado (e.g. determinação de resíduos presentes em superfícies).

2. Durante o processo de concentração, especial atenção deve ser dada à etapa de evaporação do solvente, devido ao fato que alguns analitos podem ser perdidos por arraste. A temperatura de evaporação deve ser a mais baixa possível e um pequeno volume de solvente, com alto ponto de ebulição, deve ser utilizado de forma a minimizar o arraste. Não se recomenda o uso de corrente de ar, devido à possibilidade de contaminação, oxidação e introdução de umidade no sistema.

3. A estabilidade do analito sob o processo de extração, no extrato e sob a temperatura do injetor automático, deve ser considerada e demonstrada durante o desenvolvimento do método. Caso disponível, a estabilidade do analito poderá ser demonstrada por intermédio da apresentação de trabalhos científicos publicados, os quais deverão ser anexados ao relatório de validação.

3.8 Validação de Procedimentos Analíticos

A validação é um estudo experimental e documentado que objetiva demonstrar que o procedimento analítico avaliado é adequado à finalidade proposta, de forma a colaborar com a confiabilidade dos resultados obtidos.

É essencial que a validação seja realizada sobre o procedimento analítico exatamente da forma que ele será executado na rotina do laboratório.

O planejamento, a preparação e a execução da validação, devem seguir protocolos de validação detalhados contemplando:

1. Adequação ao uso pretendido: finalidade e âmbito de aplicação;
2. Responsável técnico do projeto;
3. Pessoal técnico envolvido com as respectivas responsabilidades;
4. Identificação das Unidades, equipamentos/instrumentos utilizados;
5. Procedimento Operacional Padrão (POP) inicial de execução do procedimento analítico para pré-validação;
6. Parâmetros de desempenho e critérios de aceitação (com referência);
7. Experimentos de pré-validação e de validação propriamente dita;
8. Características de desempenho dos equipamentos/instrumentos;
9. Qualificação dos materiais (padrões, reagentes, amostras, alíquotas, entre outros);
10. Realização dos experimentos da pré-validação: dados (registros) e conclusão;
11. Realização dos experimentos da validação: Dados (registros) e conclusão;
12. POP final e definitivo para a execução do procedimento analítico na rotina;

13. Relatório Final de Validação, destacando a informação se o método é adequado ao uso pretendido.

Em se tratando de método normalizado, é necessário a verificação de desempenho, desta maneira, devem ser avaliados parâmetros de validação na extensão necessária com o intuito de demonstrar que os procedimentos preconizados atendem aos critérios de aceitação estabelecidos neste Manual.

Caso sejam realizadas alterações no procedimento normalizado, a validação deverá ser conduzida na extensão necessária.

Após o término dos estudos de validação, o laboratório deve deixar **IMEDIATAMENTE DISPONÍVEIS** (o que significa produzir e deixar cópia impressa pronta para ser entregue ao MAPA quando solicitado) os seguintes documentos, os quais compreendem o “Pacote de validação” do laboratório:

1. O procedimento de validação empregado pelo laboratório nos estudos, escrito na forma de POP ou outro documento padronizado do Sistema de Gestão da Qualidade do laboratório;
2. O respectivo relatório de validação. Neste relatório devem estar claramente descritos os parâmetros de validação estudados e os resultados obtidos, bem como uma avaliação sobre o cumprimento dos critérios de aceitação para cada um dos parâmetros estudados. Salienta-se que o relatório de validação não se resume apenas aos dados brutos, razão pela qual se recomenda a utilização do modelo de relatório de validação estabelecido pela CGAL/SDA;

Todos os dados brutos referentes a cada um dos ensaios e parâmetros estudados durante a validação e constantes do respectivo relatório devem ser mantidos seguros e prontamente disponíveis para apresentação quando requeridos.

Um fluxograma geral, mostrando as etapas de desenvolvimento e otimização do procedimento, sua validação, utilização na rotina de análises e controle estatístico, é mostrado na Figura 01.

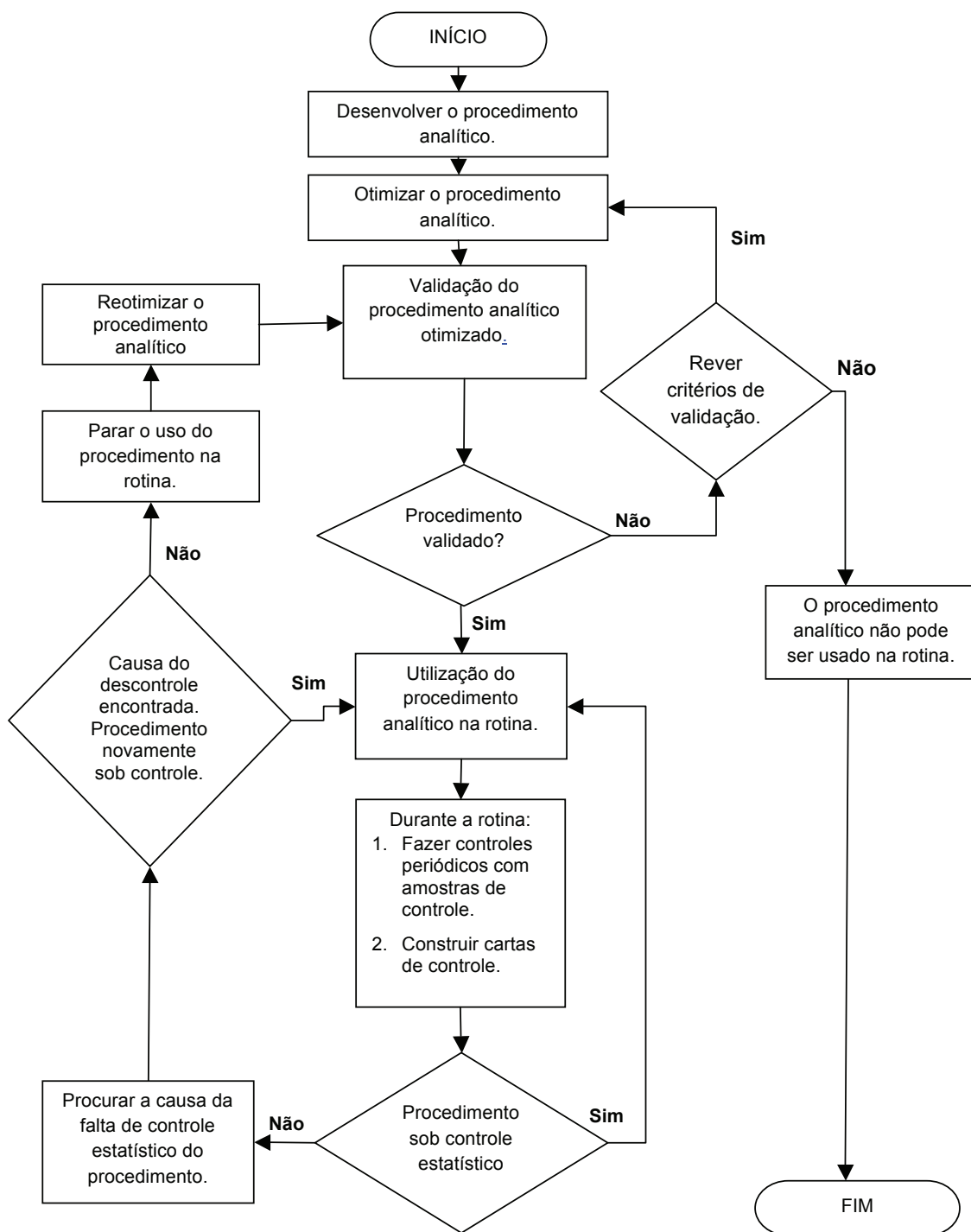


Figura 01. Delineamento experimental - Fluxograma das etapas básicas de desenvolvimento, validação e controle na rotina de um procedimento de análise química.

* Desde que os critérios de aceitação legais estabelecidos sejam atendidos.

3.9 Conduções do Processo de validação e verificação/ confirmação de desempenho

A validação de um procedimento analítico constitui uma importante ferramenta da garantia da qualidade de um sistema de gestão da qualidade laboratorial. Entre as diversas ferramentas que colaboram com o sistema de gestão da qualidade destacam-se: o controle de qualidade interno, a participação em ensaios interlaboratoriais colaborativos e/ou de proficiência, culminando com a acreditação (ou credenciamento) do laboratório para o escopo que inclui o procedimento analítico validado, Figura 02 (Souza, 2007).

Para minimizar a carga de trabalho do processo de validação, recomenda-se que seja adotado um planejamento cuidadoso e estatisticamente consistente, que permita combinar ensaios de forma a determinar diferentes parâmetros de validação em um mesmo experimento.

Os experimentos de veracidade e precisão podem ser combinados se um MRC ou outro material de referência ou padrão adequado for utilizado nas análises químicas, para o levantamento desses parâmetros.

Se o laboratório optar por determinar a repetitividade associada a cada combinação de instrumentos analíticos, analistas, entre outras, o conjunto desses dados também pode ser levado em consideração na estimação da precisão intermediária (reprodutibilidade intralaboratorial).

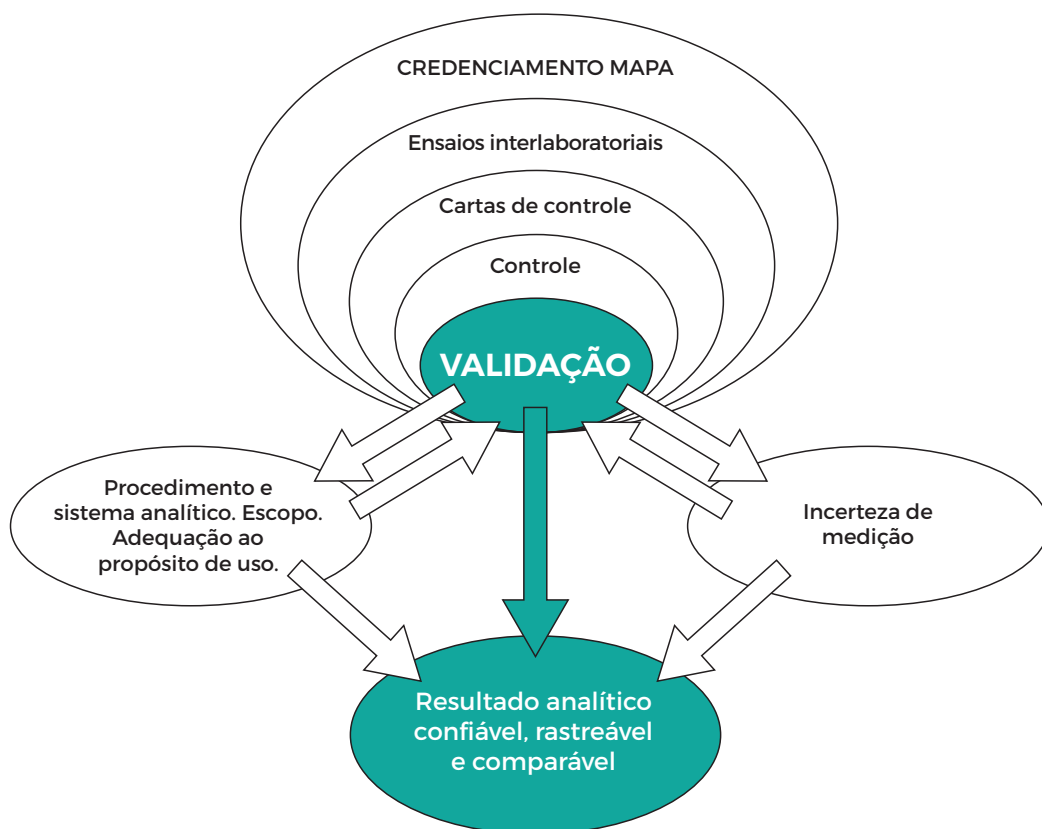


Figura 02. A validação de um procedimento analítico no contexto do sistema de gestão da qualidade de um laboratório. Adaptado de Souza (2007).

3.10 Rastreabilidade metrológica

A busca da rastreabilidade metrológica de resultados de ensaios laboratoriais é uma necessidade para garantia da confiabilidade de resultados. Dentre as ferramentas aplicadas para obtenção desta rastreabilidade, podemos destacar o Ciclo de Garantia da Qualidade Analítica (Olivares; Antunes, 2012), conforme apresentado na Figura 03.

A abordagem deste ciclo pode ser aplicada para qualquer unidade laboratorial. No entanto, é necessário considerar algumas características específicas como, por exemplo, para as áreas de IQA e IQI, nas quais inicialmente devem ser observadas as orientações descritas na Parte 02 - Item 01.

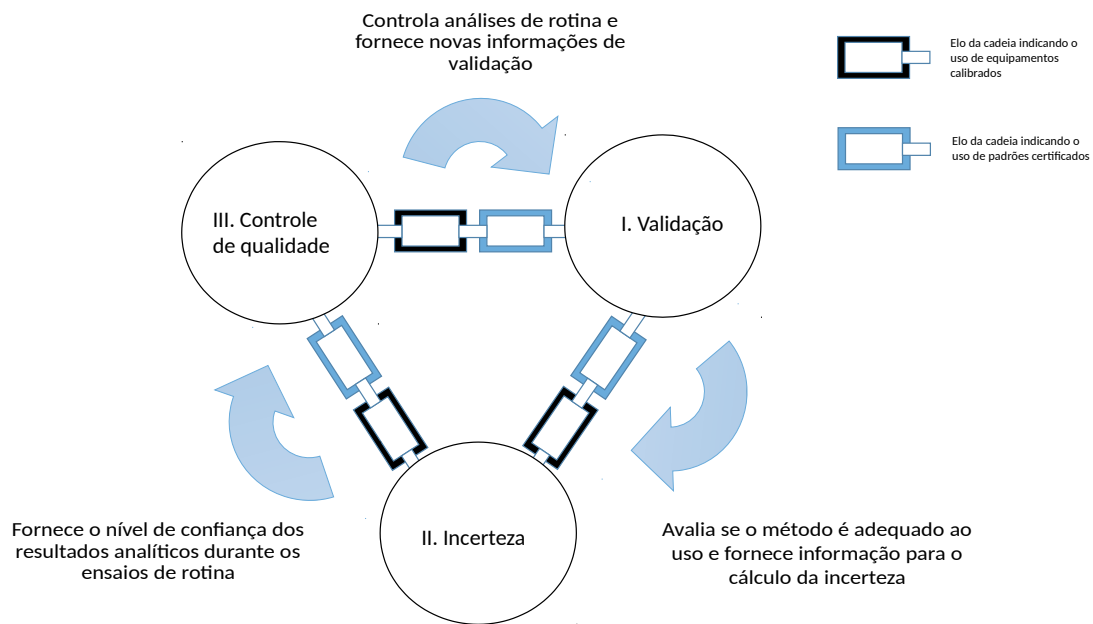


Figura 03. Ciclo de Garantia da Qualidade Analítica (Olivares; Antunes, 2012)

Parte 02

Validação de métodos para as áreas IQA (Identidade e Qualidade de Alimentos) e IQI (Identidade e qualidade de insumos)

1.0 Introdução:

1.1 Campo de Aplicação

Esta parte se aplica aos ensaios quantitativos das áreas BEV, POA, POV, AGR, FER, MEV e ALA. Destaca-se que para algumas áreas ou ensaios, existem algumas particularidades as quais estão descritas no anexo B deste documento. Desta maneira, deve-se aplicar a “Parte 02” para as áreas supracitadas, considerando, quando aplicável, as informações adicionais do anexo B.

1.2 Validação e Verificação/Confirmação de desempenho (itens 5.4.2 e 5.4.5 da ISO/IEC 17025:2005)

Considerando a existência de laboratórios que operam com métodos normalizados e novos métodos desenvolvidos, destaca-se:

- Para ensaios com métodos normalizados ou já validados por um Laboratório oficial: O ciclo (AQAC – Figura 03, Parte 01) aplica-se no emprego da verificação/confirmação de desempenho de métodos normalizados de análise, que tenham resultado satisfatório em Ensaio de Proficiência ou de Material de Referência ou de estudo colaborativo, conforme definido no Anexo A;
- Para novos métodos desenvolvidos: O ciclo aplica-se para a validação intralaboratorial de novos métodos conforme definido no Anexo A.

1.3 Cálculo de Incerteza (item 5.4.6 da ISO/IEC 17025:2005)

Com base nos resultados de validação ou verificação/confirmação de desempenho, a incerteza é calculada com base nas abordagens “validation based” e “bottom up”.

1.4 Controle de Qualidade (item 5.9 da ISO/IEC 17025:2005)

Quando os métodos são utilizados em rotina, é necessária a avaliação periódica dos mesmos para verificar se estes ainda produzem resultados confiáveis e metrologicamente rastreáveis. Existem inúmeras ferramentas para este propósito, no entanto, um requisito mínimo é discutido no item 3.4.

2.0 Objetivos

De acordo com a ISO/IEC 17025:2005 destaca-se a obrigatoriedade na validação de métodos. Apesar de esta validação ser aplicada para métodos não normalizados, a verificação/confirmação de desempenho dos métodos

normalizados também é obrigatória, pois segundo o item 5.4.2 da ISO/IEC 17025:2005, é necessária a confirmação de que o laboratório tem condição de operar adequadamente métodos normalizados antes de implantar os ensaios ou as calibrações;

Considerando as exigências da ISO/IEC 17025:2005, este procedimento tem por objetivo fornecer ferramentas e critérios para avaliar métodos normalizados e validar métodos não normalizados. Os resultados da validação ou verificação/ confirmação de desempenho são utilizados para cálculo de incerteza atendendo também ao requisito 5.4.6 da norma;

Como último requisito para aplicação do Ciclo de Garantia da Qualidade Analítica (AQAC – Figura 03, Parte 01) e obtenção da rastreabilidade metrológica dos resultados, são sugeridos requisitos mínimos de Controle da Qualidade discutidos no item 3.4.

3.0 Procedimentos

3.1 Verificação/confirmação de desempenho:

Avaliar as informações existentes do método normalizado com base no Anexo A (seguindo as setas de linha cheia na ordem superior da figura para inferior). Os métodos elegíveis de serem verificados por este Manual são aqueles que:

- Apresentam resultado satisfatório de EP e/ou;
- Apresentam resultado satisfatório no ensaio de MRC: essa avaliação pode ser realizada considerando o resultado obtido mais o seu limite de confiança (conforme Figura 01) ou incerteza de medição comparando com os valores declarados no certificado do MRC (devendo haver uma intersecção entre as faixas de resultados)

$$\bar{x} \pm t_{n-1} s / \sqrt{n}$$

Figura 01 – Avaliação do valor do MRC (Miller, 2005)

Onde:

\bar{X} = média das replicatas referentes à análise do MRC

t = t de Student para n números de replicatas

n = número de replicatas (no mínimo 5)

S = desvio padrão para número de n replicatas

- Apresentam resultados satisfatórios no estudo colaborativo/interlaboratorial (os estudos colaborativos devem ser planejados de forma tecnicamente e economicamente viável, sendo avaliado por ferramentas estatísticas apropriadas);

3.2 Validação intralaboratorial:

Avaliar as informações existentes do método com base no Anexo A (seguindo as setas de linha tracejada na ordem inferior da figura para superior).

Conforme o Anexo A, quando não existir teste de proficiência para o método, pode ser utilizado o MRC (essa avaliação pode ser realizada considerando o resultado obtido mais o seu limite de confiança (conforme Figura 01) ou incerteza de medição comparando com os valores declarados no certificado do MRC). Caso também não exista MRC, deve apresentar resultado satisfatório em estudo colaborativo.

3.2.1 Cálculos e critérios

3.2.1.1 Linearidade e faixa de trabalho

- “Linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras em uma dada faixa de concentração” (Inmetro, 2011). A faixa de trabalho compreende as concentrações em que a linearidade for atingida, definindo-se, assim, a curva de calibração correspondente;
- Para avaliação da linearidade (quando aplicável ao método), inicialmente deve ser definida a faixa de trabalho. Esta faixa já pode estar definida pelo próprio método normalizado ou pode ser definida pelo analista, com base na faixa de concentração do analito que se espera encontrar ou avaliar.

3.2.1.1.1 Procedimentos

- Realizar a fortificação (na matriz, extrato da matriz, água reagente ou conforme orientações do método) em no mínimo, cinco níveis de concentração, preferencialmente equidistantes, com pelo menos 03 replicatas de leitura ou amostras com preparo independente;
- Quando aplicável, a concentração alvo do analito (como por exemplo: limite legal; valor garantido do fabricante; entre outros) deve se situar no centro da faixa de trabalho;
- Construir a curva de calibração utilizando a média das replicatas para cada ponto;
- Calcular o r (coeficiente de correlação) e os resíduos (diferença percentual entre cada resposta e o valor predito na curva de calibração) para cada ponto (replicata).

3.2.1.1.2 Critérios de aceitabilidade

- $r \geq 0,99$;
- Inspeção visual da linearidade da curva e os resíduos individuais não devem ser maiores que $\pm 20\%$. Até um valor de resíduo acima deste limite em cada nível pode ser aceito por um teste de outlier (quando pelo menos for utilizado 5 replicatas por nível), como, por exemplo, Teste de Grubbs, conforme Figura 02 e Tabela 1, desde que o $r \geq 0,99$.

$$G = \frac{|\text{valor suspeito} - \bar{x}|}{s}$$

Figura 02– Cálculo de outlier segundo Grubbs

Onde:

\bar{x} = média dos valores

s = estimativa do desvio padrão destes valores

Tabela 1–Valores Críticos de G (P=0,05)

Número de Medidas	Valores Críticos
5	1,715
6	1,887
7	2,020
8	2,126
9	2,215
10	2,290

- O não atendimento dos critérios acima implica na necessidade em refazer a curva em todos os níveis ou de reavaliar a faixa primeiramente estabelecida, testando então uma faixa mais adequada;
- Alguns procedimentos analíticos não demonstram linearidade mesmo após qualquer tratamento. Nesses casos, a resposta analítica pode ser descrita por uma função que modela a concentração do analito na amostra.

3.2.1.2 Seletividade

- A seletividade é a extensão na qual um procedimento analítico pode determinar analito(s) particular(es) em mistura(s) ou matriz(es) sem a interferência de outros componentes de comportamento semelhante.

3.2.1.2.1 Procedimentos

- 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 (Inmetro, 2011). Estes efeitos devem ser avaliados por meio de um estudo.
- 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 (Inmetro, 2011).

3.2.1.2.2 Critérios de aceitabilidade

- Se a seletividade não for assegurada (por dados experimentais ou da literatura), a linearidade, a exatidão e a precisão podem ser seriamente comprometidas.

3.2.1.3 Precisão (repetitividade) / Exatidão

- Precisão é o grau de concordância entre os resultados obtidos nas mesmas condições operacionais (mesmo analista, mesmo equipamento, etc.) no menor intervalo de tempo possível. Pode ser utilizado Material de Referência, amostra de rotina, amostra fortificada;
- Os estudos de repetitividade podem ser realizados utilizando os dados do estudo de recuperação (amostra fortificada);
- Quando a amostra a ser utilizada apresentar concentração conhecida do analito de interesse (como por exemplo, MR, MRC ou amostra fortificada), é possível avaliar a exatidão pela diferença percentual do valor predito com a média dos resultados do estudo de precisão.

3.2.1.3.1 Procedimentos

- O laboratório deve realizar o maior número de repetições técnica e economicamente viáveis (Inmetro, 2011), com no mínimo dois níveis (ou duas amostras distintas, quando não for possível obter dois níveis de concentração) e 5 replicatas por nível, considerando, por exemplo, as faixas de trabalho aplicáveis, concentrações de interesse, Limites de Quantificação;
- Quando o método de ensaio não apresentar curva de calibração, o menor nível de concentração avaliado será adotado como LQ; desta maneira esta concentração deve ser adequadamente escolhida dentro das necessidades do laboratório;

- Calcular o Coeficiente de Variação das 5 replicatas por nível;
- Quando a amostra a ser utilizada apresentar concentração conhecida do analito de interesse ou valor da propriedade medida, avaliar a exatidão pela diferença percentual do valor predito com a média dos resultados do estudo de precisão.

3.2.1.3.2 Critérios de aceitabilidade

- Considerar a equação de Horwitz, utilizando a concentração média (na amostra ou extrato da amostra) do estudo de precisão para cada nível de concentração;
- O valor de Horwitz é derivado da equação de Horwitz, que estabelece para qualquer método:

$$\text{DPRr} = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

Figura 03. Equação de Horwitz (Miller, 2005)

Onde:

C = concentração do analito na amostra ou padrão

DPRr = desvio padrão das repetições;

- Quando Horwitz não for aplicável (quando são avaliadas medidas de propriedade como pH, condutividade, densidade, entre outros), deve ser adotado $CV \leq 20\%$;
- Quando for avaliada a exatidão, a diferença percentual do valor predito com a média dos resultados do estudo de precisão deve ser $\leq 20\%$.

3.2.1.4 Precisão intermediária

- É o grau de concordância entre os resultados obtidos em condições operacionais diferentes (analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes ou dias diferentes);
- Quando for realizado pelo mesmo analista, recomenda-se um intervalo de tempo superior à 24h.

3.2.1.4.1 Procedimentos

- Realizar no mínimo dois estudos de repetitividade (considerando todas as condições diferentes existentes no laboratório). Calcular o CV para cada um dos dois níveis (definidos no estudo de repetitividade).

3.2.1.4.2 Critério de aceitabilidade

- Considerar a equação de Horwitz;
- Quando Horwitz não for aplicável (quando são avaliadas medidas de propriedade como pH, condutividade, densidade, entre outros), deve ser adotado $CV \leq 20\%$;

3.2.1.5 Limite de quantificação

3.2.1.5.1 Procedimentos

- Para procedimentos analíticos que apresentam ruído na linha de base, o LQ pode ser determinado pela concentração do analito que fornece um sinal 10 vezes maior que o sinal da linha de base (relação sinal/ruído 10:1) (ICH, 2005);
- O LQ também pode ser estimado considerando-se 10 vezes o desvio padrão da concentração obtida para a amostra branca. Para ambos os casos deve ser demonstrado que o método apresenta exatidão e precisão para o LQ estimado;
- Na prática, o LQ corresponde normalmente ao padrão de menor concentração utilizado na curva de calibração (Inmetro, 2011);
- Em alguns casos onde a concentração é inversamente proporcional ao sinal analítico (como por exemplo, na análise de fósforo por espectrometria), o LQ será o ponto de maior concentração e menor sinal analítico;
- Quando o método de ensaio não apresentar curva de calibração, o menor nível de concentração avaliado pelo estudo de "Precisão (repetitividade) / Exatidão" será adotado como LQ; desta maneira esta concentração deve ser adequadamente escolhida dentro das necessidades do laboratório.
- Para amostras as quais são analisadas diluídas, os valores da curva não irão representar diretamente a concentração da amostra. Desta maneira a concentração do padrão de menor concentração não será o LQ, sendo necessário recalcular com base na diluição.
- Em alguns casos o cálculo do limite de quantificação pode não ser aplicado, devendo ser demonstrado que o laboratório tem capacidade em analisar as amostras dentro de uma faixa de trabalho (como por exemplo, para ensaios de pH, condutividade, turbidez, entre outros);

3.2.1.5.2 Critérios de aceitabilidade

O LQ deve ser coerente com os limites regulatórios estabelecidos, corroborando com a adequação do método ao propósito pretendido.

3.2.1.6 Teste de robustez

- O teste de robustez visa a avaliar alterações das condições experimentais, as quais podem ser expressas como uma lista dos materiais da amostra, das substâncias a analisar, das condições de armazenamento, das condições ambientais e/ou de preparação da amostra em que o método pode ser aplicado tal como apresentado ou com pequenas alterações específicas. Quando as variações destas condições não afetarem significativamente os resultados da análise, o método é considerado robusto para as condições avaliadas.
- Aplicar quando necessário para avaliar a variabilidade dos resultados frente as variações do método;

3.2.1.6.1 Procedimentos

- Para avaliação da robustez, pode ser aplicado o planejamento experimental fracionário de Youden;
- Selecionar no máximo 07 parâmetros para serem avaliados;
- Variar o valor de cada parâmetro (dentro de uma faixa de interesse);
- Caso não seja possível escolher 07 parâmetros, repetir parâmetros de maneira que sejam estabelecidos sempre 7 fatores;
- Aplicar o teste de Youden (Youden; Steiner, 1975);
- Para o teste de robustez, analisar amostras na concentração mais baixa do estudo da precisão intermediária.

3.2.1.6.2 Critério de aceitabilidade (Manual de Garantia da Qualidade Analítica, 2011)

- De posse dos valores dos efeitos e ou contrastes do planejamento fatorial realizado, é necessário verificar se o valor de algum efeito/contraste principal ou de interação de segunda ordem, demonstrado como significativo, é maior que três vezes o desvio-padrão da precisão intermediária (no mesmo nível de concentração) sR do procedimento analítico (Atenção: essa comparação é com sR e não com CV).

3.3 Cálculo de incerteza de medição (abordagens “bottom up” e “validation based”)

- Recomenda-se ser calculado com base no desvio padrão da precisão intermediária. Quando aplicável, calcular também com base no desvio padrão residual da curva de calibração, nas incertezas dos equipamentos e soluções padrão (principalmente quando as concentrações destas soluções se relacionam diretamente com o resultado da análise, como no caso da

análise titrimétrica) que afetam diretamente o resultado final (a incerteza calculada com base nos resultados de validação é denominada como abordagem “validation based” enquanto que o cálculo com base em todas as fases do método de ensaio incluindo as incertezas dos equipamentos é denominado abordagem “bottom up”);

- Os cálculos podem ser executados utilizando o Guia Eurachem-CITAC (2013);
- A seguir são apresentadas orientações para cálculo de incerteza dos parâmetros supracitados.

3.3.1. Incerteza da Linearidade (curva de calibração)

- Calcular conforme as fórmulas estabelecidas na Figura 04, Figura 05 e Figura 06:

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^n (c_j - \bar{c})^2$$

Figura 04 – Equação para cálculo do desvio padrão residual (S_{xx}) segundo guia Eurachem/Citac

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [A_j - (B_0 + B_1 \cdot c_j)]^2}{n - 2}}$$

Figura 05 – Equação para cálculo do desvio padrão residual (S) segundo guia Eurachem/Citac

$$Incerteza = \frac{S}{B_1} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_0 - \bar{C})^2}{S_{xx}}}$$

Figura 06 – Equação para cálculo de incerteza das variações aleatórias em y segundo guia Eurachem/Citac

Onde:

B = Coeficiente angular;

p = Número de medições para determinar a concentração dos analitos;

n = Número de medições para construção da curva de calibração;

C0 = Resultado de concentração da amostra analisada;

C = Valor médio dos diferentes níveis de concentração da curva;
 A_j = A enésima medição de área do enésimo padrão da curva
 (onde A_j = C_j.B1+B0);
 C_j = Concentração do enésimo padrão da curva;
 B0 = Ponto de intercepção do eixo das ordenadas.

- Para o cálculo da incerteza da curva de calibração, deve ser considerado quantas replicatas de análise é realizada durante a rotina analítica para definição do valor de p;
- Para escolha de C0, deve se considerar as necessidades do laboratório, podendo este valor ser definido como:
 1. O ponto de menor sinal analítico (sendo o de maior incerteza segundo Horwitz);
 2. O ponto da curva que representa a concentração alvo do analito, ou valor mais próximo deste (como por exemplo: limite legal; valor garantido do fabricante; entre outros);
 3. O resultado encontrado da amostra.

3.3.2 Incerteza da precisão intermediária

- Calcular a incerteza pela somatória do desvio padrão (Figura 07) calculada nos dois níveis de concentração estudados.

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Figura 07 – Cálculo de Desvio Padrão

- Somar as incertezas para os dois níveis de concentração utilizando a Equação da Figura 08:

$$u_c(y(p, q...)) = \sqrt{u(p)^2 + u(q)^2 + \dots}$$

Figura 08 – Cálculo para somatória das incertezas de dois níveis de concentração

Onde:

u (y(p,q)= soma das incertezas

u(p), u(q) etc = valores de cada incerteza a ser somada

3.3.3 Incerteza de equipamentos

- Para o cálculo da incerteza referente aos equipamentos é necessário avaliar as informações disponíveis dos mesmos. Com base nestas informações, calcular a incerteza padrão conforme exemplificado na Tabela 2.

Tabela 2 – Informações e divisores para cálculo da incerteza de equipamentos

Informação disponível	Valor do divisor para cálculo da incerteza padrão
Incerteza expandida expressa no certificado de calibração.	Dividir pelo valor de K expresso no certificado.
Vidraria que não apresenta certificado de calibração, mas apresenta classe de tolerância.	Dividir por raiz de 6 considerando uma distribuição triangular.
Equipamento que não apresenta certificado de calibração, mas apresenta classe de tolerância.	Dividir por raiz de 3 considerando uma distribuição retangular.

3.3.4 Incerteza de soluções

- Para o cálculo de incerteza das soluções padrão, principalmente quando as concentrações destas soluções se relacionam diretamente com o resultado da análise, como no caso da análise titrimétrica, é necessário o cálculo da incerteza desta solução para ser considerada na incerteza final;
- Quando a solução adquirida apresentar certificado com o valor de sua incerteza declarada, dividir esta incerteza pelo valor de expansão K para ser considerada no cálculo final;
- Quando for necessário preparar a solução, devem ser considerados os equipamentos para sua preparação (como balanças, micropipetas e balão volumétrico);
- Caso a solução seja padronizada em laboratório, considerar os equipamentos e o desvio padrão dos resultados da padronização;
- As abordagens para cálculo da incerteza de soluções são apresentadas na Figura 09.

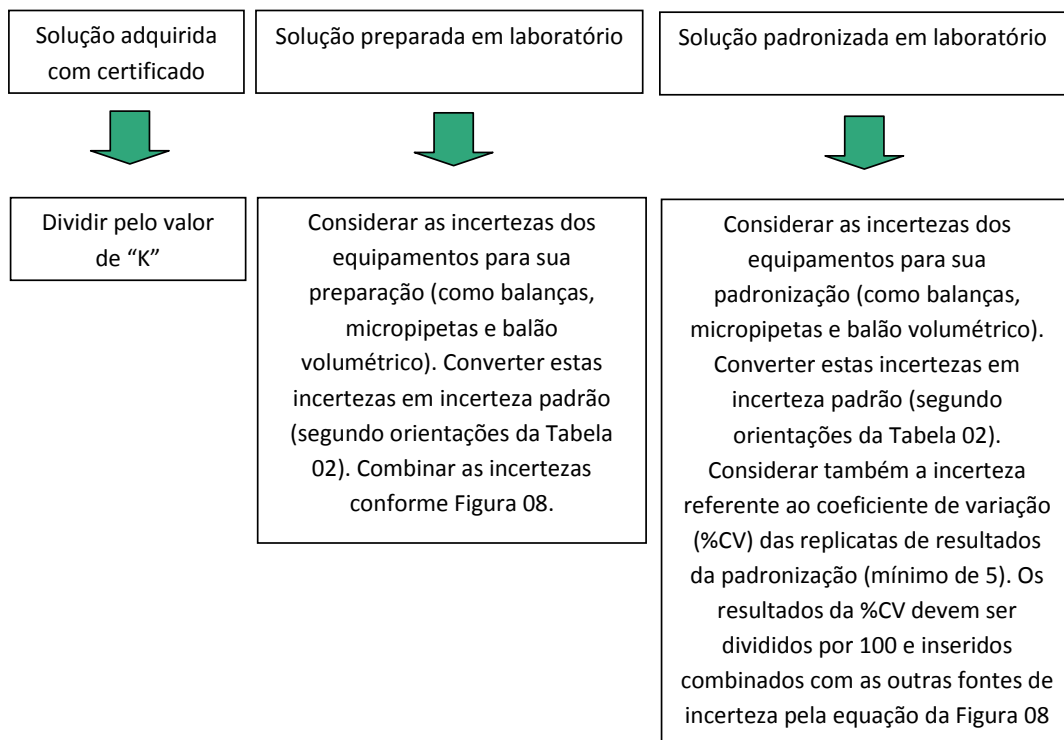


Figura 09 – Abordagens para cálculo da incerteza de soluções

3.3.5 Cálculo da incerteza combinada e expandida

- Quando for calculada a incerteza da linearidade e precisão intermediária, a soma para obter a incerteza combinada deve ser realizada conforme Figura 08 (as incertezas devem estar na mesma unidade de medida, caso se apresentem em unidades diferentes, converter cada incerteza em incerteza percentual de seu mensurando e realizar o cálculo);
- Para cálculo da incerteza expandida, utilizar o valor de T Student com 4 graus de liberdade e 95% de nível de confiança (2,78).

3.4 Controle de qualidade

- Após um método ser validado ou verificado/confirmado o desempenho e calculada a incerteza, devem ser aplicados controles de qualidade intralaboratorial durante a rotina;
- Entre as diferentes amostras de controle, recomenda-se a utilização de Material de Referência, amostras fortificadas ou as próprias amostras de rotina analisadas em duplicata que devem ser analisadas para cada batelada

de amostras;

- As amostras de controle devem ser avaliadas por cartas de controle;
- Entre os diferentes tipos de cartas de controle, podem ser aplicadas as cartas de controle das médias – Shewhart (Konieczka; Namiesnik, 2009) ou amplitude (Funk; Dammann; Donnevert, 2007) conforme apresentado a seguir.

3.4.1 Cartas de controle das médias (Shewhart) (Konieczka; Namiesnik, 2009)

- Analisar entre 10 e 20 amostras;
- Eliminar os outliers por testes estatísticos apropriados;
- Calcular a média e desvio padrão dos resultados;
- Realizar um teste de hipótese sobre a diferença estatística insignificante entre o valor obtido e o esperado utilizando um teste T (Figura 10);
- Caso t calculado for menor que o tabelado, plotar a carta;
- Marcar o número consecutivo de resultados no eixo X do gráfico e os valores das características observadas no eixo y;
- Marque uma linha central no gráfico correspondendo ao valor de referência (CL);
- Traçar 02 linhas paralelas acima da linha central e duas abaixo, correspondendo a $\pm 2S$ (upper warning limit - UWL e lower warning limit - LWL) e $\pm 3S$ (upper action limit-UAL e lower action limit - LAL);
- Com a carta preparada continuar a inserir os dados de controle e avaliar conforme Tabela 03;

$$t = \frac{|x_m - \mu|}{SD} \sqrt{n}$$

Figura 10 – Teste T

Onde:

Xm = Média dos resultados

U = Valor predito

SD = Desvio Padrão

n = Número de replicatas

Tabela 03 – Condições para avaliação da carta de Shewart

01	Caso um resultado seja adicionado dentro da faixa WL, este valor é considerado aprovado;
02	Valores obtidos entre a faixa AL e WL são aceitos, no entanto não podem ser mais que 02 em 20 determinações;
03	Caso um resultado seja encontrado fora do limite de AL, ou caso existam 07 valores consecutivos criando uma tendência (acima ou abaixo), deve ser realizada uma avaliação do método;
04	03 valores consecutivos entre AL e WL podem indicar problemas no ensaio;
05	02 valores consecutivos entre AL e WL, do mesmo lado da média podem indicar problemas no ensaio;
06	10 valores consecutivos do mesmo lado da linha média.

3.4.2 Cartas de controle de amplitude (Funk; Dammann; Donnevert, 2007)

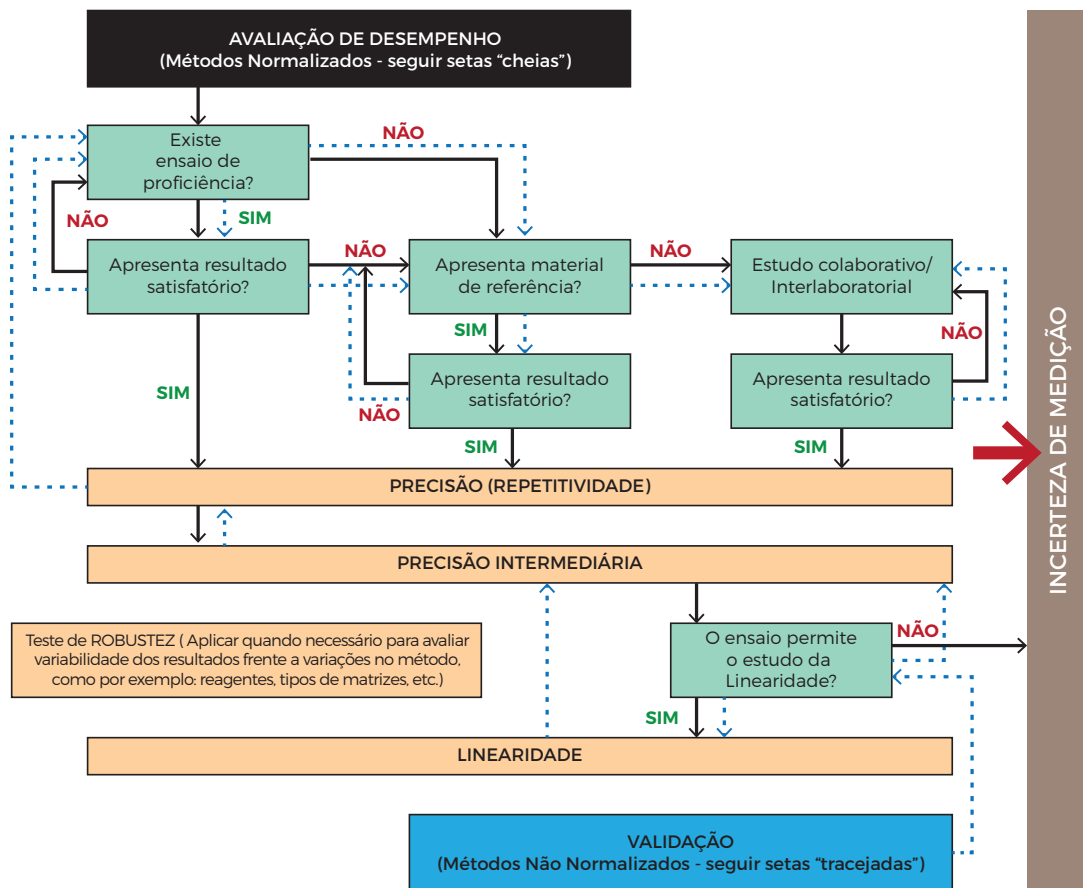
- Analisar entre 10 e 20 amostras em duplicata;
- Calcular a amplitude relativa (diferença entre os resultados divididos pela média e multiplicados por 100) para cada duplicata;
- Considerar que em alguns ensaios a amplitude relativa não é diretamente proporcional a concentração da amostra. Nestes casos, pode se estudar o uso de mais de uma carta de controle contemplando diferentes níveis;
- Eliminar os outliers dos resultados de amplitude por testes estatísticos apropriados;
- Calcular a média da amplitude;
- Marcar o número consecutivo de resultados no eixo X do gráfico e os valores das características observadas no eixo y;
- Marque uma linha central no gráfico correspondendo ao valor de referência;
- Traçar 02 linhas paralelas acima da linha central e duas abaixo, correspondendo a: Limite superior de aviso (média da amplitude x 2,809); Limite inferior de aviso (média da amplitude x 0,039); Limite superior de ação (média da amplitude x 3,267); Limite inferior de ação (média da amplitude x 0,000);
- Com a carta preparada, avaliar amostras em duplicata na rotina (conforme frequência estabelecida segundo as necessidades de cada unidade) e continuar a inserir os dados de controle avaliando conforme Tabela 04;

Tabela 04 – Situações fora de controle para avaliação da carta de amplitude

01	Valor acima do Limite superior de ação;
02	07 valores consecutivos criando uma tendência (acima ou abaixo);
03	07 valores consecutivos acima da amplitude média.

Anexo A

Fluxograma 1. Validação, verificação/confirmação de desempenho



Nota: Quando forem obtidos resultados insatisfatórios de Ensaio de Proficiência, ensaios de MRC ou estudos colaborativo/interlaboratorial deve ser aplicado o procedimento de Controle de trabalho não-conforme.

Anexo B

Especificidades quanto à validação, verificação/confirmação de desempenho, cálculo de incerteza de medição e controle de qualidade intralaboratorial para métodos específicos do IQA e IQI

Área MEV/IQI

B.1 DETERMINAÇÃO DE TEOR DE PRINCÍPIOS ATIVOS EM MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS

Abaixo estão descritas as especificidades para a determinação de teor de princípios ativos de medicamentos veterinários em formulações comerciais. Sempre que houver alguma divergência entre esse anexo e o texto principal ou mesmo algum critério diferente, este texto é prioritário em relação ao texto principal por se tratar de um procedimento cromatográfico específico.

Conformidade do sistema analítico

No caso de procedimentos cromatográficos é necessário garantir que o sistema analítico esteja apto para realizar as análises a que se propõe.

Procedimento:

- Se houver critério específico definido em monografia oficial deve-se seguir essa recomendação.
- Se não houver, deve-se garantir, no mínimo, os parâmetros de resolução entre picos, fator de assimetria e número de pratos, conforme critérios de aceitabilidade descritos a seguir.

Critério de aceitabilidade:

- Fator de assimetria do pico (calculado a 10% da altura do pico): entre 0,9 e 1,2
- Número de pratos ≥ 2000
- Resolução $\geq 2,0$

Seletividade

Procedimento:

- Avaliar a pureza do pico do padrão e de uma amostra que contenha o ativo através da avaliação do espectro no decorrer do pico, podendo-se utilizar detectores de arranjo de fotodiodos, espectrômetros de massas ou outros. No caso de detectores que não permitam essa avaliação, o estudo pode ser realizado através de cromatogramas obtidos de colunas cromatográficas com características diferentes.
- Submeter o fármaco a condições de estresse (por ex. luz, calor, hidrólise ácida/básica, oxidação) e avaliar os cromatogramas uma e 24 horas após o início do estudo para garantir que produtos de degradação não venham a interferir no sinal analítico.
- Analisar todos os reagentes utilizados durante o processo analítico.

Critério de aceitabilidade:

- Comprovação de que o sinal medido corresponde somente ao analito de interesse.

Faixa Linear e Linearidade

Procedimento:

- Definir a faixa linear do método através de uma curva de calibração do analito no solvente (curva dinâmica).
- Para o ensaio de linearidade, estabelecer uma curva de calibração do analito no solvente (situada dentro da faixa linear previamente estabelecida) que compreenda o intervalo de 50 a 150 % do teor alvo.
- Avaliar a presença de possíveis valores extremos através do teste de Grubbs, resíduos padronizados Jackknife ou outro teste. Valores extremos podem ser retirados do conjunto de dados em um máximo de 22,2 %.
- Aplicar o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) e estimar o coeficiente de correlação linear, o intercepto e a inclinação, assim como suas incertezas.
- Realizar a inspeção visual do gráfico de resíduos da regressão x concentração do analito.

Critério de aceitabilidade:

- $r \geq 0,99$
- Distribuição aleatória dos resíduos ao redor do eixo x e nenhuma tendência.

Efeito Matriz

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

O estudo de efeito matriz é imprescindível quando se deseja quantificar o analito (tanto na validação quanto na rotina analítica) mediante padronização externa, ou seja a partir da curva de calibração do analito em solvente. Este estudo precisará ser realizado para toda nova formulação recebida pelo laboratório de fiscalização.

Procedimento:

- Analisar a amostra pelo método de adição-padrão em triplicata independente. Neste procedimento a curva deve ter no mínimo 5 níveis de concentração (amostra mais 4 adições de padrão) sendo o que o último nível não deva estar acima da faixa linear previamente definida.
- Aplicar o Teste F para verificar se as variâncias da curva de calibração do analito no solvente (obtida do estudo da linearidade) e da curva de adição-

padrão são estatisticamente iguais. Considerar as inclinações das duas curvas ou os resultados de concentração das duas curvas para a realização do teste.

- Se $F_{calc} < F_{tab}$, considera-se variâncias iguais, ou seja, a matriz não tem efeito sobre a precisão do método. Neste caso, os desvios-padrão dos dois grupos podem ser agrupados e a igualdade das médias dos dois conjuntos de amostras pode ser testada com a distribuição t de Student (Teste t);
- Se $F_{calc} > F_{tab}$, considera-se variâncias diferentes, ou seja, a matriz pode ter efeito sobre a precisão do método. Verifica-se então o efeito matriz através do Teste t considerando que as variâncias são diferentes.

Critérios de aceitabilidade:

- Se $t_{calc} < t_{tab}$, conclui-se que não há efeito matriz e pode-se utilizar a curva de calibração do analito no solvente para quantificar o analito na formulação em estudo.
- Se $t_{calc} > t_{tab}$, conclui-se que há efeito matriz e será necessário quantificar o analito na formulação mediante o método de adição padrão.

Precisão (repetitividade)

Procedimento:

- Conforme descrito na Parte 03 do documento

Critério de aceitabilidade:

- Conforme descrito na Parte 03 do documento.

Precisão intermediária

Procedimento:

- Conforme descrito na Parte 03 do documento.

Critério de aceitabilidade:

- Conforme descrito na Parte 03 do documento.

OBS: o estudo da exatidão, conforme descrito na Parte 03 do documento, só se aplica no caso do laboratório optar por quantificar os fármacos com curvas de calibração do analito no solvente.

Limite de quantificação

Não aplicável para determinação de teor do princípio ativo em medicamentos veterinários.

Robustez

Procedimento:

- Conforme descrito na Parte 03 do documento.

Critério de aceitabilidade:

- Conforme descrito na Parte 03 do documento.

Incerteza de Medição

Procedimento:

- Conforme descrito na Parte 03 do documento.

Controle de qualidade

Procedimento:

- Conforme descrito na Parte 03 do documento.

Observações gerais

- Os ensaios de seletividade, efeito matriz, precisão (repetitividade) e precisão intermediária podem ser realizados com uma amostra comercial aleatoriamente selecionada ou, caso o laboratório disponha de placebos, no próprio placebo.
- O teste da pureza do pico (seletividade) deve ser realizado para cada nova amostra a ser analisada pelo laboratório, já que as indústrias utilizam correlatos e excipientes diferentes em suas formulações.
- Caso o laboratório decida realizar a quantificação dos fármacos pelo método de adição-padrão, o estudo do efeito matriz não se faz necessário.
- Os ajustes da curva analítica não devem ser forçados a passar pela origem.
- Quando forem utilizados métodos compendiais, devem ser realizados, no mínimo, os estudos de seletividade, precisão e exatidão do método.
- Toda batelada analítica deve obrigatoriamente ser adicionada de amostras controle. Essas devem ser monitoradas através do uso de cartas controle.
- Sempre que o resultado de uma amostra comercial for obtido a partir de uma curva de calibração do analito no solvente, o resultado deverá ser corrigido pela recuperação de uma amostra controle analisada na mesma batelada analítica.

Bibliografia

USP, 2014. United States Pharmacopeia, 37nd ed, Rockville: United States Pharmacopeial Convention; 2013.

MAPA, 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica: Fármacos e Contaminantes em Produto para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários. Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília, 2011.

NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods, <http://www.itl.nist>.

gov/div898/handbook/eda/section3/eda35h1.htm.

GRUBBS, F. Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples. *Technometrics*, 11(1), 1-2, 1969.

HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. *Pure Appl. Chem.*, 67, 331-343, 1995.

Área POA/IQA

B.2 ANÁLISE DE HISTAMINA PARA CONTROLE DE PESCADO E SEUS DERIVADOS

Utilizar os critérios de aceitabilidade dos parâmetros previstos na INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 25, DE 2 DE JUNHO DE 2011. Para os parâmetros que não possuírem critérios estabelecidos, aplicar aqueles constantes na Parte 02 deste Manual.

Anexo C

Glossário: Definições, Vocábulos, Termos,
Siglas e Abreviações

- Validação é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos (item 5.4.5.1 – ISO/IEC 17025:2005);
- Avaliação de desempenho é a confirmação de que o laboratório tem condição de operar adequadamente métodos normalizados antes de implantar os ensaios ou as calibrações. Se o método normalizado mudar, a confirmação deve ser repetida (item 5.4.2 – ISO/IEC 17025:2005);
- Ensaio de proficiência (EP) é a determinação de desempenho de ensaio de laboratórios, através de comparações interlaboratoriais;
- Comparação interlaboratorial – organização, desempenho e avaliação de ensaios nos mesmos itens, ou em itens de ensaio similares, por dois ou mais laboratórios de acordo com condições predeterminadas;
- Material de referência (MR) – material ou substância que tem um ou mais valores de propriedades que são suficientemente homogêneos e bem estabelecidos, para ser usado na calibração de um aparelho, na avaliação de um método de medição ou atribuição de valores a materiais;
- Material de referência certificado (MRC) – material de referência, acompanhado por um certificado, com um ou mais valores de propriedades, e certificado por um procedimento que estabelece sua rastreabilidade à obtenção exata da unidade na qual valores da propriedade são expressos, e cada valor certificado é acompanhado por uma incerteza para um nível de confiança estabelecido;
- Precisão – 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);
- Precisão (repetitividade) – 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, amostra de concentração conhecida ou adição do analito ao branco da amostra, em várias concentrações na faixa de trabalho;
- Precisão intermediária – de acordo com a ISO 5725-3, 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; diferentes tempos. Esta medida de precisão representa a variabilidade dos resultados em um laboratório. Na maioria dos casos,

o valor de precisão intermediária é função do nível de concentração do ensaio e o seu cálculo é efetuado, preferencialmente, a partir dos resultados obtidos, após eliminação dos resultados discrepantes. A visualização gráfica dos valores também pode ser útil para identificá-los;

- Linearidade – corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância (analito) em exame;
- Incerteza de medição – de acordo com o VIM trata-se de um parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas, ou seja, este não possui influência contraproducente definindo uma faixa para o resultado obtido de acordo com as práticas metodológicas utilizadas. A incerteza de medição compreende componentes provenientes de efeitos sistemáticos, tais como componentes associadas a correções e valores atribuídos a padrões, assim como a incerteza definicional. Algumas vezes não são corrigidos efeitos sistemáticos estimados; em vez disso são incorporadas componentes de incerteza de medição associadas;
- Limite de detecção (LD) – é a menor quantidade de um analito que pode ser detectado em uma amostra, mas não necessariamente quantificado como um valor exato;
- Limite de quantificação (LQ) – é a menor quantidade de um analito que pode ser quantitativamente determinada em uma amostra com adequada precisão e exatidão;
- Robustez – susceptibilidade de um procedimento analítico a alterações das condições experimentais, as quais podem ser expressas como uma lista dos materiais da amostra, das substâncias a analisar, das condições de armazenamento, das condições ambientais e/ou de preparação da amostra em que o método pode ser aplicado tal como apresentado ou com pequenas alterações específicas. Relativamente a todas as condições experimentais que possam, na prática, estar sujeitas a variações (por exemplo, estabilidade dos reagentes, composição da amostra, pH, temperatura), devem ser indicadas quaisquer alterações susceptíveis de afetar os resultados analíticos (Manual de Garantia de Qualidade Analítica, 2011);
- Incerteza de medição – parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas. (VIM, 2012);
- Abordagem “validation based” – é baseada em estudos de validação inter e intralaboratórios (precisão, exatidão, robustez). O cálculo é geralmente baseado no desvio padrão das informações disponíveis (Olivares, 2012);
- Abordagem “bottom up”- é baseado na identificação, quantificação e combinação de todas as fontes individuais de incerteza. Geralmente é uma abordagem mais complexa, pois considera todas as fontes de incerteza do método analítico. Este cálculo é aplicado utilizando principalmente

a incerteza dos equipamentos volumétricos (ex. Frascos volumétricos e micropipetas, balanças e outros instrumentos que requerem calibração, os quais geralmente apresentam suas incertezas expandidas expressas em seus certificados de calibração) (Olivares, 2012).

Anexo D

Referências Bibliográficas

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos. 3. ed. Campinas, SP: Editora Unicamp, 2007. ISBN 978-85-268-0753-2.

ELLISON, S. L. R.; BARWICK, V. J.; FARRANT, T. J. D. Practical statistics for the analytical scientist – a bench guide. Cambridge: RSC Publishing, 2009. ISBN 978-0-85404-131-2.

MASSART, D. L. et al. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics – Part A. Amsterdam: Elsevier, 1997. ISBN 0-444-89724-0 Set ISBN 0-444-82854-0.

MILLER, J. N.; MILLER, J. C. Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry. 5th ed. Harlow, England: Pearson Prentice Hall, 2005. 268 p. ISBN-10: 0-13-129192-0, ISBN-13: 978-0131291928.

Algoritmo Simplex. Disponível em: <www.chem.uoa.gr/applets/AppletSimplex/Apppl_Simplex2.html>. Esse sítio tem um simulador gráfico do algoritmo Simplex. Disponível em: <www.grabitech.se/algorithm.html>. Acesso em: 16 dez. 2010.

SOUZA, S. V. C. de. Procedimento para Validação Intralaboratorial de Métodos de Ensaio: delineamento e aplicabilidade em análise de alimentos. 2007. Tese (Doutorado) – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, 2007. E-mail: <scheillavitorino@terra.com.br>.

Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. Document No. SANCO/12495/2011 de 01/01/2012).

Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro). Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos, Doq-Cgcre-008-Rev.04, 2011.

ICH – International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation Of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), Step 4 Version, 2005.

Eurachem/CITAC , Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. 3rd ed., 2012.

Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Requisitos gerais para a competência de laboratórios, ABNT NBR ISO/IEC 17025, 2005.

Resolução - RE Nº 899, de 29 de Maio de 2003 - Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos.

OLIVARES, I.R.B.; LOPES, F.A. Essential steps to providing reliable results using the Analytical Quality Assurance Cycle Trends in Analytical Chemistry, Vol. 35, 2012.

Manual de Garantia da Qualidade Analítica - Resíduos e Contaminantes em Alimentos. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2011.

Vocabulário Internacional de Metrologia Conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM 2012). Instituído pela Portaria n.º 232, de 08 de maio de 2012.

YOU DEN, W.J.; STEINER, E.H. Statistical Manual of the AOAC, 1975.

KONIECZKA, P.; NAMIESNIK, J. Quality Assurance and Quality Control in the Analytical Chemical Laboratory – A Practical Approach. CRC press Taylor & Francis Group. 2009.

FUNK, W.; DAMMANN, V.; DONNEVERT, G. Quality Assurance in Analytical Chemistry. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. 2007.



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO

