



TC
Kestel
mye...
2011

**PRODUÇÃO TÉCNICO CIENTÍFICA
DO IPEN
DEVOLVER NO BALCÃO DE
EMPRÉSTIMO**

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS EM LABORATÓRIOS ANALÍTICOS

João C. Ulrich - jculrich@net.ipen.br

Jorge E.S. Sarkis - jesarkis@net.ipen.br

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP

Travessa R, 400 – Cidade Universitária – CEP 05508-900 – São Paulo – SP – Brasil

Resumo. Em geral, o termo validar pode ser definido como: “dar validade”, “tornar válido” ou “tornar legítimo”, segundo o dicionário de Holanda Ferreira (1975). Em um laboratório analítico os procedimentos de validação de metodologias devem fazer parte de um programa de qualidade e servir de parâmetros de referência para o início de qualquer novo desenvolvimento.

A ação de validar é realizada com o intuito de estabelecer detalhadamente as incertezas envolvidas em cada etapa da metodologia analítica, garantindo com isso a obtenção de resultados reprodutíveis e confiáveis. O processo de validação requer o controle de diversos parâmetros, tais como calibrações de equipamentos, vidraria de laboratório e elaboração de gráficos de controle. O Laboratório de Caracterização Isotópica do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/CNEN-SP, implantou o programa de qualidade em 1987, e desde então mantém o controle desses parâmetros.

Neste trabalho serão discutidos os procedimentos adotados no Laboratório de Caracterização Isotópica e exemplos de validação analítica.

Palavras-chave: Validação, Laboratórios analíticos

1. INTRODUÇÃO

O objetivo de um programa de qualidade consiste em estabelecer um conjunto de atividades que garanta a confiabilidade de produtos e serviços.

A análise química está presente em todas as atividades do dia a dia, como por exemplo: assegurar o controle ambiental, alimentos e produtos da agricultura, a qualidade de dietas, o tratamento de insumos industriais, a pesquisa e desenvolvimento nos setores químico e farmacêutico.

Dessa forma, os procedimentos adotados devem fornecer resultados não somente confiáveis como também permitir a sua rastreabilidade.

Validar um método é o processo de demonstrar que a sequência analítica adotada é capaz de produzir resultados confiáveis e reprodutíveis. Dessa forma, um método analítico deve ser submetido a estudos laboratoriais que demonstrem que o mesmo atenda às exigências requeridas pelo tipo de determinação a que se destina.

7765
A54

Encontram-se na literatura vários estudos sobre procedimento de validação, como por exemplo Chasin et al. (1994), Massart et al. (1994), Carril et al. (1997) e Tapparo et al. (1995).

Basicamente, existem três concepções para estes procedimentos: 1) validar toda a sequência analítica, esta proposta envolve o controle desde os estágios preparatórios, tais como dissolução e digestão das amostras, até o resultado final das medidas; 2) validar sobre uma faixa de concentração: isto ocorre quando a metodologia utilizada é linear em apenas uma faixa de concentração em estudo; e 3) validar uma metodologia que pode ser aplicada a diferentes tipos de amostras.

O laboratório de Caracterização Química do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/CNEN-SP, em seu Sistema da Qualidade implantado mantém o controle de todos os parâmetros para assegurar a correta validação conforme descrito por Ulrich et al. (1996).

O procedimento de validação inclui todos os procedimentos utilizados no desenvolvimento de uma metodologia analítica. Dessa forma para garantir a qualidade dos resultados devem ser controlados todos os fatores que de alguma forma influenciem nas etapas intermediárias do processo, tais como: a) a calibração da balança e dos balões volumétricos, quando utilizados, foi realizada e o gráfico de controle confeccionado; b) o equipamento a ser utilizado nas análises é periodicamente verificado; c) as condições ambientais para as análises são mantidas. Assim, antes de iniciar os estudos laboratoriais geralmente utilizados na validação de um método (especificidade, linearidade, exatidão, precisão, sensibilidade, limites de detecção e determinação), é necessário verificar se os parâmetros referentes às questões acima estão controlados.

2. CONTROLE DE PARÂMETROS

O controle dos parâmetros no laboratório é realizado por todos os usuários a fim de garantir a homogeneidade e consistência dos resultados obtidos. Esses parâmetros influem de forma significativa em todas as atividades desenvolvidas no laboratório. Os limites de controle inferior e superior, nos gráficos, são calculados segundo a teoria de gráficos de controle para valores individuais, descrita por Feigenbaum (1994). Como exemplo de controle de equipamento apresenta-se o gráfico da análise isotópica de urânio em um Espectrômetro de Massas Termoiônico.

Calibração da Balança Analítica. A calibração se realiza mediante a utilização de padrões em uma ampla faixa da escala de massa da balança. A partir das massas obtidas tem-se um valor médio para cada medida e os limites de controle da balança.

Na figura 1, é apresentado um gráfico de controle da calibração. Observa-se no gráfico a consistência dos valores obtidos para diferentes operadores ao longo do ano corrente. Quando algum valor apresenta-se acima do limite superior ou abaixo do limite inferior de controle, é realizado uma análise crítica do evento com os operadores para identificação das causas do desvio.

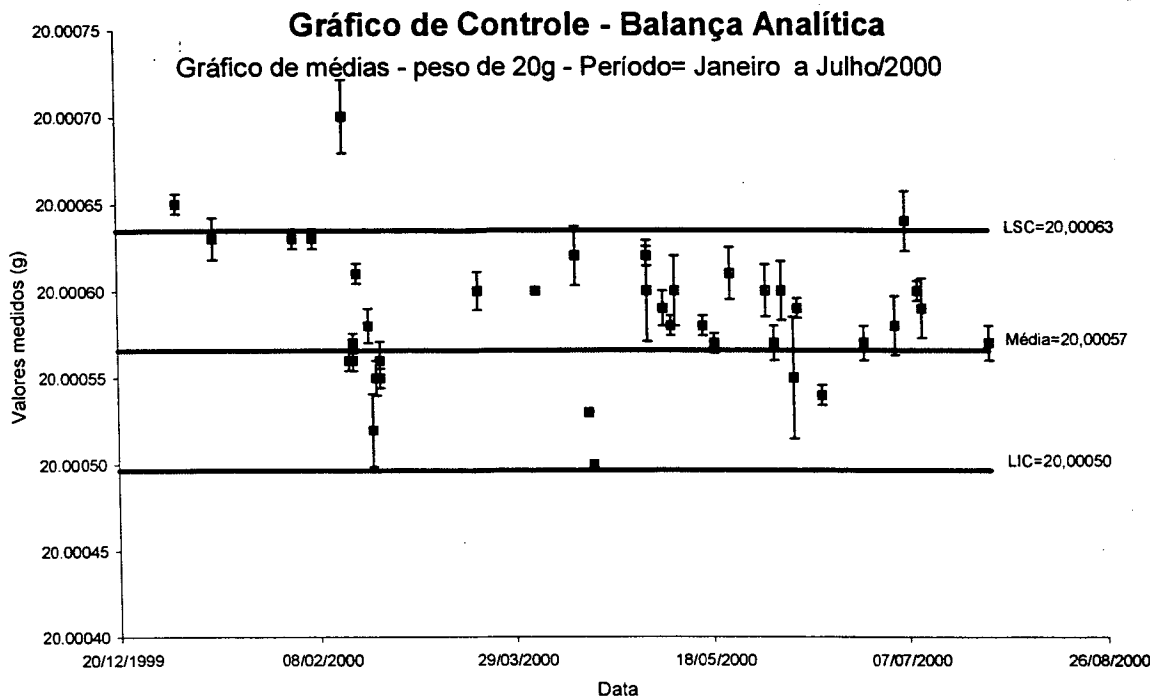


Figura 1. Gráfico de Controle da Balança

Calibração de Materiais de Vidro. Os fabricantes de material volumétrico calibram seus materiais antes de colocá-los no mercado, indicando o volume que podem comportar ou transferir, a incerteza com que se medirá este volume e a temperatura na qual ele foi calibrado.

A medida da capacidade de um balão volumétrico se realiza a partir da massa de volume de água contido no interior do balão a uma determinada temperatura e uma constante de conversão denominada densidade. Na figura 2 é apresentado um exemplo de gráfico de controle da calibração de balões volumétricos realizadas em nosso laboratório.

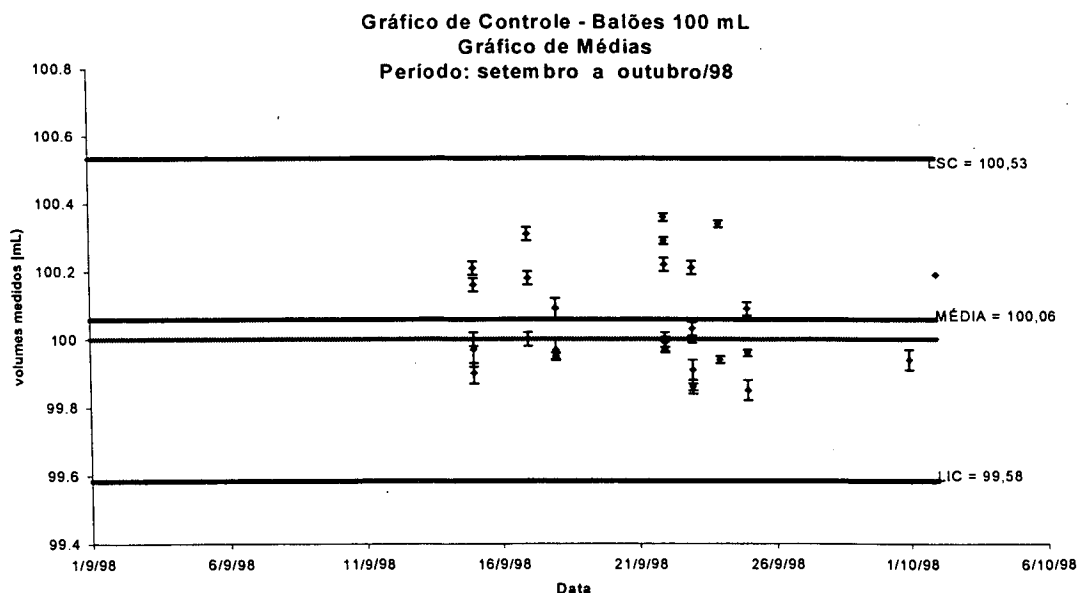


Figura 2. Gráfico de Controle de Balão Volumétrico

Calibração de Micropipetas automáticas. As micropipetas apresentam papel fundamental nas metodologias de preparação de amostras que se baseiam em volume. Se uma micropipeta apresentar um volume variável durante a preparação de soluções, principalmente de solução-padrão, a curva analítica apresentará distorções às quais refletirão certamente nos resultados obtidos. Assim, o laboratório periodicamente faz a calibração das micropipetas e compara com o resultado emitido no certificado de cada micropipeta. Na figura 3 é apresentado o gráfico de calibração de uma micropipeta utilizada em nosso laboratório.

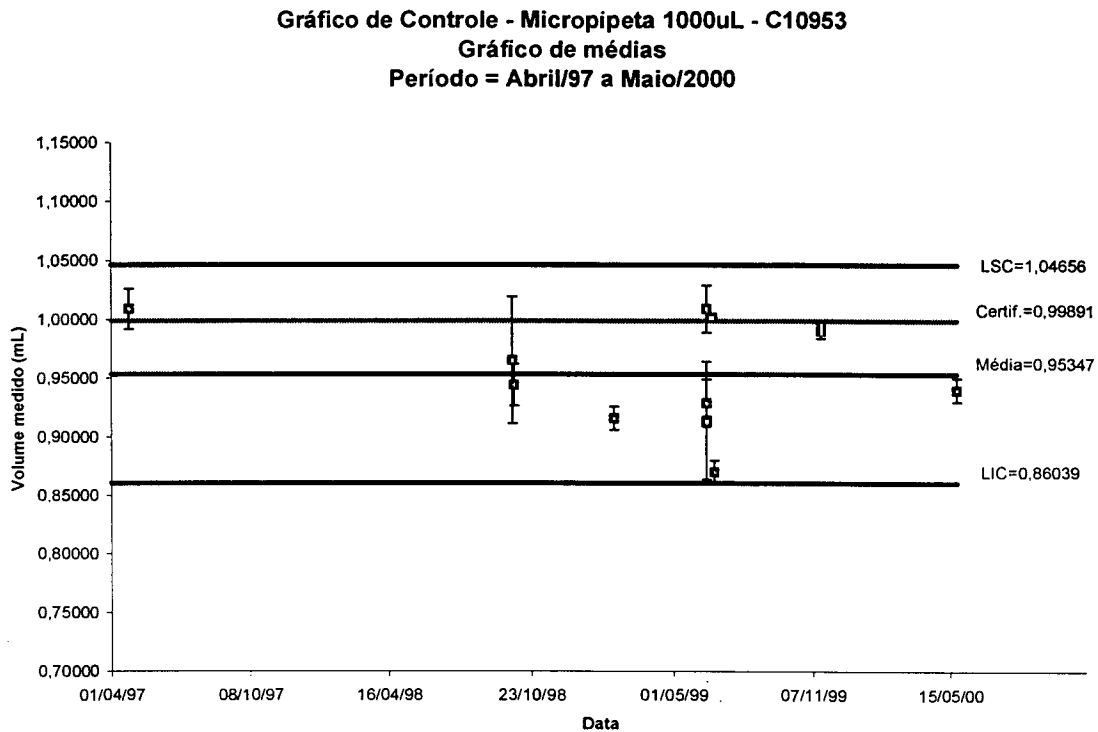


Figura 3. Gráfico de Controle de micropipetas

Calibração do Espectrômetro de Massas Termoiônico. Prepara-se padrões utilizando-se os mesmos procedimentos analíticos propostos para as amostras e se calibra nas mesmas condições de análise. Dessa forma tem-se a certeza de que todas as condições para padrões e amostras forma igualmente mantidas.

Na figura 4 apresenta-se o gráfico de controle da análise de um padrão.

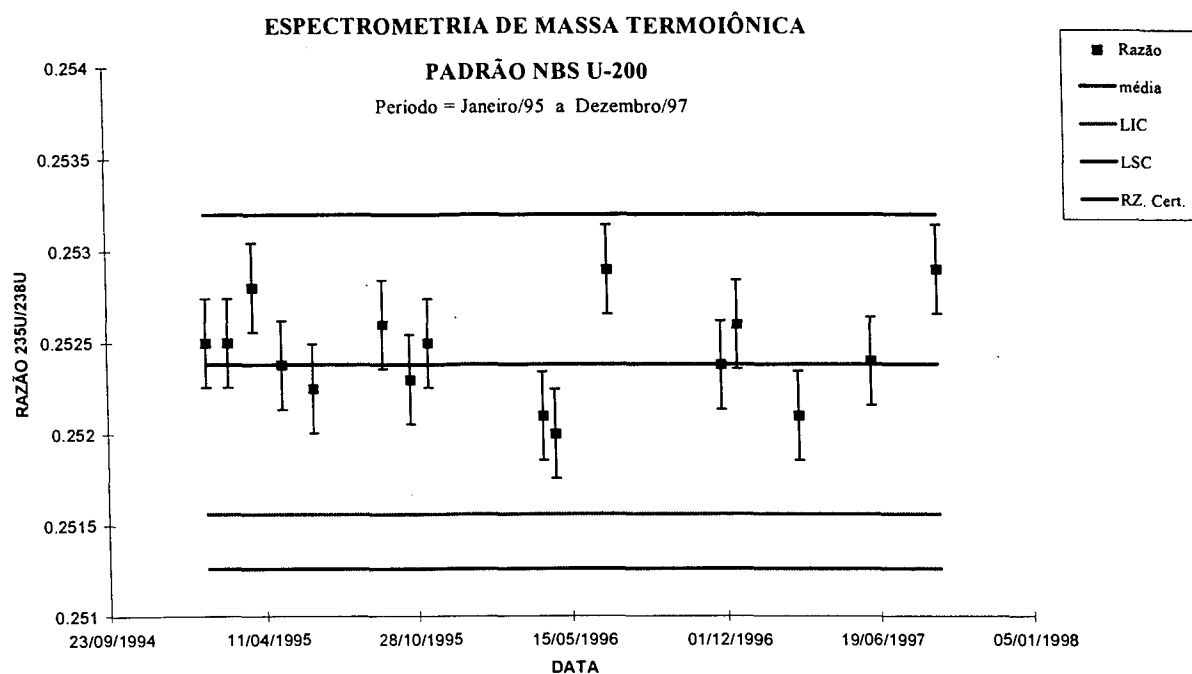


Figura 4. Gráfico de Controle do Espectrômetro de Massas

2.1 Critérios Laboratoriais na Validação de Metodologias

Como citado anteriormente, vários podem ser os estudos utilizados na validação de um método: especificidade, linearidade, exatidão, precisão, repetibilidade, sensibilidade, limites de detecção e determinação. Não se pretende neste trabalho construir um modelo, mas simplesmente fornecer subsídios para a realização de validação de metodologias.

Especificidade. É a habilidade do método medir apenas o analito de interesse. Em um método quantitativo, este será considerado específico se a resposta obtida para a substância de interesse em presença de todos os demais componentes da amostra, for idêntica àquela obtida para uma solução contendo unicamente a substância de interesse. É essencial, portanto, que a avaliação de “brancos” tanto do padrão como das amostras seja feita, não só para validação do método mas também nas análises de rotina. O valor do branco deve ser descontado das medidas, quer seja na zeragem automática do instrumento, quer seja nos cálculos manuais.

Linearidade. A busca da linearidade está em obter os resultados em proporção direta às concentrações das substâncias em estudo. Para isso, é necessário a confecção de uma curva de calibração, sendo o eixo “x” a concentração e o eixo “y” da resposta (exemplo: intensidade de sinal medido). O número de pontos, geralmente utilizado, para a curva de calibração é de cinco.

A equação da reta de calibração obtida é da forma:

$$y = ax + b \quad (1)$$

onde: a = coeficiente angular – que expressa a inclinação da curva aos eixos;
b = coeficiente linear – expressa a intersecção da curva aos eixos.

A linearidade de uma função calibração é importante. O cálculo do Coeficiente de Correlação “r” que expressa a relação de “x” e “y” na curva torna a equação da reta mais

consistente e significativa. O coeficiente de correlação r tem sido freqüentemente utilizado como um teste grosseiro para a linearidade.

Quando um número pequeno de dados são avaliados, um teste estatístico simples, teste F, pode ser usado para checar a linearidade. A base do teste F é a equação:

$$F = \frac{s_2^2}{s_1^2} \quad (2)$$

onde:

$$s_1^2 = \text{variância da amostra 1}$$

$$s_2^2 = \text{variância da amostra 2}$$

O teste F se acha associado aos graus de liberdade das variâncias das amostras. Quando as duas amostras pertencem à mesma população, os valores de F correspondem a uma probabilidade de ocorrência superior a 5%. Segundo Ohlweiler (1982), se a probabilidade for igual ou inferior a 5%, já não será possível tomar a discrepância entre as variâncias como simples decorrência das flutuações de amostragem e dever-se-á admitir que as duas amostras não apresentam a mesma população.

Exatidão. A exatidão de um método é representada pelo grau de concordância entre o valor da concentração da substância em exame determinado pelo método e o valor verdadeiro da mesma presente na amostra analisada.

A exatidão, sempre que possível, deve ser avaliada através da análise de materiais de referência ou padrões certificados em que o nível de concentração do analito seja o mesmo esperado nas amostras. Quando este não estiver disponível, a exatidão deve ser avaliada através da recuperação de padrões adicionados às amostras, sempre na mesma ordem de grandeza da concentração esperada, ou ainda utilizar-se de uma amostra sintética, preparada no laboratório, que sob aspectos qualitativos e quantitativos é exatamente idêntica a amostra verdadeira. Normalmente, os cálculos são realizados através da análise de pelo menos seis (6) alíquotas.

Precisão. Representa o grau de concordância entre os resultados obtidos quando uma mesma amostra homogênea é analisada diversas vezes pelo método em estudo, sob idênticas condições de teste, ou seja, maior será a precisão quanto menor for a amplitude das medidas. A precisão, geralmente, é expressa pelo desvio padrão ou desvio padrão relativo dos resultados obtidos. A intenção em se medir o desvio é buscar uma quantidade que meça a amplitude de variação em torno da média de um conjunto de medidas. O desvio, ou precisão, é calculado através da expressão:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad (3)$$

onde:

- X_i = Resultado individual de cada medida
- \bar{X} = Média aritmética de todos os resultados
- n = Número de resultados

A precisão pode ser determinada em três diferentes níveis, a saber: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade, conforme discutido por Moraes (1998). Em uma avaliação intralaboratorial apenas o componente repetibilidade pode ser medido.

Devem ser efetuadas pelo menos 10 determinações, calculado o desvio padrão (s), o coeficiente de variação (CV) e a repetibilidade (diferença máxima entre paralelas).

$$CV = \frac{s}{M} \times 100 \quad (4)$$

Sensibilidade. Esta grandeza depende de quanto o método é capaz de discriminar entre amostras de teores de analito semelhantes. Depende da inclinação da curva analítica ou curva de calibração. Se dois métodos tem igual precisão, o mais sensível é o que possui a curva de calibração com maior inclinação.

Por definição de Leite, F., a sensibilidade analítica é igual à inclinação da reta de calibração dividida pelo desvio-padrão da amostra.

Sensibilidade de calibração, "m" é definida por: $m = (S - S_{bl})/C$ (para curvas lineares)

Onde: S, S_{bl} são os sinais analíticos para a amostra e o branco, respectivamente.

Limite de Determinação. É o menor valor determinado, em confiabilidade de precisão e exatidão aceitáveis, para aquela condição analítica. Para o limite de determinação considera-se que não se atingiu o limite da técnica/método ou do equipamento.

Proposta de trabalho⁽⁶⁾: com a condição analítica definida, fazer um branco analítico e em seguida, iniciar diluições, começando por redução proporcional a um quarto do teor do analito que se pretende analisar. Verificar a repetitividade de análise para a mesma amostra. Caso não seja obtida a repetitividade desejada, trabalhar com uma diluição menor, metade da solução principal. Verificar a repetitividade de análises, caso ocorra, já foi estabelecido um valor para o Limite de Determinação.

Limite de Detecção. Pode ser definido como o menor valor detectado em confiabilidade de precisão aceitável, em função do limite do sistema (eletrônica, instrumental, etc.), ou seja, do ruído. Existem alguns tipos de limite de detecção, segundo Chasin et al. (1998), cada um com um objetivo estabelecido: limite de detecção do instrumento (LDI), limite de detecção do método (LDM) e o limite de quantificação.

O limite de detecção do instrumento (LDI) é definido como a concentração ou quantidade de uma dada substância que produz um sinal ou resposta maior do que $3s$ (onde s = desvio padrão de uma série de medidas do branco). Em geral, o LDI é utilizado como guia para o estabelecimento do limite de detecção do método.

Limite de detecção do método (LDM) é a menor concentração do analito na amostra que, quando submetida a todo o processo analítico, produz um sinal definido como o limite de detecção do método.

Limite de quantificação do método é a menor concentração do analito que pode ser medida com uma precisão especificada. Costuma ser definido como $10s$.

2.2 Exemplo de Aplicação de Validação

Nos últimos anos foram desenvolvidos procedimentos para validação de metodologias para análise de elementos metálicos em diferentes tipos de amostra.

Estes procedimentos consistiram numa avaliação criteriosa dos itens anteriormente discutidos, em estudos de recuperação, na análise sistemática de padrões certificados e na determinação da variabilidade analítica para médio e longo prazo.

Gomes (1999) aplicou esta metodologia em análise de elementos metálicos em amostras de sedimentos.

Lucilena (2000) utilizou-a na avaliação de elementos metálicos em amostras biológicas.

Mais recentemente, Buchmann (2000) introduziu no laboratório o conceito de estudos de causa e efeito em procedimentos analíticos e avaliação de incertezas.

Conclusões

Encontrar um método de validação que satisfaça a todos os interessados é praticamente impossível, definir o melhor passa a ser um critério pessoal, ou seja, aceitar sempre gerará um conflito. É importante salientar que não existe modelo pronto para sistemas de validação, portanto, o interessado deve fazer adaptações, adequando as recomendações às suas necessidades.

Conclui-se portanto que ao conhecer os termos e uso de ferramentas, o trabalho propõe um agrupamento de sequências que permitem aumentar a confiabilidade analítica sobre resultados em medição e sobre os resultados a serem emitidos.

Uma certeza que sempre deve-se ter em relação ao ato de validar é que não ter validação nos dados obtidos de análises químicas é ter apenas números e não resultados.

REFERÊNCIAS

- Buchmann, J.H., 2000, O uso da monitorização ambiental como técnica de identificação de atividades de enriquecimento isotópico, dissertação de doutoramento, IPEN, São Paulo.
- Carril, M.P.; Corbillón, M.S.; Madariaga, J.M., 1997, Validation of an analytical method to determine trace metal impurities in fluoride compounds by flama atomic absorption spectroscopy. Accreditation and Quality Assurance, 2, p. 301-308
- Chasin, A.A.M.; Nascimento, E.S.; Ribeiro-Neto, L.M.; Siqueira, M.E.P.B.; Andraus, M.H.; Salvadori, M.C.; Fernícola, N.A.G.; Gorni, R.; Salcedo, S., 1998, Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. Revista Brasileira de Toxicologia, 11 (1), 1-6.
- Chasin, A.A.M.; Chasin, M.; Salvadori, M.C., jul./dez.1994, Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. Revista Farm. Bioquím. Univ. São Paulo, vol.30, nº2, p. 49-53,
- Feigenbaum, A.V., 1994, Controle da Qualidade Total, Volume 3, Makron Books do Brasil, Editora McGraw-Hill Ltda.
- Gomes, M.S., 1999, Determinação de elementos metálicos em sedimentos Antárticos, dissertação de mestrado, IPEN, São Paulo.
- Leite, F. Validação em Análise Química. Editora Átomo.
- Holanda Ferreira, A.B. de; Novo dicionário da língua portuguesa, 1ª edição, 15ª impressão, Editora Nova Fronteira, 1975
- Massart, D.L.; Smeyers-Verbeke, J.; Vandeginste, B., 1994, An introduction to method validation. Analisis Magazine, v.22, nº 5

- Monteiro, L.R., 2000, Validação de metodologia para determinação de elementos metálicos em amostras de soro e sangue. dissertação de mestrado, IPEN, São Paulo.
- Moraes, O.M.G., 1998, Validação de métodos analíticos. Texto da palestra proferida no Encontro Nacional de Contaminantes Inorgânicos – ITAL – Campinas
- Ohlweiler, O.A., 1982, Química Analítica Quantitativa. 3ª Edição, Livros Técnicos e Científicos Editora, vol. 1, p. 254-259
- Tapparo, A.; Soldá, L.; Bombi, G.G.; Zambenedetti, P.; Zatta, P.F.; Bertani, R. ; Corain, B., 1995, Analytical Validation of a General Protocol for the Preparation of Dose-Controlled Solutions in Aluminium Toxicology. Analyst, Vol. 120, September
- Ulrich, J.C.; Sarkis, J.E.S.; Kakazu, M.H., 27/10 a 01/11/1996, Controle de Qualidade no Laboratório de Caracterização Isotópica do IPEN/CNEN-SP. VI Congresso Geral de Energia Nuclear - CGEN, Rio de Janeiro,.

VALIDATION OF THE METODOLOGIES IN ANALYTICAL LABORATORIES

Summary. In general, the term to validate it can be defined as: "give validity", "to turn valid" or "to turn legitimate", according to Holanda Ferreira's dictionary (1975). In an analytical laboratory the procedures of validation of methodologies should be part of a quality program and to serve of reference parameters for the beginning of any new development.

The action of validating is accomplished with the intention of establishing the uncertainties involved in each stage of the analytical methodology in full detail, guaranteeing with that the obtaining of results reproducible and trustful. The validation process requests the control of several parameters, such as calibrations of equipments, it would glaze of laboratory and elaboration of control graphs. The Laboratório de Caracterização Isotópica of the Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN/CNEN-SP, implanted the quality program in 1987, and it maintains the control of those parameters.

In this work the adopted procedures and examples of analytic validation will be discussed.

Keywords: Validation, Analytic Laboratories