PRODSAUDE
SIBRATEC

Validação de Métodos de Ensaios

Exatidão, Precisão e Robustez

AULA 03

Coordenação

certi

Realização

sociedade brasileira de metrologia

Apoio

Finep

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES

PÁTRIA AMADA BRASIL

Rede SIBRATEC - Serviços Tecnológicos
Rede de Produtos para a Saúde

Sumário

Apresentação **3**

1. Exatidão **4**

1.1 - Estimativa da Exatidão 7

1.1.1. Erro Relativo 7

1.1.2. Recuperação 8

1.1.3. Erro Normalizado 8

2. PRECISÃO **10**

2.1 - Repetibilidade 10

2.1.1. Estimativa da Repetibilidade Fonte: Diretiva Europeia 657 (2002) 12

2.2 - Precisão Intermediária 15

2.3 - Reprodutibilidade e reprodutibilidade interna 16

2.3.1. Estimativa da Reprodutibilidade intralaboratorial 16

2.4 - Estudos que permitem avaliar a Repe e a Repro (R&R) de forma conjunta 20

2.4.1. Estudo Rápido de Repetibilidade e Reprodutibilidade 20

2.4.2. Estudo Formal de Repetibilidade e Reprodutibilidade 22

2.4.3. Exatidão, repetibilidade e reprodutibilidade – Qualitativo 26

2.5 - Estudo que combina a EXATIDÃO e PRECISÃO (Repe e Repro) 28

2.6 - Robustez 31

Apresentação

Olá!

Seja muito bem-vindo à terceira aula do curso de Validação de Métodos de Ensaios.

Esta aula apresenta três parâmetros importantes da validação de métodos: exatidão, precisão e robustez. Iremos aprender como avaliar a concordância dos resultados em relação a um valor real, verificar a se a variabilidade dos resultados está controlada e também iremos analisar se, ao modificarmos pequenos detalhes em um método, o resultado sofre alteração.

Prontos para começar?

Então vamos lá!

1. Exatidão

Como saber se um resultado está correto? Será que os dados do nosso ensaio são realmente exatos?
Nem sempre essa pergunta é respondida de forma adequada! Existe muita confusão sobre a aplicação deste conceito chamado exatidão!

A definição forma de "Exatidão" está descrita como "grau de concordância entre o resultado de uma medição e o valor verdadeiro de um mensurando". Assim, podemos afirmar que a exatidão traduz a concordância dos valores experimentais com o valor verdadeiro.

Mas o que seria o valor verdadeiro?

Valor verdadeiro seria um valor padrão estabelecido, podendo ser designado por:

- Material de Referência Certificado,
- amostra de valor conhecido,
- valor designado por um laboratório de referência,
- valor designado por um grupo de laboratórios que usam o mesmo método,
- outras formas.

Além disso, para entender o conceito de exatidão, é importante compreender os conceitos de erro sistemático e erro aleatório.

Você sabe o que significam estes dois tipos de erro?

De acordo com o item 2.17 do Vocabulário Internacional de Metrologia - VIM, o erro sistemático é a " Componente do erro de medição que, em medições repetidas, permanece constante ou varia de maneira previsível" .

Conceitualmente, o "**Erro sistemático**" pode ser estimado pela média que resultaria de um infinito número de medições do mesmo mensurando, efetuadas sob condições de repetibilidade, menos o valor verdadeiro do mensurando.

Obs.: Mensurando: é a grandeza especifica que se deseja ou pretende medir.

Agora vamos ao **erro Aleatório**...

Segundo o item 2.19 do VIM, Erro aleatório é a "Componente do erro de medição que, em medições repetidas, varia de maneira imprevisível" . Ou seja, se não há como prever.

Ele pode ser considerado como o "resultado de uma medição menos a média que resultaria de um infinito número de medições do mesmo mensurando efetuadas sob condições de repetibilidade".

Como não é possível fazer um número infinito de medições, deve-se considerar um número razoável de repetições para se estimar este valor do erro sistemático e aleatório.

O **Erro TOTAL** de uma medição é estimado pelo Erro Aleatório mais o Erro Sistemático, conforme equação a seguir:

ET = ES + EA

Onde,

ET: Erro Total

ES: Erro Sistemático

EA: Erro Aleatório

E desta forma temos,

ES = ET – EA	O erro sistemático é igual ao erro total da medição menos o erro aleatório.
EA = ET - ES	O erro aleatório é igual ao erro total de medição menos o erro sistemático.

A **exatidão** está **diretamente relacionada** com a **estimativa do Erro Sistemático de Medição**!!

No exemplo abaixo fica fácil ver estes conceitos!!

Observe:

A	O Alvo "A" apresenta **erro sistemático e aleatório**, pois a média de seus valores está longe do alvo (ES) e os valores dos tiros estão "espalhados" (EA).
B	O Alvo "B" apresenta apenas **erro sistemático**, pois está longe do alvo (ES), mas seus valores estão agrupados (baixo EA).
C	O Alvo "C" apresenta apenas **erro aleatório**, pois a média de suas medidas estaria exatamente no alvo (ES), mas seus os valores estão "espalhados" de forma aleatória (EA).
D	Já **o alvo "D"** representa a **situação ideal**, pois a média dos valores dos tiros está bem no alvo (ES) e a variabilidade entre os tiros é baixa (EA)

Mas vamos com calma... Iremos abordar os conceitos relacionados com o erro aleatório e a precisão das medidas depois de entender claramente o que é exatidão!! Aguarde um pouco mais!

1.1 - Estimativa da Exatidão

A exatidão pode ser estimada de várias formas. Aqui no curso vamos aprender a estimar o Erro Relativo, a Recuperação e o Erro Normalizado.

1.1.1. Erro Relativo

O Erro Relativo (ER) está associado à analise do Erro Sistemático (ES) em relação ao valor real (valor verdadeiro). Para tanto, deve-se analisar uma mesma amostra de valor conhecido, por exemplo, ou um determinado padrão, e verificar qual é o ER.

Para isto deve-se utilizar a equação abaixo:

$$ER(\%) = \frac{Média - Valor\ real}{Valor\ real} \times 100$$

Exemplo:

Unidade	g/L
Valor Real (verdadeiro)	20,0

Repetição	Resultado	Erro
1	20,4	0,40
2	20,3	0,30
3	19,8	- 0,20
4	20,2	0,20
5	20,3	0,30
6	20,4	0,40
7	20,3	0,30
Média	20,2	0,2
ER(%)	**1,2%**	

Sugere-se que o ER seja, no mínimo, inferior a |5%| para ser considerado satisfatório. É importante destacar que este critério pode ser modificado conforme o método que o laboratório está utilizando. Os valores do ER podem ser negativos, o que indica que a maioria dos resultados está abaixo, ou seja, é menor do valor verdadeiro.

Neste exemplo o valor do ER obtido foi de 1,2%, sendo considerado adequado.

1.1.2. Recuperação

A Recuperação Rec(%) de um resultado indica o percentual do valor de referência que é obtido em termos práticos em uma medição. O ideal é que a Recuperação do ensaio realizado seja um valor muito próximo ao valor de um padrão (do valor verdadeiro), mas por motivos técnicos pode haver variações.

Para se estimar a recuperação de um método, deve-se usar a equação abaixo.

$$\mathrm{Rec}(\%) = \frac{Média_do_ensaio}{Valor\ real} \times 100$$

Exemplo:

Unidade	g/L
Valor alvo	40,0

Repetição	Resultado
1	39,0
2	38,0
3	37,0
4	39,0
5	38,0
6	36,0
7	35,0
Média	37,4
Rec(%)	**93,6%**

Sugere-se que a Recuperação esteja entre 90-110% para ser considerada satisfatória. É importante destacar que este critério pode ser modificado conforme o método que o laboratório está utilizando.
Neste exemplo o valor da Rec(%) obtida foi de 93,6%, sendo considerada adequada.

1.1.3. Erro Normalizado

Quando o laboratório calcular a incerteza expandida do seu resultado (U_{lab}), o valor verdadeiro deve estar dentro do intervalo (X_{lab}. ± U_{lab}), onde X_{lab} é a média de resultados do laboratório.
Quando isso não acontece, o resultado pode ser considerado inadequado.

A avaliação de desempenho através do erro normalizado (E_n) é realizada com base na equação abaixo, onde:

X_{lab} é o resultado obtido pelo laboratório,

X_{ref} é o resultado verdadeiro,

U_{lab} é incerteza expandida da medição do laboratório participante e

U_{ref} é a incerteza expandida do valor verdadeiro (de um padrão, por exemplo).

$$E_n = \frac{X_{lab} - X_{ref}}{\sqrt{U_{lab}^{\ 2} + U_{ref}^{\ 2}}}$$

Exemplo:

Unidade	g/L
Valor Verdadeiro (X ref)	80,0
U ref	0,6

Repetição	Resultado
1	80,0
2	81,0
3	80,0
4	80,0
5	81,0
6	80,2
7	81,5
Média (X lab)	80,5
U lab	0,8
Erro Normalizado	0,53

O desempenho é considerado satisfatório quando |En| é menor do que 1 e insatisfatório quando |En| ≥ 1. Neste exemplo o valor da En obtido foi de 0,53, sendo considerado adequado.

Mas qual forma de cálculo da Exatidão é a mais adequada?

Não existe uma regra que defina o que o laboratório deve usar. Seus técnicos devem definir o que é mais adequado para os ensaios que são realizados em sua empresa. As três formas que vimos para estimar a exatidão são consideradas consistentes.

Agora você já está pronto para estimar a exatidão e o erro sistemático dos seus ensaios!!

Será que seus resultados são realmente exatos? Sugerimos que você faça este teste!!

2. PRECISÃO

Segundo o item 2.15 do VIM, Precisão de medição é o "Grau de concordância entre indicações ou valores medidos, obtidos por medições repetidas, no mesmo objeto ou em objetos similares, sob condições especificadas".

A precisão de medição é utilizada para definir a repetibilidade de medição. Uma medida precisa é uma medida repetitiva, ou seja, ela tem pouca ou nenhuma variação em seus resultados.

Como a Precisão reflete a concordância entre vários valores experimentais obtidos, quanto menor for a dispersão das medidas, maior será a precisão. Esta medida reflete a tendência de maior ou menor afastamento (erro ALEATÓRIO) entre os resultados dos ensaios. Este erro pode ser expresso pelo desvio padrão (s) da série de valores de um experimento ou pelo respectivo Coeficiente de Variação (CV), que é o desvio padrão expresso como percentagem da média:

$$CV(\%) = \frac{Desvio\ padrão}{Média} \times 100$$

Veja alguns exemplos de situações que podem gerar erros aleatórios com consequente aumento do CV: pipetagem inexata dos padrões e amostras, agitação imprópria, material sujo, uso de método de pouca sensibilidade, controle incorreto de temperatura, falhas na operação dos aparelhos, falhas no tempo de reação, entre outros.

A repetibilidade (repe), a precisão intermediária e a reprodutibilidade interna (repro) são parâmetros estatísticos relacionados com a precisão, a qual está associada com o erro aleatório de medição.

A repetibilidade nas medições.

2.1 - Repetibilidade

A repetibilidade é definida como grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando efetuadas sob as mesmas condições de medição. O limite de repetibilidade é a máxima diferença aceitável entre duas repetições, ou seja, entre dois resultados independentes, do mesmo ensaio e no mesmo laboratório, sob as mesmas condições.

As condições de repetibilidade incluem:

- Mesmo procedimento de medição;
- Mesmo analista;
- Mesmo instrumento de medição, utilizado nas mesmas condições;
- Mesmo local;
- Repetição em curto período de tempo.

Isto significa que devemos deixar os fatores que podem variar como fatores FIXOS!

Conceitualmente, a condição de repetibilidade de medição, de acordo com o VIM (2012), é a condição de medição num conjunto de condições, as quais incluem o mesmo procedimento de medição, os mesmos operadores, o mesmo sistema de medição, as mesmas condições de operação e o mesmo local, assim como medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares durante um curto período de tempo.

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

As repetições devem ser independentes, ou seja, incluir todas as etapas de preparo do processo de medição. Para avaliar a repetibilidade do método, o número mínimo de repetições para cada nível de concentração varia de acordo com diferentes documentos de validação, mas tipicamente são entre 6 e 15 por amostra usada no estudo.
Considerando-se a dificuldade de estimar um desvio padrão confiável a partir de poucas repetições, é admissível que os valores calculados a partir de vários pequenos grupos de repetições possam ser agrupados para se obter estimativas com números suficientes de graus de liberdade (Eurachem, 2014). É importante testar as concentrações baixa, média e alta da faixa de trabalho.

É importante que os laboratórios estabeleçam critérios de aceitação para o desvio padrão relativo (DPR), também chamado de coeficiente de variação (CV), obtido sob condições de repetibilidade, de preferência seguindo as orientações normativas da legislação aplicável às áreas de atividades, como, por exemplo, meio ambiente.

Normalmente os critérios estão atrelados ao nível de concentração. Na Tabela a seguir temos, como exemplo, os critérios sugeridos pela AOAC.

Analito, %	Fração Mássica (C)	Unidade	CV%
100	1	100%	1,3
10	10^{-1}	10%	1,9
1	10^{-2}	1%	2,7
0,1	10^{-3}	0,1%	3,7
0,01	10^{-4}	100ppm(mg/kg)	5,3

2.1.1. Estimativa da Repetibilidade

Agora que você já sabe o que é repetibilidade, veremos como fazer sua estimativa. Para isto, montamos um roteiro de exemplo que mostrará o passo a passo.

Observe!

Roteiro para o cálculo

Para realizar o cálculo da repetibilidade você precisa:

- ✓ Preparar um conjunto de amostras com matrizes* idênticas, fortificadas** com a substância a analisar de modo a obter concentrações equivalentes a 1, 1,5 e 2 vezes o limite mínimo*** do método;

Observações:

**Exemplo de matriz: água, alimento, etc.*

*** Fortificar significa adicionar artificialmente uma quantidade de padrão na matriz.*

**** Pode estar associado ao Limite de Quantificação - LQ*

- ✓ Para cada nível, a análise deve ser realizada com, pelo menos, seis réplicas;
- ✓ Analisar as amostras;
- ✓ Calcular a concentração detectada para cada amostra;
- ✓ Calcular a concentração média, o desvio padrão e o Coeficiente de Variação (CV) das amostras fortificadas. O cálculo do CV é realizado dividindo-se o desvio padrão pela média e multiplicando este valor por 100%;
- ✓ Repetir estes passos pelo menos mais duas vezes.

Veja o exemplo:

Limite Mínimo Requerido: 0,20 g/kg
Fortificada (1) 0,20 g/kg
Fortificada (1,5) 0,30 g/kg

Fortificada (2) 0,40 g/kg

1° Vez:				
	Réplica	Nível (1)	Nível (1,5)	Nível (2)
	1	0,21	0,31	0,40
	2	0,20	0,32	0,41
	3	0,20	0,30	0,40
	4	0,19	0,30	0,39
	5	0,20	0,29	0,42
	6	0,20	0,30	0,40
	Média	0,200	0,303	0,403
	Desv pad.	0,006	0,010	0,010
	CV	3,16%	3,40%	2,56%

2° Vez:				
	Réplica	Nível (1)	Nível (1,5)	Nível (2)
	1	0,20	0,30	0,40
	2	0,20	0,30	0,41
	3	0,20	0,30	0,40
	4	0,19	0,31	0,42
	5	0,20	0,32	0,40
	6	0,20	0,30	0,40
	Média	0,198	0,305	0,405
	Desv pad.	0,004	0,008	0,008
	CV	2,06%	2,74%	2,07%

3° Vez				
	Réplica	Nível (1)	Nível (1,5)	Nível (2)

	1	0,20	0,30	0,40
	2	0,20	0,27	0,40
	3	0,21	0,29	0,40
	4	0,20	0,28	0,41
	5	0,20	0,30	0,41
	6	0,19	0,30	0,40
	Média	0,200	0,290	0,403
	Desv pad.	0,006	0,013	0,005
	CV	3,16%	4,36%	1,28%

✓ Depois de calcular os ensaios deve-se calcular o limite máximo de variação aceitável pelo coeficiente de Horwitz.Para tanto a concentração da substância, na fórmula de Horwitz, deve estar em g/g.

Obs.: ***As CONCENTRAÇÕES, que são o "C" da fórmula saem da tabela apresentada anteriormente:***

Limite Mínimo Requerido: 0,20 g/kg
Fortificada (1) 0,20 g/kg
Fortificada (1,5) 0,30 g/kg
Fortificada (2) 0,40 g/kg

Observe:

Limite de Variação aceitável pela equação de Horwitz:

$CV = 2^{(1-0,5\log C)}$ onde: C = Concentração da subst. (g/g)

CV MÁXIMO (Horwitz)		
Faixa (g/kg)	Faixa (g/g)	CV (%)
0,2	0,0002	7,21
0,3	0,0003	6,78
0,4	0,0004	6,49

✓ Posteriormente deve-se calcular a concentração média global e o desvio das médias. Além disso, calculam-se os CVs para as amostras fortificadas.

Fechamento	Nível (1)	Nível (1,5)	Nível (2)
Média Global	0,199	0,299	0,404
Desvio	0,001	0,008	0,001
CV	0,48%	2,75%	0,24%
Fechamento	Nível (1)	Nível (1,5)	Nível (2)
Aceito?	SIM	SIM	SIM

✓ Depois dos cálculos, deve-se comparar os CVs obtidos no estudo com os CVs calculados pela fórmula de Horwitz. Se os CVs obtidos forem menores do que os de Horwitz, significa que a repetibilidade é satisfatória;

No exemplo, percebe-se que a repe foi satisfatória nos 3 níveis (1; 1,5 e 2), pois o CV global obtido foi menor do que o CV máximo, calculado pela equação de Horwitz.

2.2 - Precisão Intermediária

A precisão intermediária, de acordo com o VIM (2012), refere-se à precisão avaliada sob condições que compreendem o mesmo procedimento de medição, o mesmo local e medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares, ao longo dum período extenso de tempo, mas pode incluir outras condições submetidas às mudanças. Nesse estudo, deve-se definir exatamente quais condições serão variadas (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.

Dependendo do ensaio e do tipo de aplicação do estudo da precisão intermediária, existem vários métodos para determinação e controle desse parâmetro, como por exemplo:

• por meio de gráfico de controle do desvio padrão ou da amplitude, que poderá ser aplicado para replicatas de amostras e para padrões estáveis ao longo do tempo.

2.3 - Reprodutibilidade e reprodutibilidade interna

Reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, efetuadas sob condições variadas de medição. A reprodutibilidade não é um componente de validação de método executado por um único laboratório, sendo obtida quando um laboratório busca a verificação do desempenho dos seus métodos em relação aos dados de validação obtidos por meio de comparações interlaboratoriais.

A precisão intermediária, também denominada de reprodutibilidade interna ou reprodutibilidade intralaboratorial, 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, conforme já foi citado anteriormente.

Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um laboratório. A precisão intermediária pode ser avaliada por meio de gráficos de controle de variabilidade, que poderão ser aplicados para replicatas de amostra e para padrões estáveis ao longo do tempo.

2.3.1. Estimativa da Reprodutibilidade intralaboratorial

A reprodutibilidade intralaboratorial visa identificar se fatores variáveis, como analista, podem ter influência nos resultados de ensaios realizados.

Veja um exemplo de como fazer o cálculo...

Roteiro para o cálculo:

- ✓ Preparar um conjunto de amostras fortificadas com a substância a analisar de modo a obter concentrações equivalentes a 1, 1,5 e 2 vezes o limite mínimo de desempenho requerido ou a 0,5, 1 e 1,5 vezes o limite permitido;
- ✓ Para cada nível, a análise deve ser realizada com, pelo menos, seis réplicas;
- ✓ Repetir estes passos pelo menos mais duas vezes com operadores diferentes e condições ambientais diferentes, por exemplo, lotes diferentes de reagentes, solventes, temperatura ambiente diferente, instrumentação diferente, etc;
- ✓ Analisar as amostras;
- ✓ Calcular a concentração detectada para cada amostra;
- ✓ Calcular a concentração média, o desvio padrão e o coeficiente de variação (%) das amostras fortificadas.

Exemplo:

Condições variáveis: Operador e temperatura.

Concentração:	1,00 g/L
Fortificada (1)	1,00 g/L
Fortificada (1,5)	1,50 g/L
Fortificada (2)	2,00 g/L

1° Vez:	OPERADOR A - 20° C			
	Réplica	Nível (1)	Nível (1,5)	Nível (2)
	1	1,00	1,50	2,00
	2	0,90	1,50	2,00
	3	1,00	1,51	2,00
	4	1,10	1,49	2,00
	5	1,20	1,50	2,10
	6	0,98	1,50	2,00
	Média	1,0300	1,5000	2,0167
	Desv pad.	0,1049	0,0063	0,0408
	CV	10,2%	0,4%	2,0%

2° Vez:	OPERADOR B - 20°C

	Réplica	Nível (1)	Nível (1,5)	Nível (2)
	1	1,00	1,50	2,00
	2	1,00	1,40	2,00
	3	1,00	1,50	2,00
	4	1,00	1,60	2,00
	5	1,00	1,50	2,00
	6	0,99	1,50	2,00
	Média	0,9983	1,5000	2,0000
	Desv pad.	0,0041	0,0632	0,0000
	CV	0,4%	4,2%	0,0%

3° Vez	OPERADOR A - 25° C			
	Réplica	Nível (1)	Nível (1,5)	Nível (2)
	1	1,00	1,60	2,00
	2	1,00	1,50	2,00
	3	1,00	1,50	2,00
	4	1,03	1,50	2,10
	5	1,00	1,50	2,20
	6	1,00	1,50	2,40
	Média	1,0050	1,5167	2,1167
	Desv pad.	0,0122	0,0408	0,1602
	CV	1,2%	2,7%	7,6%

4° vez	OPERADOR B - 25° C

	Réplica	Nível (1)	Nível (1,5)	Nível (2)
	1	1,01	1,4	2
	2	1,00	1,5	2
	3	1,00	1,5	2
	4	1,00	1,5	2
	5	1,00	1,5	2
	6	1,00	1,5	2,2
	Média	1,0017	1,4833	2,0333
	Desv pad.	0,0041	0,0408	0,0816
	CV	0,4%	2,8%	4,0%

Critérios para avaliação da reprodutibilidade interna:

CV para métodos quantitativos referentes a um intervalo de fracções mássicas do elemento

Fracção mássica	(%)
≥ 10 µg/kg a 100 µg/kg	20
> 100 µg/kg a 1.000 µg/kg	15
≥ 1.000 µg/kg	10

Resultados obtidos:

Repro intralab.	Médias				Média das médias	Desvio repro	cv repro
	A - 20°C	B - 20°C	A - 25°C	B - 25°C			
Nível (1)	1,03	1,00	1,01	1,00	1,01	0,014	1,43%
Nível (1,5)	1,50	1,50	1,52	1,48	1,50	0,014	0,91%
Nível (2)	2,02	2,00	2,12	2,03	2,04	0,052	2,54%

De acordo com os resultados obtidos, percebe-se que existe uma boa reprodutibilidade intralaboratorial, pois o valor dos CVs foram menores do que 10%.

2.4 - Estudos que permitem avaliar a Repe e a Repro (R&R) de forma conjunta

Agora que já sabemos o que é Repetibilidade e Reprodutibilidade, veremos os estudos que permitem avalia-los.

2.4.1. Estudo Rápido de Repetibilidade e Reprodutibilidade

O objetivo do estudo de R&R é determinar se a variabilidade do Sistema de medição é relativamente menor que a variabilidade do processo monitorado.

Quer ver um exemplo?

Roteiro para o cálculo:

- ✓ Selecionar, no mínimo, 5 amostras que deverão ser avaliadas por diferentes analistas (considerando que este foi o fator de reprodutibilidade escolhido).

Amostras	João	Marcos
1	5,06	5,07
2	5,09	5,07
3	5,06	5,07
4	5,09	5,07
5	5,02	5,03

- ✓ Os analistas devem analisar as mesmas amostras. Posteriormente deve ser calculada a amplitude das análises e a médias das amplitudes.

Amostras	João	Marcos	Amplitude (R)
1	5,06	5,07	0,01
2	5,09	5,07	0,02
3	5,06	5,07	0,01
4	5,09	5,07	0,02
5	5,02	5,03	0,01
		Amplitude Média	0,014

✓ O próximo passo é estimar o desvio da medição, através da fórmula:

σ_m = R (média) / d_2

σ_m = Desvio da medição, que compõe o R&R.

R(média) = amplitude média

d_2 = constante estatística

O valor de d_2 deve ser estimado com base no número de amostras e número de analistas (ou outro fator de repro que se está avaliando).

g \ m	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15
1	**1,41**	**1,91**	**2,24**	**2,48**	**2,67**	**2,83**	**2,96**	**3,08**	**3,18**	**3,55**
5	**1,19**	**1,74**	**2,10**	**2,36**	**2,56**	**2,73**	**2,87**	**2,99**	**3,10**	**3,49**
10	**1,16**	**1,72**	**2,08**	**2,34**	**2,55**	**2,72**	**2,86**	**2,98**	**3,09**	**3,48**
15	**1,15**	**1,71**	**2,07**	**2,34**	**2,54**	**2,71**	**2,85**	**2,98**	**3,08**	**3,48**
30	**1,128**	**1,693**	**2,059**	**2,326**	**2,534**	**2,704**	**2,847**	**2,970**	**3,078**	**3,472**

g = número de amostras (Em nosso exemplo são 5 amostras)

m = número de analistas (Em nosso exemplo são 2 analistas)

Então, neste caso, d_2 é igual a 1,19.

Logo, o desvio da medição é igual a:

σ_m = 0,014/1,19 = 0,0117

✓ A próxima etapa é obter a variação da repe e da repro. Para tanto, deve-se multiplicar o σ_m por 5,15.

(5,15 é um valor CONSTANTE. Faz parte da fórmula.)

R&R = 5,15 *x* σ_m

R&R = 5,15 *x* 0,0117 = 0,06

✓ Depois de se obter a variação devida ao R&R, deve-se calcular o percentual de R&R, dividindo seu valor pela variabilidade total (VT) do ensaio em questão. O valor de VT pode ser estimado de duas maneiras: ou por meio de limites de especificação conhecidos (tolerância) ou por meio de um desvio padrão histórico de processo, estimando a variabilidade por 6 vezes este desvio. VT = Limite de Especificação ou Tolerância

ou

VT = 6 *x* Desvio padrão histórico

✓ Supondo que o valor da tolerância é de + / - 0,8 e o desvio histórico é de 0,4, observe o cálculo do R&R em valores percentuais.

- Considerando VT pela Tolerância:

Supondo que a tolerância é de: +/- 0,8

R&R= 5,15 *x* 0,0117 = 0,06

VT = 2 *x* 0,8

Obs.: Deve-se multiplicar por dois, pois é a amplitude da Tolerância que é considerada.

A tolerância é + - 0,8. Para considerar toda amplitude, tem que multiplicar o por 2, pois o intervalo TOTAL entre -0,8 e +0,8 vai ser considerado (neste caso é 1,6).

R&R(%) = 100% *x* (0,06/1,6) = 3,75%

- Considerando VT pelo desvio histórico:

Supondo que o desvio histórico é de: 0,4

R&R= 5,15 *x* 0,0117 = 0,06

VT = 6 *x* 0,4

R&R(%) = 100% *x* 0,06/(6 *x* 0,4) = 2,5%

✓ A faixa de aceitação para o R&R(%) é estimada pelo quadro a seguir:

R&R(%)	Interpretação
< 10%	Aceitável
10% até 30%	Até pode ser aceito, mas necessita de melhorias
> 30%	Inaceitável

No exemplo apresentado, os valores de R&R(%) seriam considerados aceitáveis.

2.4.2. Estudo Formal de Repetibilidade e Reprodutibilidade

O objetivo do estudo formal de RR é estudar a precisão do método. A vantagem aqui é que ele decompõe a parcela da Repe e da Repro, avaliando as duas individualmente.

Veja o exemplo a seguir...

Roteiro para o cálculo:

✓ Selecionar, no mínimo, 5 amostras e 2 analistas (considerando que cada amostra será analisada pelos 2 analistas em triplicata);

✓ Calcular a média e a amplitude da triplicata, bem como a média dos valores de cada uma das 5 amostras. Além disso, deve ser calculada a média das médias dos ensaios dos analistas 1 e 2, bem como a média das amplitudes dos resultados obtidos.

Digamos que os resultados sejam estes:

Amostras	Analista 1					Analista 2					Média amostras
	1	2	3	Média	Amplitude	1	2	3	Média	Amplitude	
1	50,1	51,4	51,2	50,90	1,30	51,2	52,1	52,4	51,90	1,20	51,40
2	50,2	52,3	50,6	51,03	2,10	50,4	52,3	53,4	52,03	3,00	51,53
3	51,4	50,1	50,4	50,63	1,30	51,2	52,4	52,1	51,90	1,20	51,27
4	50,3	50,2	50,1	50,20	0,20	52,3	51,9	50,1	51,43	2,20	50,82
5	50,6	50,7	50,2	50,50	0,50	53,2	52,3	50,2	51,90	3,00	51,20
			Média	50,65	1,08			Média	51,83	2,12	

✓ O próximo passo é calcular a amplitude entre as médias das médias dos analistas (Ro), a amplitude média entre os analistas (Re) e a amplitude entre as amostras (Ra).

Amplitude entre médias	1,180
Amplitude média	1,60
Amplitude entre amostras	0,72

✓ Posteriormente, é calculada a variabilidade da repetibilidade pela fórmula abaixo:

σ_{repe} = Amplitude média / d_2

Para obter d_2 no cálculo da repe considerar:

m= número de repetições por amostras

g= número de amostras *x* número de analistas

Neste caso, d_2=1,72

σ_{repe} = 1,60 / 1,72 = 0,93

✓ O próximo passo é calcular a variação da repe (chamada de VE):

VE = 5,15 *x* σ_{repe}

VE = 5,15 *x* 0,93 = 4,79

✓ Para calcular a variação da reprodutibilidade (VO) deve-se, primeiramente, descontar a parcela da variação da repetibilidade, que pode contaminar a variabilidade da repro. Para tanto, utiliza-se a fórmula a seguir:

$$VO = \sqrt{\left(5{,}15\frac{R_o}{d_2}\right)^2 - \frac{\left(5{,}15\sigma_e\right)^2}{nr}}$$

Para obter d_2 no cálculo da repro, considerar:

m= número de analistas

g= 1

Neste caso, d_2=1,41

Aplicando a fórmula de VO:

$$VO = \sqrt{\left(5{,}15*\frac{1{,}18}{1{,}41}\right)^2 - \frac{(5{,}15*0{,}93)^2}{5*3}}$$

VO = 4,12

Obs: Se o valor da raiz calculada for negativo, deve-se considerar a variação da Repro como sendo igual a zero.

✓ O próximo passo é calcular o desvio da Repro:

σ_{repro} = VO / 5,15

σ_{repro} = 0,80

✓ Estimar o valor da variação de R&R e a contribuição da Repe e da Repro deve-se executar os cálculos abaixo:

R&R = $\sqrt{VE^2 + VO^2}$

R&R = $\sqrt{4{,}79^2 + 4{,}12^2}$

R&R = 6,32

Contribuição da Repe = $\frac{VE^2}{R\&R^2}$ = 57,4%

Contribuição da Repro = $\frac{VO^2}{R\&R^2}$ = 42,6%

✓ Analisar se a variação de R&R está adequada ao sistema de medição do laboratório. Este fato estará associado diretamente à dispersão do processo, ou seja, sua Variação Total (VT). No estudo formal, o valor de VT pode ser estimado de três maneiras: por meio de limites de especificação conhecidos (tolerância), por meio

de um desvio padrão histórico de processo, estimando a variabilidade por 6 vezes este desvio (este pode ser o desvio da carta de controle do ensaio) ou pelos dados do estudo formal, no qual a variabilidade total será dada pela variação do R&R e das amostras analisadas.

- Considerando VT pela Tolerância:

Supondo que a tolerância é de: +/- 10

R&R= 6,32

VT = 2 *x* 10 (deve-se multiplicar por dois, pois é a amplitude da Tolerância que é considerada)

R&R(%) = 100% *x* (6,32/20)= 31,6%

- Considerando VT pelo desvio histórico:

Supondo que o desvio histórico é de: 2,5

R&R= 6,32

VT = 6 *x* 2,5

R&R(%) = 100% *x* 6,32/(6 *x* 2,5) = 42,2%

- Considerando VT pelo estudo realizado *(Este caso é mais recomendado para análise de R&R em processos industriais.)*:

✓ Primeiro deve-se calcular a variação das amostras, da seguinte forma:

✓ Desvio das amostras = amplitude entre as amostras / d2

✓ Para obter d2 no cálculo da variação das amostras, considerar:

m= número de amostras (Em nosso exemplo, são 5 amostras)

g= 1

Neste caso, d_2=2,48

✓ Desvio das amostras = 0,72 / 2,48 = 0,28

✓ Calcular a variação das amostras (VA);

✓ VA = Desvio das amostras x 5,15 = 0,28 x 5,15 = 1,49;

✓ Agora é possível calcular VT = $\sqrt{R\&R^2 + VA^2}$

✓ VT = $\sqrt{6{,}32^2 + 1{,}49^2}$ = 6,49

R&R(%) = 100% *x* 6,32/6,49 = 97,3%

✓ Percebe-se que nos 3 casos o R&R(%) ficou fora do valor máximo aceitável de 30%. O ideal é estar abaixo de 10%. Seria tolerável entre 10% e 30%. Portanto, neste exemplo, deveria ser proposta uma melhoria para obter variações menores associadas a repetibilidade e reprodutibilidade.

2.4.3. Exatidão, repetibilidade e reprodutibilidade – Qualitativo

Teste qualitativo

Em ensaios qualitativos nem sempre é simples visualizar a aplicação de conceitos exatidão, repetibilidade e reprodutibilidade. Porém, é possível realizar uma avaliação de ensaios que apresentem uma resposta binária, como presença ausência, com ou sem falhas, positivo ou negativo, entre outros.

Veja o exemplo...

Roteiro para o cálculo:

✓ Preparar 3 rodadas com 7 amostras (em cada rodada – ver tabelas que serão apresentadas a seguir) para avaliar a repetibilidade e reprodutibilidade de um fator que se deseja estudar (diferentes métodos, analistas, ambientes, etc);

✓ Definir um gabarito para ser aplicado nas diferentes rodadas (amostras previamente identificadas como positiva / negativas ou como presença / ausência ou outra variável qualitativa qualquer). Este gabarito será chamado aqui como padrão;

✓ Realizar os ensaios nas diferentes rodadas em ordem aleatória;

✓ Registrar os resultados (na coluna Analista “A” e na coluna Analista “B”), onde “1” é considerado presença e “0” é considerado ausência;

✓ Analisar as diferenças encontradas. Neste caso, recomenda-se obter 100% de concordância entre os resultados obtidos;

✓ Na coluna Repe e Exat “A” deve-se calcular a amplitude de cada leitura do Analista A em relação ao padrão. Na coluna Repe e Exat “B” deve-se calcular a amplitude de cada leitura do Analista B em relação ao padrão;

✓ Na coluna Repro “A e B” deve-se calcular a amplitude de cada leitura entre os Analistas A e B;

Rodada 1						
Amostras	Padrão	Analista "A"	Analista "B"	Repe e Exat. "A"	Repe e Exat. "B"	Repro "A e B"
1	1	1	1	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	1	0	1	1
4	1	0	1	1	0	1
5	1	1	1	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	1	1	0	0	1	1
Rodada 2						
Amostras	Padrão	Analista "A"	Analista "B"	Repe e Exat. "A"	Repe e Exat. "B"	Repro "A e B"
1	1	1	1	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	1	1	1	0	0	0
5	1	0	1	1	0	1
6	1	1	0	0	1	1
7	1	1	1	0	0	0
Rodada 3						
Amostras	Padrão	Analista "A"	Analista "B"	Repe e Exat. "A"	Repe e Exat. "B"	Repro "A e B"
1	0	0	1	0	1	1
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	1	0	1	1
4	1	1	0	0	1	1
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	1	1	1	0	0	0

✓ Neste estudo, a repetibilidade e a exatidão estão relacionadas, uma vez que se pode avaliar se repetidamente o analista concorda com os resultados do padrão.

✓ O próximo passo é avaliar o percentual de acertos e erros em cada uma das rodadas e o percentual de acertos geral, conforme sugere a próxima tabela.

Rodadas	Itens	Repe e Exat. "A"	Repe e Exat. "B"	Repro "A e B"
Rodada 1	Erros	1	2	3
	Acertos	6	5	4
	% Conforme	85,7%	71,4%	57,1%
Rodada 2	Erros	1	1	2
	Acertos	6	6	5
	% Conforme	85,7%	85,7%	71,4%
Rodada 3	Erros	0	3	3
	Acertos	7	4	4
	% Conforme	100,0%	57,1%	57,1%
GERAL		90,5%	71,4%	61,9%

✓ No exemplo apresentado, o único desempenho satisfatório foi observado pelo analista A na rodada 3. Se o critério não for atendido, como neste exemplo, o laboratório deve verificar a causa das variações detectadas e, posteriormente, repetir o controle da qualidade proposto. O ideal é que o resultado geral apresente 100% de concordância.

2.5 - Estudo que combina a EXATIDÃO e PRECISÃO (Repe e Repro)

O estudo a seguir combina a estimativa de 3 itens importantes na validação de métodos em apenas um experimento. Ele é adequado especialmente para confirmação de desempenho.

Veja o exemplo a seguir...

Roteiro para o cálculo:

- ✓ Preparar uma “solução mãe” de amostra, suficientemente homogênea, para realização dos ensaios;
- ✓ Definir o fator de reprodutibilidade interna que será testado (analista, equipamento, entre outro);

- ✓ Estabelecer o valor de referência da amostra (preferencialmente estipulado com base em um Materiais de referência certificados (MRC) utilizado para elaborar a solução mãe. Neste exemplo, o valor de referência está sendo chamado de padrão);
- ✓ Executar no mínimo 7 ensaios com amostras retiradas da solução mãe (cada analista ou cada equipamento);
- ✓ Fazer a avaliação conforme proposta na tabela a seguir;
- ✓ Para a Repetibilidade calcular o CV de cada analista (dividindo seu desvio padrão por sua média);
- ✓ Para analisar do Erro Sistemático, ou seja, da Exatidão, deve-se calcular o erro de cada ensaio realizado em relação ao padrão estabelecido. Após deve-se calcular o erro médio. Este erro médio deve ser analisado em relação ao padrão.
- ✓ Para Reprodutibilidade interna, calcular a diferença de percentual entre as médias dos analistas, tomando como referência o analista mais exato (neste caso o analista 2).
- ✓ Como critério de avaliação, recomenda-se utilizar 10% como "linha de corte" para avaliação da Repetibilidade e Reprodutibilidade Interna e 5% para avaliar a Exatidão. Este critério pode ser adaptado ou modificado conforme necessidade do laboratório ou características do método avaliado.

Veja as tabelas:

Padrão (ug/L)	6,0000			
	Resultados		Erros de Exatidão	
Ensaios	Analista 1	Analista 2	Exatidão 1	Exatidão 2
1	6,5001	6,0135	0,5001	0,0135
2	6,7143	6,4124	0,7143	0,4124
3	6,8559	5,8019	0,8559	-0,1981
4	6,3006	5,5074	0,3006	-0,4926
5	5,9985	6,4830	-0,0015	0,4830
6	6,6899	6,4925	0,6899	0,4925
7	6,5293	6,3882	0,5293	0,3882
Média	6,5127	6,1570	0,5127	0,1570
Desvio	0,2886	0,3886		

Repetibilidade:		
CV (%)	Analista 1	Analista 2
	4,43%	6,31%
Reprodutibilidade interna:		
Média	Analista 1	Analista 2
	6,5127	6,1570
Diferença:	0,3557	
Diferença (%)	5,78%	
Exatidão:		
Erro Médio	Analista 1	Analista 2
	0,5127	0,1570
Erro Sistemático (%)	8,54%	2,62%

Interpretação

Repetibilidade: resultados satisfatórios, pois CV foi menor do que 10%.

Reprodutibilidade interna: resultados satisfatórios, pois a diferença de percentual entre os analistas foi menor do que 10%.

Exatidão: O analista 1 apresenta uma exatidão inadequada (maior do que 5%). O analista 2 apresenta resultados de exatidão adequados.

Obs: os resultados deste estudo podem ser utilizados na estimativa da incerteza de medição de ensaios e/ou calibrações.

2.6 - Robustez

Robustez é definida como a susceptibilidade de um método analítico em responder a pequenas alterações das condições experimentais, as quais podem ser condições de armazenamento, ambientais, diferentes preparações da amostra ou outras alterações.

Estar cozinhando com o forno a 180°C e mudar para 160°C e ainda assim obter o mesmo resultado!

A robustez fornece uma indicação da confiança do método durante uma aplicação rotineira. Convém salientar que quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança desse relacionamento à sua precisão.

A robustez é um parâmetro opcional dentro dos estudos de validação, muitas vezes estando mais associado a estudos de otimização.

Para determinar a robustez de um método de ensaio, pode-se recorrer ao teste-t e ANOVA, de forma que condições experimentais (como reagentes, composição da amostra, pH, temperatura, etc) sejam variadas e se avalie o impacto desta mudança nos resultados de ensaios realizados. Iremos ver estes testes estatísticos na próxima aula!!

Por hoje é só!

Essa aula trouxe muitos conceitos novos e importantes!

Podemos dizer que as coisas mais importantes de um método são a sua exatidão e precisão! Esperamos que tenha ficado claro para todos vocês a aplicação destes importantes parâmetros de um método!

Na próxima aula iremos aprender a como controlar a qualidade de um ensaio, usando cartas de controle!

Até lá!