RP2M
SIBRATEC

Validação de Métodos de Ensaios

Linearidade, Seletividade e Limite de Qualificação

AULA 02

Coordenação: certi

Realização: sociedade brasileira de metrologia

Apoio: Finep; Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações; Pátria Amada Brasil Governo Federal

Rede SIBRATEC de Serviços Tecnológicos
para Produtos de Manufatura Mecânica

www.rp2m.org.br - rp2m.cmi@certi.org.br - (48) 3239-2104

Sumário

Apresentação **3**

1. Etapas iniciais da validação de método **4**

2. Linearidade e a curva de calibração **4**

2.1. Faixa de Trabalho 9

2.2. Etapas para determinar a faixa linear e a linearidade: 14

2.3. Coeficiente de correlação linear r 15

2.4. Coeficiente de determinação R^2 16

3. Seletividade **17**

4. Limite de Detecção **22**

4.1. Avaliação/Percepção visual 22

4.2. Relação Sinal/Ruído 22

4.3. Estimativa a partir da curva analítica 23

4.3.1. Método simplificado 23

4.3.2. Método completo 23

4.4. Estimativa pelo desvio padrão do branco 24

4.4.1. Branco de amostra 24

4.4.2. Branco da amostra com adição da menor concentração aceitável do analito 25

4.5. Comentários sobre o Limite de Detecção 26

5. Limite de Quantificação **27**

5.1. Avaliação / Percepção visual 27

5.2. Relação Sinal/Ruído 27

5.3. Estimativa a partir da curva analítica 28

5.4. Estimativa pelo desvio padrão do branco 28

5.4.1. Branco de amostra 28

5.4.2. Branco da amostra com adição da menor concentração aceitável do analito 29

5.5. Estimativa por meio da curva de desvios padrão 30

5.6. Considerações sobre o LQ 30

Apresentação

Olá!

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

Na aula de hoje apresentaremos as etapas práticas iniciais da validação de um método. Iremos aprender como avaliar uma curva de calibração e estipular a faixa de trabalho adequada para operação do método, no qual os resultados possuem seletividade e linearidade confiáveis. Além disto iremos aprender como estipular o Limite de Detecção e Quantificação de um ensaio.

Prontos para começar?

Então vamos lá!

1. Etapas iniciais da validação de método

O bom desempenho de qualquer técnica analítica depende de dois parâmetros cruciais: a qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no processo. Estabelecer os limites destes parâmetros por meio da estimativa dos indicadores de qualidade do método, na etapa de validação, é uma forma de assegurar a aplicabilidade e o alcance do método utilizado.

Mas o que são estes indicadores?

Indicadores de qualidade do método são indicadores quantitativos do bom desempenho das técnicas utilizadas, ou seja, são passos requeridos como evidência objetiva da validação do método analítico.

Veja quais são eles:

- ✓ Linearidade;
- ✓ Seletividade;
- ✓ Limite de Detecção (LD);
- ✓ Limite de Quantificação (LQ);
- ✓ Exatidão (Tendência/Recuperação);
- ✓ Precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade);
- ✓ Robustez.

A partir de agora falaremos um pouco mais sobre cada um deles... Começando por Linearidade.

2. Linearidade e a curva de calibração

Linearidade é a capacidade de um método analítico de produzir **resultados** que sejam diretamente proporcionais à **concentração* do analito** em amostras, dentro de uma determinada faixa de concentração. A quantificação** requer que se conheça a dependência entre a resposta medida (**Exemplo**: **A área de um cromatograma ou a absorbância de um determinado comprimento de onda**), e a concentração do analito, que nada mais é do que aquilo que se pretende avaliar ou medir.

Observações:

**** Concentração é a quantidade de matéria existente na amostra.***

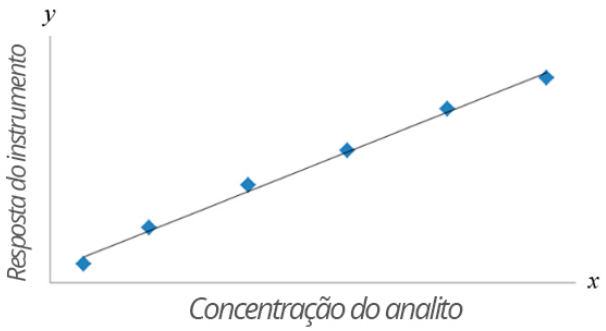
***** Quantificação é o ato de atribuir uma quantidade de determinada unidade de medida a uma amostra.***

Exemplo: Queremos quantificar o Ferro existente em uma amostra de água. Para isto é realizado um ensaio no qual a quantificação poderia dar, por exemplo: 0,56 mg de Fe/L de água.

Exemplos:

A concentração da proteína na carne é de 24%;

A concentração de magnésio na água é de 0,6mg/L.



Isto significa que na linearidade existem duas variáveis a serem correlacionadas: a **concentração do analito** e a **resposta que o instrumento de medição fornece**, desta forma, sempre teremos um gráfico, com eixo ***X*** e ***Y***, no qual o eixo ***X*** usualmente representa a concentração do analito e, o eixo ***Y***, a resposta que o instrumento fornece para cada concentração. A combinação do eixo ***X*** e ***Y*** formam a curva de calbração, a qual terá a linearidade avaliada.

Desta forma, podemos dizer que um método linear pressupões que o eixo ***X*** e ***Y*** estão **correlacionados**, ou seja, a **resposta do instrumento de medição é correlacionada com a concentração do analito**.

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados, ou seja, a resposta dos ensaios em função da concentração do analito, ou então, pode ser calculada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados.

Você sabe o que é este método?

O Método dos Quadrados Mínimos, também conhecido como Quadrados Mínimos Ordinários (MQO) ou ainda OLS (do inglês Ordinary Least Squares), é uma técnica de otimização matemática que procura encontrar o melhor ajuste para um conjunto de dados tentando minimizar a soma dos quadrados das diferenças entre o valor estimado e os dados observados. Estas diferenças são chamadas de resíduos.

O método consiste em utilizar um estimador que minimiza a soma dos quadrados dos resíduos da regressão realizada, de forma a maximizar o grau de ajuste do modelo matemático aos dados observados. Basicamente isso quer dizer que o comportamento de um ensaio de laboratório pode ser representado matematicamente por uma equação.

Um requisito para o método dos mínimos quadrados é que o fator imprevisível, ou seja o erro de medição, deve ser distribuído aleatoriamente e essa distribuição deve ser normal e independente.

Outro requisito é que o modelo deve ser linear nos parâmetros, ou seja, as variáveis devem apresentar uma relação linear entre si. Caso contrário, deve ser usado um modelo de regressão não-linear, podendo ser representado por um polinômio ou por outra função matemática.

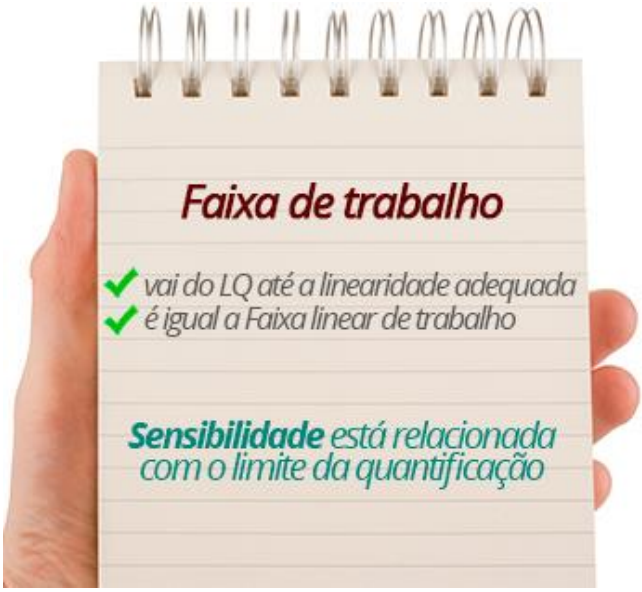
A linearidade possui algumas características que compõe seu conceito. Estas características são: **faixa de trabalho**, **faixa linear de trabalho** e **sensibilidade.**

A Sensibilidade Analítica, pode ser entendida como a mudança na resposta do instrumento que corresponde a uma mudança na quantidade medida (Eurachem guide, 2014). Esta sensibilidade pode ser representada pela inclinação da curva de calibração analítica.

Todo experimento de determinação da faixa de trabalho é iniciado pela escolha de uma faixa preliminar. A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio será usado e, sempre que possível, a concentração mais esperada da amostra deve se situar no centro da faixa de trabalho.

Exemplo: Se for medir poluentes de 0,3 a 3,0, estes valores devem estar contidos na faixa de trabalho do método.

No limite inferior da faixa de concentração, o fator limitante é o valor do limite de quantificação (LQ), que é o menor valor que pode ser detectado em um ensaio com confiabilidade. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição e da sua linearidade.



Resumidamente, podemos dizer que faixa de trabalho e faixa linear de trabalho são a mesma coisa.

Uma faixa de trabalho vai desde o Limite de Quantificação (LQ) até onde o equipamento apresenta linearidade adequada.

A sensibilidade tem a ver com quanto o equipamento está apto a detectar pequenas concentrações do analito, por isso está relacionada com o LQ, ou seja, quanto maior a sensibilidade, menor quantidade o equipamento é capaz de medir ou quantificar.

A maioria dos equipamentos de medição existentes estabelece a sua faixa dinâmica linear. É necessário, entretanto, verificar até que ponto a faixa de concentração do analito coincide com a faixa dinâmica linear e assegurar que nenhum outro fenômeno tenha impacto indesejável na resposta obtida.

A quantificação requer que se conheça a relação entre a resposta medida por um equipamento, como por exemplo, a absorbância, a área de um pico cromatográfico, etc e a concentração do analito, como por exemplo, a quantidade do analito, medida em g/L.

A linearidade é formulada como uma expressão matemática desenvolvida para o cálculo da concentração do analito a ser determinado em uma amostra real.

A equação da reta que relaciona as duas variáveis é:

$$y = a + b.x + \varepsilon$$

Onde:

y: resposta medida (sinal instrumental como absorbância, altura ou área do pico, etc);

x: concentração;

a: coeficiente linear (interseção com o eixo **y**, quando o **x** = 0);

b: coeficiente angular (inclinação da curva analítica = sensibilidade);

ε = Erro, que representa a variação que não é explicada pelo modelo.

O método é mais sensível quando pequenas variações de concentração resultam em maior variação na resposta, ou seja, maior inclinação da curva analítica (*b*). Para construir a curva analítica são necessários, no mínimo, cinco níveis de concentração uniformemente distribuídos na faixa de trabalho pretendida.

Exemplo: pontos 0,5; 1,0; 1,5; 3,0; 4,0 g/L.

O número de replicatas* analisadas para cada concentração deve ser de no mínimo três e, preferencialmente, com os níveis de concentração analisados em ordem aleatória (Thompson, 2002).

Exemplo: cada ponto citado anteriormente sendo medido 3 vezes.

Obs.: Uma duplicata são duas análises, uma triplicata são rês análises...

A linearidade de um método **não pode** ser observada somente pelo gráfico que contém a "resposta analítica" versus "concentração do padrão". Antes de fazer a regressão linear, deve ser verificada a ausência de valores aberrantes para cada nível de concentração e a homocedasticidade, ou seja, a igualdade das variâncias dos dados.

Obs.: Aberrante: (em inglês, outliers) Que se afasta ou desvia do que é considerado normal ou padrão.

A verificação da ausência de valores aberrantes pode ser feita pelo teste de Grubbs (ISO 5725- 3,1994 e ISO 5725-2, 1994) ou com base nos resíduos padronizados Jacknife (SOUZA e JUNQUEIRA, 2005) e a homocedasticidade, isto é, homogeneidade da variância dos resíduos, pelos testes de Cochran (ISO 5725-3:1994), de Levene (SOUZA e JUNQUEIRA, 2005) ou de Brown-Forsythe (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

Obs.: Os testes de Cochran, de Levene e Brown-Forsythe, servem para verificar se a variabilidade é homogênea.

Depois deve-se calcular os coeficientes do modelo da regressão linear simples, os resíduos (resíduo é a diferença entre o valor observado e o valor calculado pela equação da reta de regressão para cada valor de x) e o coeficiente de correlação linear (r) e/ou o coeficiente de determinação R^2. Esses últimos são um bom indicativo do quanto a reta pode ser considerada adequada como modelo matemático, porém não são conclusivos. Desse modo, devem ser avaliados os resíduos para verificar essa adequação.

Os resíduos devem ser representados graficamente e observado se há comportamento aleatório entre os diferentes pontos da curva de calibração. Caso se observe alguma tendência no gráfico de resíduos, pode haver indício de que o modelo linear seja inadequado.

Algumas curvas analíticas não demonstram comportamento linear, mesmo após qualquer transformação. Nesses casos, o comportamento pode ser descrito por uma outra função que modele a relação entre a concentração do analito e a resposta medida, como um polinômio, por exemplo.

Agora vamos falar um pouco mais sobre uma das características que compões o conceito de Linearidade:

2.1. Faixa de Trabalho

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentrações do analito ou valores da propriedade no qual o método pode ser aplicado, esta faixa de concentração é denominada faixa de trabalho.

Em outras palavras, a faixa de trabalho é o **intervalo entre as concentrações inferior e superior** do analito na amostra de ensaio **dentro da qual foi determinado que o procedimento analítico** é adequado ao uso pretendido.

No limite inferior da faixa de concentração, os fatores limitantes são os valores dos limites de detecção e de quantificação. Já no limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição.

Quando falamos em faixa **linear** de trabalho de um método de ensaio, estamos falando do intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com a **precisão, exatidão e linearidade** exigidas, sob as condições especificadas para o ensaio. A faixa linear é definida como a faixa de concentrações na qual a **sensibilidade pode ser considerada constante** e é normalmente expressa nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico.

Dentro da faixa de trabalho pode existir uma faixa de resposta linear e dentro desta, a resposta do sinal terá uma relação linear com o analito ou valor da propriedade. A extensão dessa faixa pode ser estabelecida durante a avaliação da faixa de trabalho.

Veja um exemplo hipotético sobre a estimativa da linearidade do método em uma faixa de trabalho específica:

Análise de Agrotóxicos pela Técnica de “Cromatografia Líquida”.

Esses agrotóxicos são analisados em alimentos, para verificar se os mesmos estão contaminados. A amostra é preparada e é então “lida” em um equipamento chamado cromatógrafo. Este equipamento possui uma “curva de calibração” que tem a sua linearidade estipulada, que foi elaborada previamente usando padrões de agrotóxicos de valores conhecidos.

Conforme o resultado da amostra, o equipamento analítico vai fornecer uma “resposta”, que neste caso é a “área de um pico do cromatograma”. Conforme o resultado desta área, o equipamento converte o resultado para uma concentração de agrotóxico, que é o RESULTADO DO ENSAIO!!

Procedimento:

- ✓ Analisar 6 concentrações diferentes ao longo da faixa de trabalho que é considerada, supostamente, linear (6 concentrações de um padrão de agrotóxico conhecido, por exemplo). Cada concentração do padrão deve ser analisada no mínimo em triplicata. No exemplo cada um foi analisada com 5 replicatas;

Obs: Uma triplicata é o ensaio da mesma amostra ou da mesma concentração feito TRÊS VEZES.

- ✓ Fazer a regressão linear considerando a concentração do padrão analisado no eixo “x” e a resposta analítica (absorbância, área do pico, entre outros) no eixo “y”;

Analisar a existência de valores aberrantes através do teste de Grubbs. Para tanto deve-se calcular o valor de G (teste de Grubbs) da resposta analítica obtida. O cálculo de G deve ser executado diminuindo o valor do possível *outlier* da média do conjunto de dados investigados, dividindo este valor pelo desvio padrão dos dados investigados, conforme segue:

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

Onde:

Valor suspeito = ponto que está sendo verificado como possível outlier

$\bar{x}$ = Média do conjunto de dados

s = desvio padrão do ponto analisado

Obs.: Teste de Grubbs, é um teste é desenvolvido para verificar a presença de valores extremos em observações amostrais. Valores extremos podem ser considerados como manifestações da variabilidade aleatória inerente aos dados, ou apenas um erro no cálculo durante o recolhimento dos dados e até mesmo uma anotação precipitada pelo operador.

Caso $G_{calculado}$ seja maior do que o $G_{tabelado}$ (considerando o tamanho da amostra - n), tem-se evidência de um *outlier*. Recomenda-se que este valor seja excluído para o cálculo da curva de calibração, caso seja detectado. Os valores de G tabelado (ou G crítico) estão apresentados a seguir:

Obs.: O g calculado é obtido da equação: $$G = \frac{valor\ suspeito - \bar{x}}{s}$$

O G tabela é obtido da tabela abaixo.

Tabela para Teste de Grubbs – Alpha de 0,05.

Valor de n	5% de Significância.
3	1,15
4	1,48
5	1,71
6	1,89
7	2,02
8	2,13
9	2,21
10	2,29
11	2,36
12	2,41
13	2,46
14	2,51
15	2,55

Este teste é realizado para verificar se o valor analisado é ou não um outlier. Se for um outlier, o mesmo deve ser excluído!

- ✓ Calcular os resíduos da regressão (valor teórico – área obtida real);
- ✓ Avaliar o R^2 e/ou r, que devem ser maiores do que 0,99;
- ✓ Analisar o gráfico do perfil dos resíduos, que deve possuir uma ordem aleatória, indicando a ausência de tendências e erros sistemáticos ao longo da faixa;

A tabela a seguir mostra os dados para construção da curva de calibração de uma análise de agrotóxicos em alimentos.

Pontos	Concentração	Área (y)	Teste G ($G_{crítico(n=5)}$=1,715)	Áreas (sem outliers)	Valor Previsto (Teórico)	Resíduos
1	0,010	7023	0,328	7023	9522	2499
1	0,010	7035	0,318	7035	9522	2487
1	0,010	6554	0,725	6554	9522	2968
1	0,010	9500	1,764	-	-	-
1	0,010	6947	0,393	6947	9522	2575
2	0,030	21546	1,383	21546	19077	-2469
2	0,030	18590	1,337	18590	19077	487
2	0,030	20436	0,362	20436	19077	-1359
2	0,030	20049	0,006	20049	19077	-972
2	0,030	19594	0,413	19594	19077	-517
3	0,060	50000	1,768	-	-	-
3	0,060	37107	0,223	37107	33408	-3699
3	0,060	35002	0,548	35002	33408	-1594
3	0,060	36064	0,384	36064	33408	-2656
3	0,060	34569	0,614	34569	33408	-1161
4	0,090	44045	1,402	44045	47740	3695
4	0,090	51975	1,423	51975	47740	-4235
4	0,090	47981	0,000	47981	47740	-241
4	0,090	47773	0,074	47773	47740	-33
4	0,090	48125	0,052	48125	47740	-385
5	0,120	68796	1,070	68796	62072	-6724
5	0,120	56312	1,310	56312	62072	5760
5	0,120	62547	0,121	62547	62072	-475
5	0,120	67952	0,909	67952	62072	-5880
5	0,120	60312	0,547	60312	62072	1760
6	0,150	72843	0,647	72843	76404	3561
6	0,150	76430	0,804	76430	76404	-26
6	0,150	76955	1,016	76955	76404	-551
6	0,150	71066	1,366	71066	76404	5338
6	0,150	74917	0,192	74917	76404	1487

Explicando a tabela:

Coluna 1: PONTOS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

Coluna 2: CONCENTRAÇÃO DO PADRÃO DE AGROTÓXICO USADO EM CADA UM DOS PONTOS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

Coluna 3: RESPOSTA DO EQUIPAMENTO CROMATÓGRAFO, QUE É A ÁREA DO PICO OBTIDO NA ANÁLISE DE CADA CONCENTRAÇÃO DIFERENTE DO PADRÃO DE AGROTÓXICO

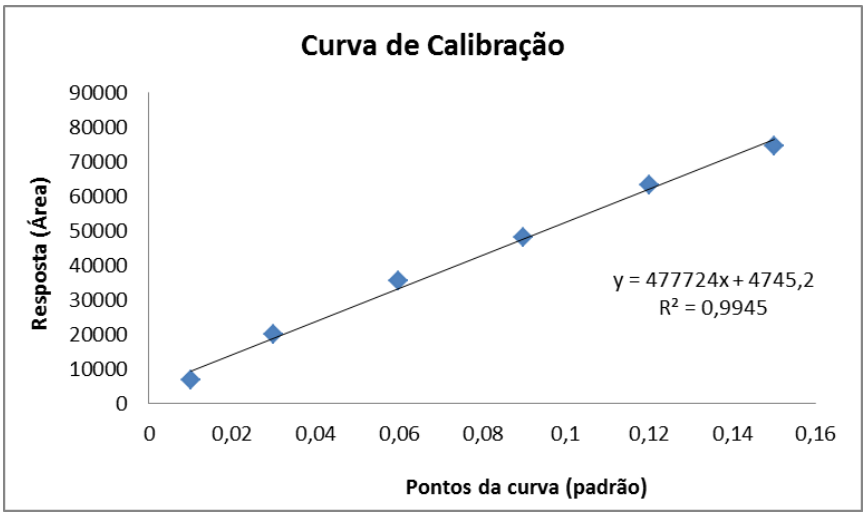
Coluna 4: TESTE DE GRUBBS CONSIDERANDO OS DADOS DA COLUNA 3, QUE É A RESPOSTA DO EQUIPAMENTO

Coluna 5: ÁREA DO EQUIPAMENTO (IGUAL A COLUNA 3), MAS SEM OS DADOS QUE FORAM CONSIDERADOS OUTLIERS NO TESTE DE GRUBBS

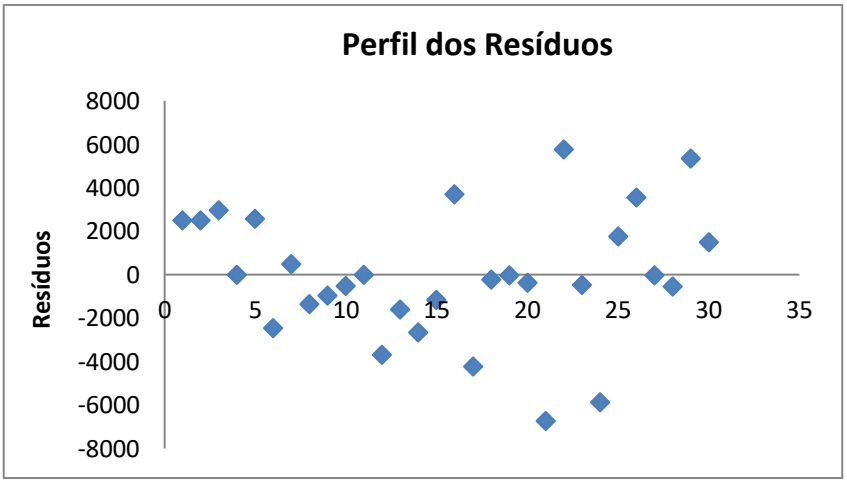
Coluna 6: O VALOR PREVISTO (TEÓRICO) É DADO PELA EQUAÇÃO DA RETA Y = 477724x + 4745,2 , ONDE O X É O VALOR DA CONCENTRAÇÃO (COLUNA 2).

Coluna 7: OS RESÍDUOS SÃO O ERRO DA CURVA, QUE É O VALOR TEÓRICO – VALOR PRÁTICO (ÁREAS), QUE É A COLUNA 6 – COLUNA 5.

- ✓ Os dados do exemplo da curva de calibração apresentaram 2 *outliers* (nos pontos 1 e 3 -analisados pelo teste de Grubbs), onde o $G_{calculado}$ foi maior do que o $G_{tabeldo}$ (1,715, para um n=5). Os demais pontos não apresentaram *outliers*.



- ✓ A curva de calibração está apresentando um R^2 adequado, com valor de 0,9945.



- ✓ O gráfico do perfil dos resíduos apresenta aleatoriedade ao longo da faixa de trabalho do equipamento, o que é considerado adequado.

2.2. Etapas para determinar a faixa linear e a linearidade:

Primeira etapa:

Objetivo: Seleção da faixa de trabalho.

Procedimento:

- ✓ Identificar inicialmente, por observação visual, a faixa linear aproximada e o limite superior e inferior da faixa de trabalho.
- ✓ Colocar no eixo x as concentrações do analito e no eixo do y as respostas das medições. Fazer pelo menos uma medição por nível estabelecido (pelo menos 5 níveis).

Matriz* : Usar um Branco** com adição de concentrações variadas do analito ou Branco da amostra*** com adição de concentrações variadas do analito.

Branco = água reagente;

Branco da amostra = matriz da amostra sem o analito de interesse.

Segunda etapa:

Objetivo: confirmar a linearidade na faixa de trabalho selecionada.

Procedimento :

- ✓ Colocar no eixo x as concentrações do analito e no eixo do y as respostas das medições;
- ✓ Verificar a existência de valores aberrantes que possam interferir na regressão;
- ✓ Verificar a homocedasticidade da distribuição dos dados.

Matriz: Usar Materiais de referência (diferentes concentrações), na faixa selecionada ou Branco da amostra com adição de concentrações variadas do analito, na faixa selecionada. Usar no mínimo 5 níveis de concentração, com no mínimo 3 replicatas por cada nível.

Obs: preparar diferentes concentrações de modo independente e **não** alíquotas da mesma solução mãe.

Análise:

Aplicar a regressão linear adequada e calcular o **coeficiente de correlação** (r) e/ou R^2.

Com base na estimativa dos resíduos, construir um gráfico e avaliar a tendência. A distribuição aleatória em torno da linha reta confirma a linearidade. Tendências sistemáticas indicam a não linearidade.

Mas o que é o coeficiente de correlação (r)?

Observações:

Matriz: Compreende todos os constituintes de amostra analítica. Logo, além do analito a matriz da amostra contém os outros componentes chamados "concomitantes".

****Os brancos indicam a interferência de outras espécies na amostra e os traços de analito encontrados nos reagentes usados na preservação, preparação e análise.***

Medidas frequentes de brancos também permitem detectar se analitos provenientes de amostras previamente analisadas estão contaminando as novas análises, por estarem aderidos aos recipientes ou aos instrumentos.

*****Branco de amostra é uma matriz igual à da amostra, contudo, sem as substâncias que você deseja analisar. Ele serve para verificar se existem interferências no procedimento analítico.***

2.3. Coeficiente de correlação linear r

O coeficiente de correlação de Pearson (r) é uma medida do grau de relação linear entre duas variáveis quantitativas. É um dos critérios para aprovação da linearidade.

Este coeficiente varia entre os valores -1 e 1. O valor 0 (zero) significa que não há relação linear, o valor 1 indica uma relação linear perfeita e o valor -1 indica uma relação linear perfeita mas inversa, ou seja quando uma das variáveis aumenta a outra diminui. Quanto mais próximo estiver de 1 ou -1, mais forte é a associação linear entre as duas variáveis.

O coeficiente de correlação de Pearson é normalmente representado pela letra ***r*** e a sua fórmula de cálculo é:

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\left(\sum (x_i - \bar{x})^2\right)\left(\sum (y_i - \bar{y})^2\right)}}$$

Existem autores que estipulam as faixas a seguir para interpretar o valor de r:

- 0.9 para mais ou para menos indica uma correlação muito forte.
- 0.7 a 0.9 positivo ou negativo indica uma correlação forte.

- 0.5 a 0.7 positivo ou negativo indica uma correlação moderada.
- 0.3 a 0.5 positivo ou negativo indica uma correlação fraca.
- 0 a 0.3 positivo ou negativo indica uma correlação desprezível.

Entretanto, segundo o critério de validação do manual do MAPA, o ***r*** deve ser maior do que 0,99 para ser considerado aceito. Na validação, em geral, este é o critério adotado.

Agora vamos falar sobre outro critério para aprovação da linearidade...

2.4. Coeficiente de determinação R^2

O coeficiente de determinação, também chamado de R^2, é uma medida de ajustamento de um modelo estatístico linear generalizado, como a Regressão linear, em relação aos valores observados. O R^2 varia entre 0 e 1, indicando, em percentagem, o quanto o modelo consegue explicar os valores observados. Quanto maior o R^2, mais explicativo é modelo, melhor ele se ajusta à amostra.

Por exemplo, se o R^2 de um modelo é 0,8234, isto significa que 82,34% da variável dependente consegue ser explicada pelos regressores presentes no modelo.

Uma das formas de avaliar a qualidade do ajuste do modelo é por meio do coeficiente de determinação. Basicamente, este coeficiente indica quanto o modelo foi capaz de explicar os dados coletados.

O coeficiente de determinação é dado pela expressão:

$$R^2 = \frac{SQR}{SQT} = 1 - \frac{SQE}{SQT} = \frac{\hat{\beta}_1 \sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})Y_i}{\sum_{i=1}^{n}(Y_i - \bar{Y})^2},$$

ou seja, é a razão entre a soma de quadrados da regressão e a soma de quadrados total.

No modelo com intercepto, podemos escrever:

$$R^2 = \frac{\hat{\beta}_1 \sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})Y_i}{\sum_{i=1}^{n}(Y_i - \bar{Y})^2} = \frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})Y_i \sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})Y_i}{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^{n}(Y_i - \bar{Y})^2} = \frac{\left(\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})Y_i\right)^2}{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^{n}(Y_i - \bar{Y})^2}.$$

Notemos que $0 \leq R^2 \leq 1.$

O R^2 é, portanto, uma medida descritiva da qualidade do ajuste obtido. Em geral nos referimo ao R^2 como a quantidade de variabilidade nos dados que é explicada pelo modelo de regressão ajustado. Entretanto, o valor do coeficiente de determinação depende do número de observações (n), tendendo a crescer quando n diminui.

Exemplo: Se $n = 2$, tem-se sempre $R^2 = 1.$

O R^2 deve ser usado com cuidado, pois é sempre possível torná-lo maior pela adição de um número suficiente de termos* ao modelo. Então se, por exemplo, não há dados repetidos (mais do que um valor y para um mesmo x) um polinômio de grau $(n-1)$ dará um ajuste perfeito $(R^2 = 1)$ para n dados. Assim, quando há valores repetidos, o R^2 nunca será igual a 1, pois o modelo não poderá explicar a variabilidade devido ao erro puro.

Obs.: Termos: Número de variáveis na equação.

Embora R^2 aumente com a adição de termos ao modelo, isto não significa necessariamente que o novo modelo é superior ao anterior. A menos que a soma de quadrados residual do novo modelo seja reduzida por uma quantidade igual ao quadrado médio residual original, o novo modelo terá um quadrado médio residual maior do que o original, devido a perda de 1 grau de liberdade. Na realidade esse novo modelo poderá ser pior do que o anterior.

Normalmente em validação de métodos se exige um R^2 maior do que 0,99 para a linearidade ser considerada adequada.

Bom, agora que já falamos sobre linearidade, suas características e critérios, vamos falar um pouquinho sobre outro passo importante na validação de método...

3. Seletividade

Seletividade é o grau em que o método pode quantificar o analito na presença de outros analitos, matrizes ou de outro material potencialmente interferente (AOAC, 2002). Assim, um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da resposta de outros, é chamado método seletivo.

Os 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.

Cabe salientar que se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a tendência e a precisão estarão seriamente comprometidas.

Mas como analisar a seletividade de um método?

A seletividade pode ser analisada com os seguintes procedimentos:

a) Fazer a análise com a amostra e materiais de referência pelo método em estudo e outros métodos validados. Neste caso, deve-se demostrar a habilidade, do método em estudo, de identificar e dosar o analito na presença de interferentes;
b) Analisar amostras contendo vários possíveis interferentes na presença do analito de interesse. Neste caso, deve-se demostrar o Efeito de interferentes – se a presença de interferente acentua ou inibe a detecção ou quantificação do analito de interesse.

Observe que a matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. Esses interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, comprometendo o resultado. Adicionalmente a magnitude desse efeito também pode depender da concentração. Logo, no estudo de seletividade é necessário verificar também a existência de efeito de matriz.

Que tal entendermos melhor o que é uma Matriz?

Matriz nada mais é do que o item que descreve a amostra, por exemplo: a água de um rio, o alimento que é analisado, o combustível que está sendo medido, etc.

O procedimento adotado para o estudo do efeito de matriz depende da disponibilidade do analito, da matriz sem o analito e de amostras de referência nas concentrações de interesse.

Algumas formas de como esse estudo pode ser conduzido estão descritos na Tabela a seguir:

Caso	Procedimento	Hipóteses	Teste estatístico	Conclusões
Matriz sem o analito disponível ou um grupo satisfatório de amostras de referência disponível	Preparar dois grupos de amostras de teste, um com a matriz e o outro sem, ambos os grupos com a concentração do analito idêntica em cada nível de concentração de interesse. Deve-se testar toda a faixa de estudo (baixa, média e alta), com no mínimo 3 replicatas por nível de concentração.	1) a matriz não afeta a precisão do analito nos níveis de concentrações estudados 2) a matriz não afeta o sinal do analito nos níveis de concentrações estudados	Teste *F(Snedecor)* de homogeneidade de variâncias, por nível de concentração e Teste *t (Student)* de comparação de médias, por nível de concentração	Se o teste *F(Snedecor)* não for significativo, a matriz não causa um efeito sobre a precisão, por nível de concentração. e Se o teste t (Student) não for significativo, a matriz não causa um efeito sobre o resultado, por nível de concentração.
Matriz sem o analito	Preparar duas curvas analíticas, que contenham a mesma adição de analito para cada nível de concentração. Uma curva é preparada com adição de analito na matriz da amostra (que, eventualmente pode conter um nível do analito) e a outra curva analítica não inclui a matriz de amostra. Devem ser preparados, no mínimo, 5 níveis de concentração com 3 replicatas por nível. Obs.: ideal é usar a matriz sem o analito, mas nem sempre isso é possível.	A matriz não interfere na inclinação da curva de adição padrão.	Teste *t* para inclinações das curvas. Este mesmo procedimento também pode ser aplicado no caso acima.	Comparam-se as inclinações (coeficiente *s* angulares) das curvas analíticas. Se as inclinações dessas duas curvas de regressão linear não diferirem significativamente, não há efeito de matriz, o que pode ser observado graficamente pelo paralelismo aproximado das duas curvas. Caso contrário, a curva analítica deve ser preparada na matriz. Os dados obtidos nesse procedimento podem ser usados para estudo da linearidade.

Vamos a um exemplo hipotético sobre a análise da seletividade do método em uma faixa de trabalho específica.

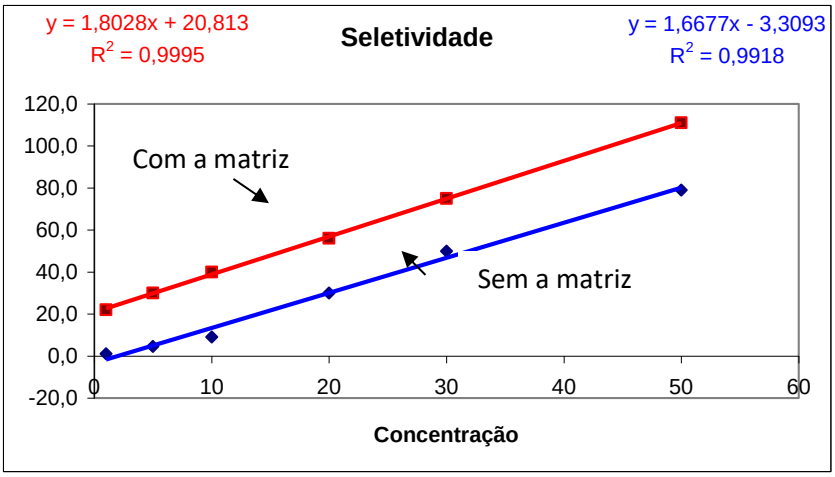
Procedimento:

- ✓ Analisar pelo menos 6 concentrações diferentes de padrão ao longo da faixa analítica (com a matriz de interesse e sem a matriz de interesse);
- ✓ Fazer a regressão linear das duas curvas (para avaliação da curva deve-se levar em conta os conceitos de aceitação da linearidade de um método);

✓ Comparar as duas curvas analíticas. Caso elas sejam paralelas, pode-se dizer que não há interferência da matriz na determinação da substância de interesse, portanto é uma evidência de que o método é seletivo.

Observe:

Pontos	Curva analítica sem a matriz	Curva analítica com a matriz
1	1,1	22,0
5	4,5	30,0
10	9,0	40,0
20	30,0	56,0
30	50,0	75,0
50	79,0	111,0



Além disso, pode-se aplicar o teste F para verificar as variâncias das curvas, verificando se elas possuem diferenças significativas;

✓ Para calcular o teste F deve-se proceder da seguinte forma:

✓ Primeiro calcula-se o valor de $F_{calculado}$ (comparando a variância média dos valores das diferentes curvas);

$$F = Variância_{(maior)} / Variância_{(menor)}$$

$$Variância = s^2$$

✓ Depois compara-se o valor de $F_{calculado}$ com $F_{tabelado}$. Para descobrir o valor de $F_{tabelado}$ deve-se proceder da seguinte forma:

✓ Para encontrar o $F_{tabelado}$ deve-se analisar os graus de liberdade das curvas. Os graus de liberdade são calculados como sendo n-1, onde n é o número de análises que foram realizadas para calcular a variância. A tabela de distribuição F está apresentada a seguir:

Limites unilaterais da distribuição F de Fisher-Snedecor ao nível de 5% de probabilidade

GL	V1															
V2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	20
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.0	243.9	244.7	245.4	245.9	248.0
2	18.513	19.000	19.164	19.247	19.296	19.329	19.353	19.371	19.385	19.396	19.405	19.412	19.419	19.424	19.429	19.446
3	10.128	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.785	8.763	8.745	8.729	8.715	8.703	8.660
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964	5.936	5.912	5.891	5.873	5.858	5.803
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735	4.704	4.678	4.655	4.636	4.619	4.558
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060	4.027	4.000	3.976	3.956	3.938	3.874
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637	3.603	3.575	3.550	3.529	3.511	3.445
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.688	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347	3.313	3.284	3.259	3.237	3.218	3.150
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137	3.102	3.073	3.048	3.025	3.006	2.936
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978	2.943	2.913	2.887	2.865	2.845	2.774
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854	2.818	2.788	2.761	2.739	2.719	2.646
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.753	2.717	2.687	2.660	2.637	2.617	2.544
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671	2.635	2.604	2.577	2.554	2.533	2.459
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602	2.565	2.534	2.507	2.484	2.463	2.388
15	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901	2.790	2.707	2.641	2.588	2.544	2.507	2.475	2.448	2.424	2.403	2.328
16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852	2.741	2.657	2.591	2.538	2.494	2.456	2.425	2.397	2.373	2.352	2.276
17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810	2.699	2.614	2.548	2.494	2.450	2.413	2.381	2.353	2.329	2.308	2.230
18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773	2.661	2.577	2.510	2.456	2.412	2.374	2.342	2.314	2.290	2.269	2.191
19	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740	2.628	2.544	2.477	2.423	2.378	2.340	2.308	2.280	2.256	2.234	2.155
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348	2.310	2.278	2.250	2.225	2.203	2.124

✓ - Se $F_{calculado}$ for menor do que $F_{tabelado}$, a precisão das duas curvas, com diferentes substâncias/matrizes, não possui diferença significativa;

Exemplo (dados hipotéticos):

Média das variâncias da curva com matriz (calculado com 4 repetições) = 1,2

Média das variâncias da curva sem matriz (calculado com 4 repetições) = 0,9

Obs: Cada ponto da curva foi calculado com 4 repetições.

$F_{calculado}$= 1,2 / 0,9 = 1,33

$F_{tabelado}$= 9,28 (para n-1 graus de liberdade)

Conclusão: $F_{calculado} < F_{tabelado}$, logo não existem diferenças significativas entre a variabilidade das análises nas diferentes curvas (com e sem a matriz). Esta também é uma indicação da seletividade do método.

Entendido?

Então vamos ao próximo passo:

4. Limite de Detecção

Limite de detecção (LD) de um procedimento analítico individual é a **menor quantidade de analito na amostra que pode ser detectada**, mas não necessariamente quantificada sob as condições estabelecidas para o ensaio (ICH, 2005; NATA, 2013).

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

A importância dessa determinação e os problemas associados a ela, advêm do fato de que a probabilidade de detecção não muda rapidamente de "0" para "1" quando seu limiar é ultrapassado.

O limite de detecção para um procedimento analítico pode variar em função do tipo da amostra. Por isto é fundamental assegurar-se de que todas as etapas de processamento do método analítico sejam incluídas na determinação desse limite de detecção, que também é importante para ensaios qualitativos.

Existem diversos modos de se calcular o limite de detecção. A seguir apresentaremos algumas dessas abordagens.

4.1. Avaliação/Percepção visual

Esta avaliação, baseia-se na percepção da resposta da concentração do analito ou da propriedade observada.

Nesta abordagem, o limite de detecção é determinado pela análise de amostras com concentrações conhecidas de analito ou por valores de propriedades conhecidos e pela definição de um nível mínimo em que o analito/propriedade pode ser detectado com confiança.

Normalmente são realizadas sucessivas diluições até se encontrar a menor concentração ou menor valor de propriedade que pode ser diferenciado do branco.

4.2. Relação Sinal/Ruído

Essa abordagem só pode ser aplicada em procedimentos analíticos que apresentem ruído de linha de base (normalmente em equipamento instrumentais eletrônicos).

A relação sinal/ruído é determinada pela comparação dos sinais medidos de amostras com baixas concentrações conhecidas do analito e dos ruídos dos brancos de amostras, definindo-se a concentração mínima em que o analito pode ser detectado com confiança. Uma relação sinal/ruído de 3:1 ou 2:1 é geralmente considerada aceitável para estimativa do limite de detecção.

É importante ressaltar que a região do ruído do branco deve ser a mesma do sinal medido.

4.3. Estimativa a partir da curva analítica

Para estimativa a partir da curva analítica, pode ser utilizado o método simplificado ou o método completo. Veja a diferença entre eles:

4.3.1. Método simplificado

O limite de detecção (LD) pode ser estimado pela equação: **LD = 3,3 s / b**

Onde:

s = desvio padrão da resposta do branco

b = inclinação (coeficiente angular) da curva analítica

NOTA 1: Esse método fornece melhores resultados em nível de traços. Em altas concentrações, esse método estima valores de LD acima dos reais.

NOTA 2: Quando o branco não gera sinal, pode-se adotar para o valor de —s" o desvio padrão do menor nível da curva analítica.

NOTA 3: A inclinação —b|| pode ser estimada por meio da curva analítica do analito construída na avaliação da linearidade.

4.3.2. Método completo

Essa abordagem utiliza $s_{y/x}$ no lugar de s_B na estimativa do limite de detecção na equação:

Onde:

$$LD = y_B + 3s_B$$

Y_B: sinal do branco

S_b: desvio padrão do branco

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

$S_{y/x}$: desvio padrão residual;

Y_i : valor individual de sinal instrumental (resposta);

$\hat{Y}_i$: valor da resposta predita pela equação da curva analítica;

n: número de medições.

O valor do coeficiente linear da curva analítica pode ser utilizado como sinal do branco yB, que é uma estimativa mais exata do valor de yB do que uma simples medição do branco. O valor obtido para LD está em termos de resposta e deve ser convertido para concentração por meio da equação de regressão da curva analítica.

Por exemplo, se um método qualquer no qual os valores de coeficientes angular e linear são respectivamente 1,93 e 1,52, e o valor de sy/x é de 0,4329, tem-se:

LD = 1,52 + 3 x 0,4329, ou seja, 2,82 em termos de resposta. Usando a equação de regressão, o LD equivale a 0,67 pg/mL (Fonte: Miller & Miller, 2010).

4.4. Estimativa pelo desvio padrão do branco

A estimativa pelo desvio padrão do branco pode ser realizada com branco de amostra ou com branco da amostra com adição da menor concentração aceitável do analito.

Veja a diferença:

4.4.1. Branco de amostra

O branco de amostra é a matriz sem o analito de interesse. O limite de detecção (LD) pode ser estimado pela equação:

$$LD = \overline{X} + t_{(n-1,1-\alpha)} . s$$

Onde:

X : média dos valores dos brancos da amostra;

t : abscissa da distribuição de Student, dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança;

s : desvio padrão amostral dos brancos da amostra.

NOTA 1: A média e o desvio padrão amostral dos brancos da amostra são dependentes da matriz.

NOTA 2: Válido somente quando os valores dos brancos apresentarem um desvio padrão amostral diferente de zero.

4.4.2. Branco da amostra com adição da menor concentração aceitável do analito

O limite de detecção (LD) pode ser estimado pela equação:

$$LD = 0 + t_{(n-1,1-\alpha)} . s$$

sendo:

t : abscissa da distribuição de Student, dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança ;

s : desvio padrão amostral dos brancos da amostra, com adição.

NOTA: A menor concentração aceitável é aquela tida como a concentração mais baixa para a qual um grau de incerteza pode ser considerado satisfatório.

É fundamental que sejam realizadas avaliações independentes em amostras com concentração igual ao limite de detecção determinado.

O número de replicatas muito elevado pode superestimar o limite de detecção; por essa razão, esse número (n) deve expressar a rotina do laboratório.

Por exemplo: no caso de se analisar 7 alíquotas, tem-se 7-1 = 6 graus de liberdade de uma matriz de branco da amostra com adição da menor concentração aceitável do analito. Para esses graus de liberdade, o valor de ***t*** unilateral, para 99% de confiança é 3,143. O LD será igual a 3,143 vezes o desvio padrão amostral.

Exemplo:

Alíquota	Resultado (g/L)
1	0,30
2	0,31
3	0,33
4	0,39
5	0,40
6	0,32
7	0,31
Desvio-padrão	0,0407
t	3,143
LD (g/L)	0,13

4.5. Comentários sobre o Limite de Detecção

O método analítico deve ser especificado e o LD para cada analito deve ser expresso nas unidades apropriadas, de acordo com o preconizado no método analítico. A matriz da amostra usada para determinar o LD deve ser identificada.

Uma vez estabelecido o LD por uma das abordagens citadas, ou outra abordagem contida em documentos nacionais ou internacionais reconhecidos, esse deve ser confirmado por meio da análise de amostras independentes no mesmo nível de concentração/propriedade do LD. Quando cabível, adota-se um número de 6 replicatas (Massart, 1997).

Caso alguma das replicatas não seja detectada, significa que o LD determinado pode ter sido subestimado, devendo, assim, ser reavaliado.

Certo?

Vamos ao próximo passo...

5. Limite de Quantificação

Limite de quantificação (LQ) de um procedimento analítico individual é a **menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão aceitáveis** (ICH, 2005).

Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). Esse limite, após ter sido determinado, deve ser testado com amostras independentes no mesmo nível de concentração/propriedade do LQ, para averiguar se a recuperação/tendência e a precisão conseguidas são satisfatórias. Quando pertinente, adota-se um número de 6 replicatas. O limite de quantificação é importante para métodos quantitativos.

Existem diversos modos de se calcular o limite de quantificação. A seguir apresentaremos algumas destas abordagens.

5.1. Avaliação / Percepção visual

Esta avaliação baseia-se na percepção da resposta da concentração do analito ou propriedade observada.

O limite de quantificação é geralmente determinado pela análise de amostras com concentrações conhecidas dos analitos ou valores de propriedades conhecidos e pelo estabelecimento de um nível mínimo em que o analito pode ser quantificado com recuperação/tendência e precisão aceitáveis.

Normalmente são realizadas sucessivas diluições até se encontrar a menor concentração ou menor valor de propriedade que pode ser quantificado com confiança.

5.2. Relação Sinal/Ruído

Esta abordagem só pode ser aplicada em procedimentos analíticos que apresentem ruído de linha de base. Esse ruído pode ser associado a variabilidade gerada pela rede elétrica ou por condições ambientais ou instrumentais que não se mantém constantes e que faça os resultados os equipamento oscilar.

A relação sinal/ruído é determinada pela comparação dos sinais medidos de amostras com baixas concentrações conhecidas do analito e dos ruídos dos brancos de amostras, definindo-se a concentração

mínima em que o analito pode ser detectado com confiança. A relação sinal/ruído típica para estimativa do limite de quantificação é de 10:1. Também podem ser adotadas relações sinal/ruído de 6:1 e 5:1, em função do método. É importante ressaltar que a região do ruído do branco deve ser a mesma do sinal medido.

5.3. Estimativa a partir da curva analítica

O limite de quantificação (LQ) pode ser estimado pela equação:

$$LQ = 10\,s / b$$

Onde:

s : desvio padrão da resposta do branco

b : inclinação (coeficiente angular) da curva analítica

NOTA 1: Esse método fornece melhores resultados em nível de traços. Em altas concentrações, este método estima valores de LQ acima dos reais.

NOTA 2: Quando o branco não gera sinal, pode-se adotar para o valor de —s" o desvio padrão do menor nível da curva analítica. ***(obs.: S = desvio)***

NOTA 3: A inclinação —b|| (coeficiente b) pode ser estimada por meio da curva analítica do analito construída na avaliação da linearidade.

5.4. Estimativa pelo desvio padrão do branco

A estimativa pelo desvio padrão do Branco pode ser feita por meio do Branco de amostra ou por Branco da amostra com adição da menor concentração aceitável do analito.

Veja a diferença:

5.4.1. Branco de amostra

O limite de quantificação (LQ) pode ser estimado pela equação:

$$LQ = \overline{X} + 10.s$$

Onde:

X : média dos valores dos brancos da amostra;

s : desvio padrão amostral dos brancos da amostra.

NOTA 1: A média e o desvio padrão amostral dos brancos da amostra são dependentes da matriz.

NOTA 2: Válido somente quando os valores dos brancos apresentarem um desvio padrão amostral diferente de zero.

NOTA 3: A IUPAC* propõe o valor "10" como valor padrão da equação (10) (Massart, 1997). Pode-se adotar também os valores "5" ou "6" em função do rigor analítico exigido.

Obs.: IUPAC é a sigla de "International Union of Pure and Applied Chemistry", que em português é "União Internacional da Química Pura e Aplicada". A IUPAC é uma organização que foi criada com o objetivo de elaborar as regras da nomenclatura oficial de todos os compostos químicos.

5.4.2. Branco da amostra com adição da menor concentração aceitável do analito

O limite de quantificação (LQ) pode ser estimado pela equação:

$$LQ = 0 + 10.s$$

Onde:

s : desvio padrão amostral dos brancos da amostra, com adição.

NOTA 1: A menor concentração aceitável é aquela tida como a concentração mais baixa para a qual um grau de incerteza pode ser considerado satisfatório.

NOTA 2: A IUPAC propõe o valor 10 como valor padrão da equação (11) (Massart, 1997). Pode-se adotar também os valores 5 ou 6 em função do rigor analítico exigido.

A tabela a seguir mostra os resultados de 7 análises para se estipular o LQ.

Alíquota	Resultado (g/L)
1	0,30
2	0,31
3	0,33
4	0,39
5	0,40
6	0,32
7	0,31
Desvio-padrão	0,0407
LQ = 5 x s	0,20
LQ = 6 x s	0,24
LQ = 10 x s	0,41

5.5. Estimativa por meio da curva de desvios padrão

Nesta abordagem são preparadas soluções com adição de concentrações variadas do analito ao branco, próximas ao LD/LQ que se supõe para o método. O LQ pode ser determinado pela análise de 7 replicatas de amostra em pelo menos 3 concentrações distintas, sendo a menor concentração razoavelmente próxima de zero. Um gráfico de concentração versus desvio padrão de cada nível é construído e então extrapolado para estimar o desvio padrão à concentração ZERO(s0).

O LQ do método é considerado como **b+10s0**, onde **b** é o valor médio da amostra branco (NATA, 2013).

5.6. Considerações sobre o LQ

O LQ pode ser determinado a partir do LD, porém o mais apropriado é determinar o LD a partir do LQ por meio da equação:

$$LD = LQ / 3,3$$

O método analítico deve ser especificado e o LQ, para cada analito, deve ser expresso nas unidades apropriadas, de acordo com o preconizado no método analítico. A matriz da amostra usada para determinar o LQ deve ser identificada.

Uma vez estabelecido o LQ por uma das abordagens citadas ou outra abordagem contida em documentos nacionais ou internacionais reconhecidos, esse deve ser confirmado experimentalmente por meio da análise de amostras independentes no mesmo nível de concentração/propriedade do LQ. Quando cabível, adota-se

um número de 6 replicatas (Massart,1997) e deve-se avaliar se a concentração do LQ tem precisão e recuperação aceitáveis, calculando-se o percentual de recuperação e o percentual do coeficiente de variação. Caso essa concentração estimada como LQ não atenda à precisão e à recuperação desejadas, significa que o LQ está subestimado e deve ser realizada uma nova estimativa com concentrações maiores.

A concentração do LQ é sempre igual ou maior ao primeiro ponto da curva analítica. Para a análise em nível de traços, é recomendado adotar o LQ como a concentração mais baixa da curva analítica. Nesse caso, é importante incluir um controle no método, em concentração equivalente ao LQ, para acompanhar o desempenho nessa concentração e fornecer dados para a reestimação periódica do mesmo com os dados de controle.

NOTA 1: Para estimar o LQ de um método, devem ser realizadas análises em amostras, incluindo todas as etapas do procedimento analítico (NATA,2013). No caso em que o método de medição tiver etapa de concentração, em amostras com resultados abaixo do LQ, o laboratório deve expressar claramente o fator de concentração na expressão do resultado (<LQ) em amostras reais.

Entendido?

Agora que sabemos o que significa linearidade, faixa de trabalho, seletividade e limites de detecção e quantificação estamos prontos para avançar no conteúdo...

Mas por hoje é só!!

Na próxima aula iremos aprender a como avaliar a exatidão, precisão e robustez de um método de ensaio.

Bons estudos!