



3 Controlo interno da qualidade dos ensaios

3.3 Análise de amostras fortificadas

3.3.1 Validação

- Quantificação da recuperação de analito:

- Habitualmente, a capacidade do procedimento recuperar o analito adicionado é quantificada através do cálculo da recuperação de analito, R :

$$R = \frac{\text{Teor estimado de analito}}{\text{Teor esperado de analito}}$$

Quando as amostras fortificadas têm analito nativo: “Teor esperado” = “Teor de analito nativo”+”Teor adicionado”.

- Quando a amostra adicionada tem analito é necessário quantificar o teor de analito nativo.
- A fortificação de itens sem analito nativo permite a produção de estimativas menos incertas da veracidade da medição.

rjsilva@fc.ul.pt



3 Controlo interno da qualidade dos ensaios

3.3 Análise de amostras fortificadas

3.3.1 Validação

- Avaliação da significância do erro sistemático (teste-t):

Os dados recolhidos do desempenho da medição devem ser usados para avaliar a significância do desvio da recuperação média observada em relação ao valor ideal de 100 %:

O intervalo:

$$\bar{R} \pm \frac{t(n-1;95\%)s_{Rec}}{\sqrt{n}}$$

... deve incluir o valor 1 (100 %).

Desvio padrão da recuperação média:

$$s_{Rec}/\sqrt{n}$$

rjsilva@fc.ul.pt



3 Controlo interno da qualidade dos ensaios

3.3 Análise de amostras fortificadas

3.3.1 Validação

- Avaliação da significância do erro sistemático (teste- t):

(...)

A utilização deste critério baseia-se no seguinte pressuposto:

- A tolerância ($t \cdot s_{Rec} / \sqrt{n}$) quantifica os desvios da recuperação média em relação ao valor ideal de 100 % (i.e., a incerteza associada à preparação dos ensaios de recuperação é desprezável ou está incluída em s_{Rec}).

Situação mais comum!

rjsilva@fc.ul.pt



3 Controlo interno da qualidade dos ensaios

3.3 Análise de amostras fortificadas

3.3.2 Controlo da qualidade

- Critérios

i) Estimados com base na dispersão observada, durante a validação, em ensaios de recuperação. Recuperação aceite se dentro do intervalo:

$$\bar{R} \pm t(n-1; 95\%) \cdot s_{Rec}$$

\bar{R} – recuperação média;
 n – n°. de ensaios de recuperação;
 $t(n-1; 95\%)$ – t -Student para $(n-1)$ graus de liberdade e um nível de confiança de 95 %;
 s_{Rec} – desvio padrão da recuperação.

Pode-se aumentar o nível de confiança para aumentar a taxa de sucesso do critério (ex. 99 %)

rjsilva@fc.ul.pt

C

3 Controlo interno da qualidade dos ensaios

3.3 Análise de amostras fortificadas

3.3.2 Controlo da qualidade

- Critérios

(...)

ii) Carta de controlo [equivalente a i); ver alínea 3.6];

iii) Limites de aceitação função do objectivo do ensaio (ver alínea 3.6).

- Frequência do controlo:

i) Um ensaio de recuperação por série de análises;

ii) Quando o procedimento de ensaio é robusto, esta frequência pode ser alargada (exemplo: de 4 em 4 séries de análises se forem realizadas mais de 4 séries de análises por mês).



rjsilva@fc.ul.pt

C

3 Controlo interno da qualidade dos ensaios

3.4 Controlo da qualidade dos limites de detecção e/ou quantificação

• **Limite de detecção (LD) (“detection limit”)**: Valor medido, obtido por um dado procedimento de medição, para o qual a probabilidade de declarar falsamente a ausência dum constituinte num material é β , sendo α a probabilidade de declarar falsamente a sua presença [1].

NOTA 1: A IUPAC recomenda valores por defeito para α e β iguais a 0,05.

• **Limite de quantificação, LQ (“limit of quantitation”)**: Menor concentração ou massa de analito que pode ser analisada quantitativamente, por um determinado procedimento, com uma fiabilidade razoável. [3]

1 – IPQ, IMETRO, Vocabulário Internacional de Metrologia, 1ª Edição Luso-Brasileira, 2012 (www.ipq.pt).

3 – NATA, Technical Note #17 - Guidelines for the Validation and Verification of Quantitative and Qualitative Test Methods, 2012 (www.nata.asn.au).

rjsilva@fc.ul.pt



3 Controlo interno da qualidade dos ensaios

3.4 Controlo da qualidade dos limites de detecção e/ou quantificação

3.4.1 Validação – Quantificação do LD

ii) Limite de detecção (LD) – Quantificação em precisão intermédia:

Estimado com base em n resultados, obtidos em condições de precisão intermédia, da análise replicada de um padrão com um teor equivalente ao LD (s_p – desvio padrão dos resultados da análise do padrão).

$$LD = 3s_p \quad \text{[relação linear]}$$

Deve-se avaliar-se a veracidade da medição aquela concentração:

$$|\text{Valor médio obtido} - \text{Valor esperado}| \leq (s_p \cdot t[n-1; 99\%] / \sqrt{n})$$

em que: $t[n-1; 99\%]$ – função t -Student para $n-1$ graus de liberdade e um nível de confiança de 99 %.

Vantagem: O LD estimado é aplicável num período de tempo alargado.

rjsilva@fc.ul.pt



3 Controlo interno da qualidade dos ensaios

3.4 Controlo da qualidade dos limites de detecção e/ou quantificação

3.4.2 Validação – Quantificação do LQ

ii) Limite de quant. (LQ) – Quantificação em precisão intermédia:

Estimado com base em n resultados, obtidos em condições de precisão intermédia, da análise replicada de um padrão com um teor equivalente ao LQ (s_p – desvio padrão dos resultados da análise do padrão).

$$LQ = 10s_p \quad \text{[relação linear]}$$

Deve-se avaliar a veracidade da medição aquela concentração:

$$|\text{Valor médio obtido} - \text{Valor esperado}| \leq (s_p \cdot t[n-1; 99\%] / \sqrt{n})$$

Em que: $t[n-1; 99\%]$ – função t -Student para $n-1$ graus de liberdade e um nível de confiança de 99 %.

Vantagem: O LQ estimado é aplicável num período de tempo alargado.

rjsilva@fc.ul.pt

C

3 Controlo interno da qualidade dos ensaios

3.4 Controlo da qualidade dos limites de detecção e/ou quantificação

3.4.3 Controlo da qualidade

ii) LD e LQ estimados em precisão intermédia

- Ferramenta usada no controlo

Análise de padrão de controlo com teor igual ao limiar analítico usado.

- Critério

i) Teor estimado do padrão de controlo dentro do intervalo:

Valor esperado $\pm t \cdot s_p$

- Aceitam-se desvios de 66 % em torno do LD!;
- Aceitam-se desvios de 20 % em torno do LQ (n.c. 95 %).

rjsilva@fc.ul.pt

C

3 Controlo interno da qualidade dos ensaios

3.4 Controlo da qualidade dos limites de detecção e/ou quantificação

3.4.3 Controlo da qualidade

ii) LD e LQ estimados em precisão intermédia

- Critério:

ii) Carta de controlo [equivalente a i); ver alínea 3.6];

~~iii) Limites de aceitação função do objectivo do ensaio.~~

O critério do controlo tem que ter em conta a definição de LD e LQ!

- Frequência do controlo:

i) Um ensaio por série de análises;

ii) Quando o procedimento de ensaio é robusto, esta frequência pode ser alargada (exemplo: de 4 em 4 séries de análises se forem realizadas mais de 4 séries de análises por mês).



rjsilva@fc.ul.pt



3 Controlo interno da qualidade dos ensaios

3.5 Controlo da Linearidade

3.5.1 Validação da linearidade

Pode-se evidenciar a linearidade de um sistema recorrendo a:

- i) Combinação do coeficiente de correlação linear de Pearson com um gráfico de residuais (abordagem pragmática);
- ii) Ferramentas estatísticas – apenas aplicáveis se forem respeitados os pressupostos dos modelos usados (ex.: a ferramenta de avaliação da linearidade proposta na Norma ISO 8466 só é aplicável a dados homoscedásticos).

rjsilva@fc.ul.pt



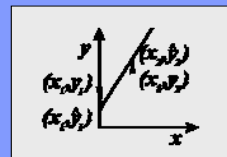
3 Controlo interno da qualidade dos ensaios

3.5 Controlo da Linearidade

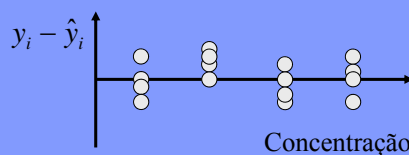
Avaliação da linearidade: Coef. de Correlação Linear + Gráfico de Residuais

Construção de uma curva de calibração em que cada padrão é analisado pelo menos 4 vezes:

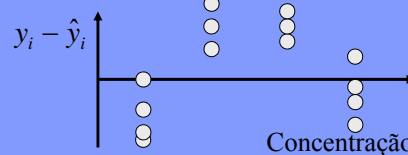
- 1) Cálculo do coeficiente de correlação linear e;
- 2) Construção de gráfico de residuais.



Modelo de regressão ajustado



Modelo de regressão desajustado



rjsilva@fc.ul.pt

C

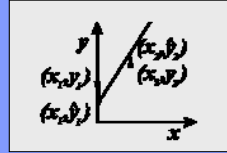
3 Controlo interno da qualidade dos ensaios

3.5 Controlo da Linearidade

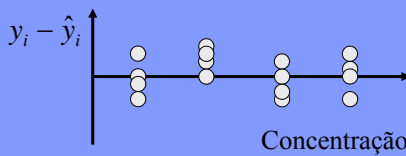
Avaliação da linearidade: Coef. de Correlação Linear + Gráfico de Residuais

Construção de uma curva de calibração em que cada padrão é analisado pelo menos 4 vezes:

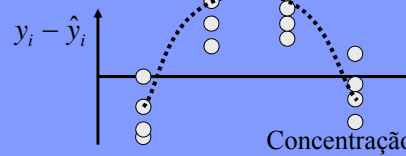
- 1) Cálculo do coeficiente de correlação linear r ;
- 2) Construção de gráfico de residuais.



Modelo de regressão ajustado



Modelo de regressão desajustado



rjsilva@fc.ul.pt

C

3 Controlo interno da qualidade dos ensaios

3.5 Controlo da Linearidade

3.5.2 Controlo da qualidade

- Ferramentas usadas no controlo (calibrações com menos replicados)
 - Cálculo do coeficiente de correlação linear, r , e;
 - Análise de padrões de controlo equivalentes aos padrões de calibração.
- Critérios
 - $r \geq 0,999$ [métodos espectrométricos];
 - $r \geq 0,95$ [alguns métodos cromatográficos].

Calcular r considerando pares ordenados individuais (não usar médias...)

“...quando $r > 0,999$ ou menor que $-0,999$ podemos estar praticamente certos de que a relação é linear.”
Analytical Methods Committee, 1988 (www.rsc.org)

rjsilva@fc.ul.pt



3 Controlo interno da qualidade dos ensaios

3.5 Controlo da Linearidade

3.5.2 Controlo da qualidade

- Critérios

(...)

Análise de padrões de controlo equivalentes aos padrões de calibração:

- Se padrões de controlo ao LD ou LQ seguir – Alínea 3.4.3;

- Se padrões de controlo a outras concentrações:

i) Reunir resultados de n ensaios replicados obtidos em condições de precisão intermédia (média: \bar{X} ; desvio padrão s)

Validação do PC: O intervalo $\bar{x} \pm t \cdot s / \sqrt{n}$ deve incluir o teor do padrão, X

CQ com o PC: O teor estimado em rotina deve estar dentro de: $X \pm t \cdot s$

rjsilva@fc.ul.pt



3 Controlo interno da qualidade dos ensaios

3.5 Controlo da Linearidade

3.5.2 Controlo da qualidade

- Critérios

Análise de padrões de controlo equivalentes aos padrões de calibração:

(...)

- Se padrões de controlo a outras concentrações:

ii) Carta de controlo [equivalente a i); ver alínea 3.6];

iii) Limites de aceitação função do objectivo do ensaio (ver alínea 3.6).

rjsilva@fc.ul.pt