

Abril 2011
Revisão: Maio 2013

**GUIA PARA A VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS
ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE
RESÍDUOS EM MATRIZES BIOLÓGICAS DE
ORIGEM ANIMAL**



Guia nº 2 – G.F.



AUTORES

Participaram na realização deste guia membros das seguintes instituições que fazem parte do grupo ad hoc de Fármacos Veterinários da Fundação PROSAIA:

Relação em ordem alfabética:

Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria

Cámara Argentina de la Industria de Productos Veterinarios (CAPROVE):

Cámara de Laboratorios Argentinos Medicinales Veterinarios (CLAMEVET):

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA)

- Divisão de Produtos Veterinários e Alimentos para Animais. Divisão Nacional de Agroquímicos, Produtos Veterinários e Alimentos – SENASA.
- Coordenação de Resíduos Químicos da Divisão de Laboratório Animal - Divisão Geral de Laboratório e Controle Técnico – SENASA.

Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA):

- Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Nacional del Centro de la Provincia de Bs. As. – Tandil.

Universidad Nacional del Litoral (UNL):

- Cadeira de Farmacologia da Faculdade de Ciências Veterinárias, Universidade Nacional del Litoral.
- Laboratório de Farmacologia e Toxicologia da Faculdade de Ciências Veterinárias, Universidade Nacional del Litoral.

Universidad Nacional de La Plata (UNLP)

- Cadeira de Farmacologia, Faculdade de Ciências Veterinárias e Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nacional de La Plata.

Coordenação do grupo a cargo do Dr. Javier Pardo (Fundação PROSAIA)

Tabela de conteúdos

Prólogo.....	4
1. Introdução.....	6
1.1 Objetivo do guia	6
1.2 Antecedentes.....	6
2. Alcance	6
3. Parâmetros a serem considerados para a validação do método analítico	6
3.1. Linearidade	7
3.2. Exatidão.....	8
3.3. Precisão.....	8
3.4. Limite de detecção	9
3.5. Limite de quantificação	9
3.6. Seletividade	9
3.7. Estabilidade na matriz	9
3.8. Estabilidade na amostra processada	10
3.9. Robustez	10
4. Glossário	11
Anexo 1	13
Anexo 2	14
Anexo 3	15
Anexo 4	23

Prólogo

PROSAIA: La Seguridad Alimentaria y la producción de productos farmacéuticos veterinarios.

“Animales sanos, alimentos sanos, gente sana”.

La Argentina como productora de alimentos de calidad afronta entre otros desafíos el acecho de enfermedades infecciosas emergentes y re-emergentes que, debido a los cambios culturales ocurridos en el mundo en los últimos años, se hallan en continua expansión (BSE, Influenza Aviar, Nipah, West Nile Fever, Rift Valley Fever entre otras). Muchas de estas son zoonosis, lo que ha ocasionado cambios muy profundos en los sistemas de garantías exigidos por las autoridades sanitarias, entre las cuales la seguridad sanitaria de los alimentos es un requisito indispensable. Para alcanzar la seguridad alimentaria de los alimentos es necesario, entre otras condiciones, disponer de productos farmacéuticos veterinarios y biológicos de seguridad y pureza probadas que garanticen, junto con su correcta aplicación, que los productos y subproductos obtenidos de los animales se conviertan en alimentos que no sean causantes de enfermedades por la presencia de contaminantes o agentes patógenos, en forma involuntaria -inocuidad- o deliberada -bioterrorismo- y contribuir así a preservar la salud y protección de los consumidores.

Para eso existen principios fundamentales que se deben tener en cuenta en la formulación de los insumos para los animales de abasto incluidos los alimentos y los productos farmacológicos. Estos principios incluyen el control de la fuente, la manipulación de los materiales utilizados y el diseño de un sistema de elaboración adecuado que contemple:

La normativa, recomendaciones y estándares nacionales e internacionales.

Este es un aspecto primordial que deben cumplir todos los productos farmacéuticos veterinarios ya que, de no ser así, se corre el riesgo de que los productos y subproductos obtenidos de los animales tratados queden fuera de los mercados.

Las Buenas Prácticas de Manufactura.

“Buenas Prácticas de Manufactura es aquella parte del aseguramiento de la calidad que garantiza que los productos sean consistentemente producidos y controlados de acuerdo a los estándares de calidad apropiados al uso al que están destinados y según lo requiera su autorización de comercialización.” WHO Good Manufacturing Practices for Pharmaceutical Products.

Por lo tanto, mantenerse y desarrollar un negocio competitivo como proveedores de alimentos dentro de este contexto presupone además cumplir con los requisitos implícitos y explícitos que los consumidores demandan. Entre esos requisitos los atributos de inocuidad involucran la aplicación de sistemas de aseguramiento de la calidad tales como Buenas Prácticas Agrícolas, Buenas Prácticas de Manufactura, HACCP, determinación de niveles o ausencia de residuos, de pesticidas, de antibióticos y garantía de que los productos farmacológicos utilizados en el control de las enfermedades de los animales cumplen con las normas internacionales.

Dentro de este marco de referencia y en cumplimiento de los objetivos de su creación, PROSAIA convocó a los principales referentes en la materia del organismo regulador SENASA, la Academia y las cámaras representativas a conformar un Grupo Ad-Hoc para la Redacción y Actualización de Guías, Protocolos y Normativas para el Correcto Desarrollo de Productos Veterinarios, como un aporte para la adecuación a los tiempos que vivimos.

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, overlapping loops and curves, set against a light pink rectangular background.

Dr. Carlos Van Gelderen

A handwritten signature in black ink, featuring a cursive style with a prominent initial 'A' and a horizontal line at the end, set against a light pink rectangular background.

Dr. Alejandro Schudel

1. Introdução

1.1. Objetivo do guia

Este documento tem como finalidade proporcionar uma descrição geral dos critérios considerados aceitáveis para a validação dos métodos analíticos utilizados em estudos de resíduos de medicamentos veterinários em tecidos animais ou em outras matrizes biológicas.

Durante o processo de desenvolvimento ou adequação de medicamentos veterinários podem ser realizados estudos farmacocinéticos, de eliminação de resíduos, ou de bioequivalência a fim de determinar e analisar concentrações do analito em diferentes matrizes biológicas (tecidos, plasma, leite, ovos ou mel) de animais tratados. Essa informação é utilizada para ser apresentada perante a autoridade reguladora nos diferentes países do mundo.

A validação da metodologia utilizada durante os estudos em matrizes biológicas respalda a confiabilidade dos dados experimentais obtidos. A apresentação de métodos validados e seus requisitos são claramente definidos por diversos órgãos internacionais reconhecidos e inclusive podem ser definidos por lei.

Este guia tem como fim a abordagem da validação dos métodos analíticos para a determinação dos princípios ativos administrados ou de seus metabolitos nas diferentes matrizes biológicas, considerando as recomendações das associações de química analítica e autoridades sanitárias.

1.2. Antecedentes

Como fundamento para este documento, utilizou-se o guia do VICH nº 49 “*Guidelines for the Validation of Analytical Methods used in Residue Depletion Studies*” – Novembro 2009”.

O presente trabalho, baseado nos antecedentes mencionados, tem o intuito de propor protocolos adaptados aos requerimentos e necessidades na Argentina, que podem ser úteis para outros países da região.

2. Alcance

Procedimentos analíticos desenvolvidos para avaliar:

- estudos de resíduos com o fim de estabelecer os períodos de carência.
- estudos farmacocinéticos e de distribuição tecidual.
- estudos de bioequivalência.

Não é objetivo deste guia definir os critérios para a validação dos procedimentos no monitoramento dos resíduos pelos órgãos de controle oficial.

O objetivo é que os métodos validados de conformidade com este guia proporcionem dados sobre resíduos que sejam aceitáveis para os órgãos reguladores na hora de determinar os períodos adequados de espera.

3. Parâmetros a serem considerados para a validação do método analítico

A validação de um método de ensaio de parâmetros específicos a serem considerados deve ser realizada nas matrizes selecionadas e deverá incluir, dentro da faixa analítica, o Limite

Máximo de Resíduos (LMR) para a substância em estudo. Os parâmetros a serem considerados em um processo de validação são os seguintes:

Linearidade

Exatidão

Precisão

Limite de detecção

Limite de quantificação

Seletividade

Estabilidade na matriz

Estabilidade na amostra processada

Robustez

A seguir, será descrito cada um dos parâmetros de validação.

3.1. Linearidade

Deve-se gerar uma curva de calibração que demonstre a relação linear dentro da faixa das concentrações esperadas nas matrizes sobre as quais será realizado o ensaio (por exemplo: plasma, tecidos, leite, ovos mel). As curvas de calibração padrão podem ser construídas de três maneiras diferentes segundo a metodologia:

- a) Padrões em solvente/buffer,
- b) Matriz submetida ao processo de extração e posteriormente fortificada com o padrão.
- c) Matriz fortificada com o padrão e posteriormente processada mediante o procedimento de extração.

A linearidade deve ser descrita mediante um gráfico de regressão linear de concentração conhecida frente à resposta utilizando, no mínimo, 5 concentrações diferentes. A relação linear, geralmente, se descreve melhor mediante regressão linear sem ponderar, mas pode se estabelecer mediante regressão ponderada com fatores de ponderação adequados, caso haja variância não homogênea dos dados experimentais (heterocedasticidade).

O critério de aceitação recomendado para uma curva padrão depende do formato da mesma. As curvas padrão de calibração geradas de acordo com o descrito no item c) estão sujeitas aos mesmos critérios de aceitação que as amostras (consultar a seção 3.3 Precisão). As curvas padrão geradas conforme os itens a) ou b) requerem critérios de aceitação mais rigorosos (repetitividade $\leq 15\%$ em todas as concentrações, exceto no ou abaixo do LOQ, que pode ser $\leq 20\%$).

É possível que em alguns ensaios sejam necessárias transformações logarítmicas (p. ex., os ensaios microbiológicos) para conseguir a linearidade, enquanto que em outros ensaios (p. ex., ELISA, RIA) é possível que requeiram uma função matemática mais complexa para estabelecer a relação entre a concentração e a resposta. Mais uma vez, a aceitabilidade da função selecionada deve ser verificada mediante uma avaliação da variância residual gerada quando se utiliza essa função.

3.2. Exatidão

Geralmente, expressa-se como % de recuperação ou % de erro. A exatidão está estreitamente relacionada com o erro sistemático (viés do método analítico) e a recuperação do analito (medida como a porcentagem de recuperação). A exatidão recomendada para os métodos de resíduos variará segundo a concentração do analito. As médias de exatidão recomendadas em função da concentração do analito fornecidas pelas recomendações do CODEX¹ se enumeram a seguir:

Concentração de analito*	Faixa aceitável
< 1 µg/kg	-50 % a +20 %
≥ 1 µg/kg < 10 µg/kg	-40 % a +20 %
≥ 10 µg/kg < 100 µg/kg	-30 % a +10 %
≥ 100 µg/kg	-20 % a +10 %

* µg/kg = ng/g = ppb

3.3. Precisão

Considera-se adequado determinar a repetitividade e a reprodutibilidade interna do método analítico como parte do procedimento de validação. Em geral, não é necessário determinar a reprodutibilidade interlaboratorial para poder realizar um estudo de eliminação de resíduos, porque o laboratório que costuma desenvolver o método é o mesmo laboratório que realiza o ensaio com as amostras do estudo de resíduos. A repetitividade e a reprodutibilidade interna devem ser determinadas mediante a avaliação de um mínimo de três reproduções em três concentrações diferentes que representem a faixa de validação alvo (que deve incluir o LOQ) em três dias de análises.

Para fins da validação do método de ensaio, a variabilidade aceitável depende da concentração do analito. A precisão aceitável recomendada fornecida pelo guia CODEX² se enumera na seguinte tabela:

Concentração de analito	Reprodutibilidade Interna (precisão intralaboratorial), CV%
< 1 µg/kg	35%
≥ 1 µg/kg < 10 µg/kg	30%
≥ 10 µg/kg < 100 µg/kg	20%
≥ 100 µg/kg	15%

O Coeficiente de Variação (CV) da repetitividade determinada para cada ponto de concentração não deve ultrapassar 20%, o mesmo que para o LOQ³. O CV se calcula mediante a seguinte equação:

$$CV = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Média}} * 100$$

3.4. Limite de detecção

Há várias maneiras cientificamente válidas de determinar o LOD e qualquer uma delas pode ser utilizada, desde que seja apresentada uma justificativa científica para seu uso. No Anexo 1 e no Anexo 2 há exemplos de métodos aceitos para determinar o LOD, e no Anexo 3 pode ser consultado o protocolo sugerido para determinar a exatidão, a precisão, o LOD, o LOQ e a seletividade em um único estudo.

3.5. Limite de quantificação

Como no LOD, há várias maneiras cientificamente válidas de determinar o LOQ e qualquer uma delas pode ser utilizada, desde que seja apresentada uma justificativa científica para seu uso. No Anexo 1 e no Anexo 2 há exemplos de métodos aceitos para determinar o LOD, e no Anexo 3 pode ser consultado o protocolo sugerido para determinar a exatidão, a precisão, o LOD, o LOQ e a seletividade em um único estudo.

3.6. Seletividade

No caso dos métodos utilizados em estudos de resíduos, a seletividade é definida, principalmente, com relação às substâncias endógenas presentes na matriz. Devido a que os estudos de resíduos estão bem controlados, os componentes administrados em forma exógena (ou seja, outros medicamentos ou vacinas veterinárias) são conhecidos ou não são permitidos durante o estudo.

Uma boa medição da seletividade de um ensaio consiste na determinação da resposta das amostras de controle. Essa resposta não deve ultrapassar 20% da resposta no LOQ. Consultar o Anexo 3 que apresenta o protocolo sugerido para determinar a exatidão, a precisão, o LOD, o LOQ e a seletividade em um único estudo.

3.7. Estabilidade na matriz

Em geral, as amostras recompiladas de estudos de resíduos são congeladas e armazenadas ao realizar o ensaio. É necessário determinar durante quanto tempo essas amostras podem ser armazenadas sob as condições de armazenamento propostas sem que sofram uma degradação excessiva antes da análise. Como parte do procedimento de validação ou como um estudo diferente, deve ser realizado um estudo de estabilidade para estabelecer as condições de armazenamento apropriadas (p. ex., 4° C, -20° C ou -70° C) e o período de tempo durante o qual podem ser armazenadas as amostras antes da análise.

Para realizar o ensaio, devem ser fortificadas amostras controle (livres de analito) com quantidades conhecidas de analito e armazenadas nas condições adequadas. As amostras serão analisadas periodicamente em intervalos específicos (p. ex., no início, 1 semana, 1 mês e 3 meses). Se as amostras forem congeladas, é preciso realizar estudos de congelamento/descongelamento (3 ciclos de congelamento/descongelamento, um ciclo por dia, no mínimo). Em forma alternativa, podem ser utilizadas amostras reais com ensaios realizados

para estabelecer as concentrações iniciais. O protocolo recomendado para avaliar a estabilidade na matriz é a análise de duas concentrações diferentes em triplicata, próximo dos extremos superior e inferior da faixa de validação. A estabilidade na matriz se considera aceitável se a concentração média obtida no ponto do tempo de estabilidade especificado coincide com os resultados do ensaio de amostras de controle fortificadas recentemente (resultados do ensaio inicial caso sejam utilizadas amostras reais) dentro da faixa de 15%.

3.8. Estabilidade na amostra processada

Frequentemente, as amostras são processadas um dia e analisadas no segundo dia ou, devido a uma falha de instrumentos, armazenadas durante dias adicionais, por exemplo, durante o fim de semana. A estabilidade do analito no extrato da amostra processada pode ser examinada, caso seja necessário, para determinar a estabilidade em condições de armazenamento de amostras processadas. Alguns exemplos de condições de armazenamento seriam entre 4 e 24 horas a temperatura ambiente e 48 horas a 4° C. Podem ser testadas outras condições de armazenamento conforme os requisitos do método.

O protocolo recomendado para avaliar a estabilidade na matriz é a análise de duas concentrações diferentes em triplicata, próximo dos extremos superior e inferior da faixa de validação. A estabilidade na matriz se considera aceitável se a concentração média obtida no ponto de tempo de estabilidade especificado coincide com os resultados do ensaio de amostras de controle fortificadas recentemente (resultados do ensaio inicial, caso sejam utilizadas amostras reais) dentro da faixa de 15%.

3.9. Robustez

A avaliação da robustez dos métodos analíticos é de grande importância. É preciso avaliar especialmente as áreas do método que poderiam sofrer mudanças ou modificações com o passar do tempo. Essas áreas poderiam incluir lotes ou prazo dos reagentes, temperaturas de incubação, composição e volume do solvente de extração, momento de extração e quantidade de extrações, extração em fase sólida, a marca e os lotes dos cartuchos, a marca e os lotes da coluna analítica e a composição do solvente eluente para HPLC, o pH. Durante o desenvolvimento, a validação ou uso do ensaio, a sensibilidade do método frente a alguma dessas condições, ou a todas, pode tornar-se evidente e é preciso avaliar as variações que têm mais probabilidades de afetar o rendimento do método.

O critério de aceitação do ensaio de robustez deverá cumprir os mesmos requisitos que o ensaio de exatidão. O Anexo 4 apresenta um exemplo sugerido para realizar este ensaio.

4. Glossário

Analito: Espécie ou entidade química em questão. Elemento que se deseja identificar ou determinar em uma amostra.

Bioequivalência: Duas especialidades medicinais são bioequivalentes quando, sendo equivalentes farmacêuticos ou alternativas farmacêuticas, suas biodisponibilidades depois da administração na mesma dose molar são semelhantes a tal ponto que pode se esperar que seus efeitos sejam essencialmente os mesmos (OMS 1996).

Exatidão: Grau de concordância entre o resultado ou resultados de medição e o valor verdadeiro.

Farmacocinética: É o ramo da Farmacologia que estuda a passagem das drogas através do organismo em função do tempo e da dose. Compreende os processos de absorção, distribuição, metabolismo ou biotransformação e excreção das drogas.

Limite de quantificação (LOQ): É a menor concentração de analito que pode ser quantificada com um aceitável nível de exatidão e precisão.

Limite de detecção (LOD): É a menor concentração de analito a partir da qual é possível demonstrar a presença do mesmo na amostra experimental com um grau aceitável de certeza.

Linearidade: Capacidade de um método analítico de produzir resultados que sejam diretamente, ou por meio de uma transformação matemática definida, proporcionais à concentração de analito na amostra.

Matriz: Material predominante, componente ou substrato que contém o analito de interesse.

Amostra controle: Refere-se a tecido, plasma, leite, ovos, mel ou outro material biológico proveniente de um animal que não foi tratado com o fármaco veterinário em estudo.

Amostra processada: É uma amostra que foi processada utilizando um procedimento analítico determinado de modo de extrair o analito de interesse.

Amostra real: tecido, plasma, leite, ovos, mel ou outro material biológico proveniente de um animal tratado com o medicamento veterinário em estudo.

Precisão: Proximidade entre os resultados de medições independentes obtidos sob condições estipuladas.

Repetitividade: Precisão obtida em condições de repetitividade. Inclui o mesmo procedimento de medida, os mesmos operadores, o mesmo sistema de medida, as mesmas condições de operação e o mesmo lugar, bem como medições repetidas do mesmo objeto ou de um objeto similar em um período curto de tempo.

Reprodutibilidade: Precisão obtida em condições de reprodutibilidade. Pode incluir diferentes lugares, operadores, sistemas de medida e medições repetidas dos mesmos objetos ou de objetos similares.

Reprodutibilidade interna ou intralaboratorial: Precisão obtida em condições de reprodutibilidade interna. Inclui o mesmo procedimento de medição, a mesma localização, e medições repetidas sobre os mesmos objetos ou similares durante um período prolongado de

tempo; pode incluir outras condições que envolvem mudanças. As mudanças podem incluir novas calibrações, calibradores, operadores e sistemas de medição.

Resíduos de medicamentos veterinários: Todas as substâncias farmacologicamente ativas, sejam ingredientes, excipientes ou produtos de degradação, e seus metabolitos, que permanecem nos produtos alimentícios obtidos de animais aos que se administrou o medicamento veterinário em questão.

Robustez: É uma medida do funcionamento adequado do método.

Seletividade: A seletividade é a capacidade de um método para diferenciar entre o analito que se mede e outras substâncias que podem estar presentes na amostra analisada. Também chamada “especificidade”.

Anexo 1

Exemplos de métodos para determinar o LOD e o LOQ

Um enfoque utilizado habitualmente se conhece como a definição da IUPAC⁴. Nesse procedimento, o LOD é calculado como a média dos resultados de um ensaio com 20 amostras de controle (de pelo menos 6 fontes diferentes) mais 3 vezes o desvio padrão da média. O LOQ, depois, se converte na média dos mesmos resultados mais 6 ou 10 vezes o desvio padrão da média. A avaliação da exatidão e da precisão no LOQ calculado proporcionará a evidência final para determinar o LOQ. Se a % CV para a medição de repetitividade nessa concentração for inferior ou igual aos critérios de aceitação da exatidão e da precisão (Seção 3.2 e 3.3), o LOQ calculado é aceitável.

Em estudos farmacocinéticos, de bioequivalência ou estudos de resíduos, os valores que estão abaixo do LOQ e acima do LOD não deveriam ser considerados para sua análise, a não ser que o seu uso esteja corretamente justificado.

Anexo 2

Métodos alternativos do Codex para determinar o LOD e o LOQ

O Codex Alimentarius⁵ recomendou um método alternativo para determinar o LOD e o LOQ. Acredita-se que o método resolve os problemas associados com o método definido pela IUPAC (ou seja, a alta variabilidade no limite de medição nunca pode ser superado) no Anexo 1. Nessa abordagem, o LOD se determina mediante um valor arredondado do desvio padrão relativo (RSD) de reprodutibilidade quando se está fora de faixa (isto é, quando $3 \times \text{RSD} = 100\%$; $\text{RSD} = 33\%$, arredondada a 50% devido à alta variabilidade). Esse método se relaciona diretamente com o analito na matriz e não só com o analito.

Portanto, o limite de quantificação (LOQ) corresponde ao LOD e se define como o ponto em que a $\text{RSD} = 25\%$. Isto é congruente com o ponto em que o limite superior de detecção conflui com o limite inferior de quantificação. Como o método da IUPAC, definido no Anexo 1, a avaliação da exatidão e a precisão no LOQ calculado proporcionarão a evidência final para determinar o LOQ. Se a % CV da medição de repetitividade nessa concentração é inferior ou igual aos critérios de aceitação da exatidão e da precisão (Seção 3.2 y 3.3), o LOQ calculado é aceitável.

Anexo 3

Protocolo para a validação

A seletividade, o LOD e o LOQ se inter-relacionam e são afetados por interferências endógenas que podem estar presentes na matriz analisada. O LOD costuma ser difícil de determinar especialmente nos ensaios de cromatografia com detecção espectrométrica de massa, em que as amostras de controle realmente proporcionam uma resposta no tempo de retenção do analito. Sem resposta, é impossível calcular o desvio padrão e, portanto, é impossível determinar o LOD em função da média mais 3 vezes o desvio padrão (SD). Embora seja possível determinar a média mais 3 vezes o SD, com frequência se relaciona com o limite de detecção do instrumento e não com o limite de detecção do método. O seguinte protocolo está desenhado para determinar a especificidade, o LOD, o LOQ, a precisão e a exatidão em um estudo.

1. Recompilar 6 amostras controle de diferentes animais e realizar um estudo de detecção de possível contaminação do analito.
2. a) Fortificar com o analito cada uma das 3 amostras, no mínimo, dentre as 6 amostras controle ao tempo 0. Cada amostra deve ser selecionada aleatoriamente de modo que cada uma delas esteja representada pelo menos uma vez em cada concentração.
b) As concentrações para fortificar as amostras serão as seguintes:
 - b1) O LOD calculado (determinado durante o desenvolvimento do ensaio)
 - b2) 3 vezes o LOD calculado (equivalente ao LOQ calculado)
 - b3) Outras 3 concentrações que formarão a faixa de concentração esperada e que deverá incluir o LMR, por exemplo: 0,5 LMR; LMR e 2 LMR (Tabela 1).c) Repetir o processo de fortificação no dia 2 e no dia 3, utilizando um segundo e um terceiro grupo de 3 amostras cada um (aleatoriamente), para que cada amostra selecionada fique representada pelo menos uma vez em cada concentração das 6 amostras controle.

Tabela 1. Exemplo de desenho de um estudo mínimo para permitir a determinação do LOD, o LOQ, a exatidão e a precisão (seis fontes/animais: A, B, C, D, E e F) em um estudo

Concentração de fortificação	Animal/Fonte ID†		
	Dia/Medição 1	Dia/Medição 2	Dia/Medição 3
0 (Controle)	B, F, D	A, C, C	B, E, F
eLOD*	B, C, E	D, F, F	A, B, E
eLOQ (3 X eLOD)*	C, C, E	A, B, E	D, F, D

Parte inferior da faixa de validação	A, B, E	A, C, D	B, E, F
Metade da faixa de validação	B, C, E	C, E, F	A, D, F
Parte superior da faixa de validação	A, B, B	D, F, F	A, C, E
<p>* eLOD = o LOD calculado geralmente se determina a partir de estudos preliminares realizados durante o desenvolvimento do método. O eLOQ = LOQ calculado se determina como 3 vezes o eLOD.</p> <p>† cada fonte é selecionada aleatoriamente de modo que fique representada pelo menos uma vez em cada concentração nas 3 medições de validação.</p>			

3. Analisar as 18 amostras cada dia e avaliar os resultados conforme a curva padrão de calibração.
4. Indicar os resultados de concentração encontrada conforme a concentração incorporada os três dias do ensaio (análise). Isso normalizará os resultados dos dados dos diferentes dias e permitirá que todos os dados das 3 medições se utilizem para determinar o LOD e o LOQ.
5. Estabelecer um limite de decisão, calculando os intervalos de predição a ambos os lados dos valores da reta estimada por regressão linear ponderada. (Ver gráfico seguinte)

O limite superior do intervalo de predição estará fixado em função da probabilidade de um erro α (falso positivo).

O limite inferior do intervalo de predição estará fixado em função da probabilidade de um erro β (falso negativo)⁶.

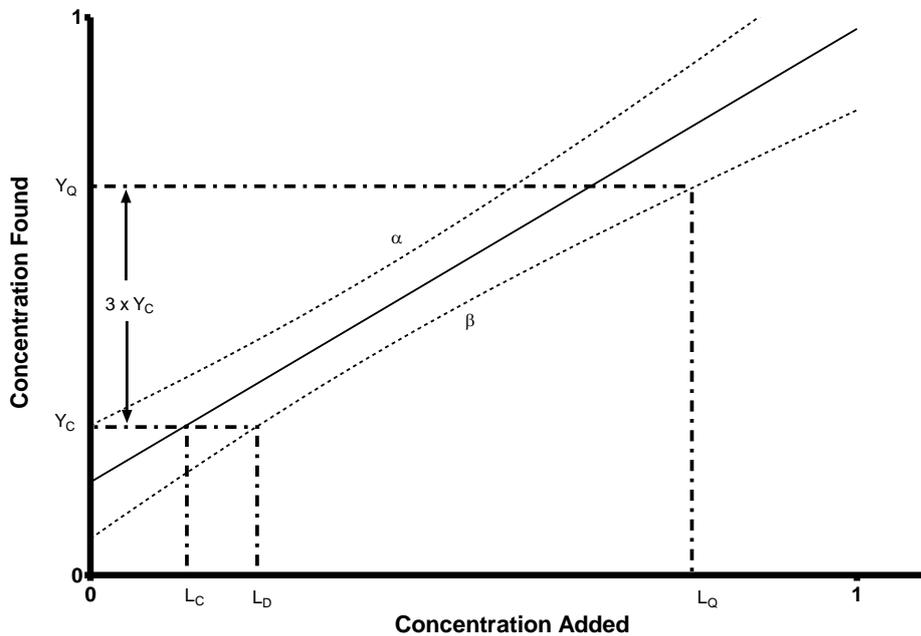
Normalmente, o intervalo de predição da regressão linear se corresponde com um intervalo de confiança a 90%, isto é, com um erro α de 5% e um erro β de 5%.

O ponto no eixo dos Y interceptado pelo limite superior do intervalo de confiança se denomina limite de detecção (Y_C), pode se transformar em concentração extrapolando este valor ao ponto correspondente da reta de regressão e daí até o eixo dos X (L_C). Esse é o ponto crítico em que 50% das respostas são reais.

O limite de detecção (LOD) pode ser determinado estimando a concentração correspondente que deriva de extrapolar o valor de Y_C até o limite inferior do intervalo de confiança (β) e daí até o eixo dos X, ponto que se denomina L_D .

6. Estabelecer um limite de determinação (Y_Q) multiplicando o limite de detecção (Y_C) por 3 (a relação aceita geralmente entre o LOD e o LOQ é 3). O LOQ (L_Q) pode ser determinado calculando o ponto em que a linha Y_Q cruza o limite inferior de confiança β que reduz a taxa de falso negativo para determinar o LOQ no nível que é designado a β (normalmente 5%).
7. A reprodutibilidade interna pode ser determinada calculando o CV% em cada concentração avaliada. A exatidão pode ser determinada comparando os resultados

obtidos com os níveis de fortificação. Os critérios de aceitação da exatidão e da precisão aparecem nas Seções 2.2 e 2.3, respectivamente.



Concentration found	Concentração achada
Concentration added	Concentração de fortificação

Esta abordagem considera a inter-relação entre a especificidade, o LOD e o LOQ. Ao determinar o LOD e o LOQ utilizando 6 fontes de matriz diferentes, a variabilidade ocasionada pela matriz, bem como a variabilidade do ensaio, são consideradas. Dado que a especificidade dos métodos de resíduos depende da possível interferência dos componentes da matriz, esta abordagem também trata a especificidade e garante que a mesma seja aceitável no LOD e no LOQ determinados. Essa abordagem é congruente com a determinação do LOD e do LOQ especificada nas diretrizes VICH GL2 (Metodologia de validação).

Exemplo de conjunto de dados:

Realizou-se um procedimento de validação baseado na metodologia mencionada anteriormente em um ensaio ELISA.

O soro suíno de controle obtido de seis animais diferentes foi fortificado com o analito a 0, 50, 150, 300, 600 e 1200 ng/ml, o que gerou um total de 36 amostras. Dado que se tratou de um ensaio de soro e que foi relativamente fácil de analisar, os seis níveis de fortificação foram analisados em três dias. Se fosse um caso de amostras de tecido, selecionaríamos aleatoriamente 3 dos 6 animais (assegurando que cada um dos 6 animais fossem analisados pelo menos uma vez) em cada um dos níveis de fortificação para analisar durante os 3 dias do ensaio um total de 18 amostras por dia.

Em função desses três dias de análise que incluíram 108 ensaios no total (no caso de ensaios de tecido teriam sido 54 ensaios no total) se realizaram as seguintes determinações: repetitividade intradia e interdia, LOD e LOQ. Os dados sem processar e os resultados das análises estatísticas são enumerados a seguir:

Análise	Nível de fortificação, ng/ml	Resultados, ng/ml					
		Animal A	Animal B	Animal C	Animal D	Animal E	Animal F
1	0	nr	nr	nr	nr	nr	nr
	50	9	32	59	18	18	25
	150	162	160	148	145	133	128
	300	251	303	331	295	270	260
	600	508	514	592	513	568	609
	1200	907	1186	1162	1037	1050	1097
2	0	nr	nr	nr	nr	nr	nr
	50	26	41	40	36	37	27
	150	155	168	130	144	143	177
	300	234	251	335	307	251	247
	600	504	522	553	516	650	580
	1200	999	1030	1037	1020	985	996
3	0	1	nr	8	nr	nr	1
	50	39	60	71	50	68	48
	150	157	179	159	167	172	148
	300	290	277	336	319	299	278
	600	565	572	611	586	648	579
	1200	1071	1190	1218	1262	1246	1160

nr = não resposta

Para a avaliação estatística dos dados prévios foi utilizado um modelo simples que incluiu o efeito fixo do tratamento, os efeitos aleatórios da análise, a preparação da amostra, etc. Esta análise se realizou da seguinte maneira:

- Para avaliar a exatidão do método, foi calculada a Recuperação Percentual (R%) de cada amostra dividindo a concentração achada pela concentração de fortificação antes da análise (nível de fortificação ou concentração nominal) e multiplicando depois por 100.
- Para avaliar a variabilidade no dia (Repetitividade) se calculou o Coeficiente de Variação Percentual (CV%) dividindo o desvio padrão pela média considerando os dados para todos os animais para cada nível de fortificação e multiplicando depois por 100. Calculou-se também a repetitividade global como o CV% considerando os valores para todos os níveis e todos os animais, sempre para um mesmo dia (tratamento).

- A fim de avaliar a variabilidade entre dias (Reprodutibilidade Interna), se calculou o CV% para um mesmo nível de fortificação, mas utilizando os valores de R% obtidos para todos os animais e todos os dias (utilizando um total de 18 dados). Calculou-se também a repetitividade interna global como o CV% considerando todos os níveis de todos os dias para todos os animais (utilizando, neste caso, um total de 72 dados). Este último resultado (CV% para todos os níveis e todos os dias) é uma boa medida da variação que terá o método na rotina, independentemente do nível de fortificação, dado que são considerados todos os fatores que podem afetar a precisão do método.

Os valores de Recuperação Percentual obtidos são os seguintes:

Análise	Nível de fortificação, ng/ml	Resultados, Recuperação %					
		Animal A	Animal B	Animal C	Animal D	Animal E	Animal F
1	0	nr	nr	nr	nr	nr	nr
	50	18,0	64,0	118,0	36,0	36,0	50,0
	150	108,0	106,7	98,7	96,7	88,7	85,3
	300	83,7	101,0	110,3	98,3	90,0	86,7
	600	84,7	85,7	98,7	85,5	94,7	101,5
	1200	75,6	98,8	96,8	86,4	87,5	91,4
2	0	Nr	nr	nr	Nr	Nr	Nr
	50	52,0	82,0	80,0	72,0	74,0	54,0
	150	103,3	112,0	86,7	96,0	95,3	118,0
	300	78,0	83,7	111,7	102,3	83,7	82,3
	600	84,0	87,0	92,2	86,0	108,3	96,7
	1200	83,3	85,8	86,4	85,0	82,1	83,0
3	0	1,0	nr	8,0	Nr	Nr	1,0
	50	78,0	120,0	142,0	100,0	136,0	96,0
	150	104,7	119,3	106,0	111,3	114,7	98,7
	300	96,7	92,3	112,0	106,3	99,7	92,7
	600	94,2	95,3	101,8	97,7	108,0	96,5
	1200	89,3	99,2	101,5	105,2	103,8	96,7

Nota: o nível de fortificação de 50 ng/ml foi inferior ao LOD e tanto os valores de R% quanto o CV% não cumprem com os critérios de aceitação, portanto, não foram utilizados para determinar a precisão do método.

Os resultados da Repetitividade para os valores de R% são os seguintes:

Análise	Nível de fortificação, ng/ml	Repetitividade por Nível			Repetitividade Global		
		DS	Média	CV%	DS	Média	CV%
1	0						
	50						
	150	9,2	97,3	9,4	8,8	93,4	9,4
	300	10,1	95,0	10,6			
	600	7,5	91,8	8,1			
	1200	8,4	89,4	9,4			
2	0						
	50						
	150	11,6	101,9	11,4	11,4	92,2	12,3
	300	13,4	90,3	14,9			
	600	9,1	92,4	9,8			
	1200	1,7	84,3	2,1			
3	0						
	50						
	150	7,5	109,1	6,8	7,6	101,8	7,4
	300	7,8	99,9	7,9			
	600	5,2	98,9	5,2			
	1200	5,8	99,3	5,8			

Os resultados da Reprodutibilidade Interna para os valores de R% são os seguintes:

Nível de fortificação, ng/ml	Reprodutibilidade Interna por Nível			Reprodutibilidade Interna Global		
	DS	Média	CV%	DS	Média	CV%
0						
50						
150	10,3	102,8	10,0	10,2	95,8	10,6
300	10,8	95,1	11,4			
600	7,7	94,4	8,2			
1200	8,5	91,0	9,4			

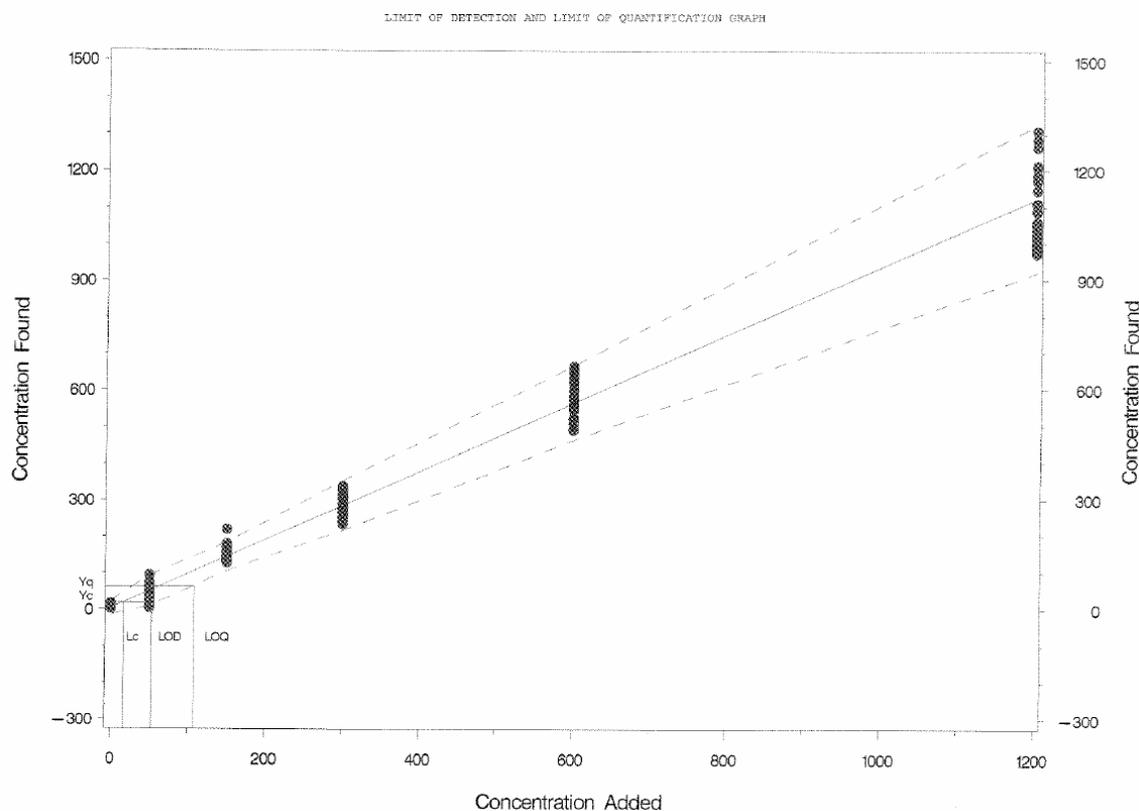
Nota: Devido a que não há nenhum guia que determine uma % mínima de recuperação, a mesma pode ser baixa (por ex: 40%), mas se o CV% em todas as concentrações for menor que 20%, é aceitável. O exemplo contrário seria uma molécula com uma recuperação de 95%, mas uma % de CV maior que 20% significa que há um problema metodológico.

Os resultados obtidos para o LOD e LOQ são os seguintes:

LOD = 62 ng/ml

LOQ = 112 ng/ml

A representação gráfica da determinação do LOD e o LOQ é a seguinte:



Limit of detection and limit of quantification graph	Gráfico do limite de detecção e limite de quantificação
Concentration found	Concentração achada
Concentration added	Concentração de fortificação

Esta é uma maneira direta de determinar de forma pontual a precisão, a exatidão, o LOD e o LOQ em um estudo durante três dias de validação.

A exatidão também pode ser determinada como a pendente do gráfico de Concentração Achada vs Concentração de Fortificação.

O LOD e o LOQ coincidem com o que se esperaria de uma avaliação subjetiva dos dados e, baseado nestes resultados, é lógico não ter considerado o nível de fortificação de 50 ng/ml no cálculo da precisão do método, já que abaixo de 112 ng/ml (LOQ) não é possível efetuar uma quantificação com um nível de confiança estatisticamente aceitável, isto se verifica experimentalmente ao observar os valores de concentração achada (ou de R%) e a precisão obtida para este nível, os quais não cumprem com os critérios de aceitação estabelecidos.

A precisão obtida é mais que aceitável considerando que se trata de um procedimento ELISA e que a mesma cumpre com os critérios de aceitação descritos neste documento. Durante a rotina

do método, depois de obtidos entre 50 e 100 novos dados de R% (para diferentes níveis de fortificação), os valores de precisão, exatidão, LOD e LOQ podem ser atualizados.

Anexo 4

Robustez

Pode ser utilizado o procedimento de Youden e Steiner, que permite avaliar até sete variáveis com a análise de apenas oito amostras. O método é um desenho fatorial fracionário e não permite detectar interações entre os diversos fatores.

Cada variável é estudada mediante um valor alto (A, B, ...G) (ou qualidade, quando isso não é possível) e outro baixo (a, b,...g) e se desenham oito testes conforme o exemplo da Tabela 1. Os resultados são representados com letras de “s” até “z”.

Tabela 1: Teste de Robustez de Youden para um método analítico

VALOR DE LAS VARIABLES	ANALISIS							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A, a	A	A	A	A	a	a	a	a
B, b	B	B	b	b	B	B	b	b
C, c	C	c	C	c	C	c	C	c
D, d	D	D	d	d	d	d	D	D
E, e	E	e	E	e	e	E	e	E
F, f	F	f	f	F	F	f	f	F
G, g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultados	s	t	u	v	w	x	y	z

A partir dos resultados das análises das amostras, é possível calcular o efeito de cada uma das variáveis fazendo a média das quatro análises que contêm a variável no seu valor mais alto (maiúsculas) e aqueles que correspondem ao valor mais baixo (minúsculas). Assim, o efeito de mudança do Fator “A” para “a” se mede pela diferença:

$$Dif = \frac{s + t + u + v}{4} - \frac{w + x + y + z}{4}$$

Isto é, a média dos resultados (s+t+u+v) equivale a “A” porque as demais variáveis presentes nestes quatro resultados se anulam entre si como consequência de que existem sempre duas maiúsculas e duas minúsculas de cada variável. Analogamente, a média dos resultados (w+x+y+z) equivale a “a”.

Calcula-se o efeito de cada um dos fatores. Finalmente, o efeito de mudança de "G" para "g" se mede pela diferença (s+v+x+y)/4 - (t+u+w+z)/4.

Ao comparar os dois valores médios se conhece a influência da variável no estudo.

Para qualquer outra variável se pode proceder de maneira semelhante, como mostra a Tabela 1.

Estabelecendo as sete comparações possíveis (A-a,...G-g) pode-se conhecer o efeito de cada variável; quanto maior for a diferença, maior influência terá esta variável no método analítico. Se qualquer uma das diferenças entre as médias de subgrupos de quatro for maior que $\sqrt{2} * DS$, estas variáveis receberão especial atenção ao redigir o método, destacando a necessidade de um estrito controle para obter resultados de qualidade, ou seja, se:

$$Dif > \sqrt{2} * DS$$

Onde DS = desvio padrão entre as replicações realizadas nas condições de reprodutibilidade interna (validação) no mesmo nível de fortificação, então, esta variável se considerará crítica.

Nota 1: Os fatores a serem estudados não devem ser necessariamente sete; pode se considerar um número menor de variáveis. Isto não afetará o balanço do desenho do experimento desde que sejam realizados os oito ensaios indicados.

Nota 2: uma informação adicional do Teste de Youden é que o desvio padrão dos resultados “s” a “z” constitui uma medida excelente da imprecisão previsível do método quando se utiliza para a análise de rotina, já que este procedimento introduz deliberadamente o tipo de variação nas variáveis que pode se esperar que ocorra durante o emprego normal do método.

Frequência de revisão

5 anos

¹ Codex Guidelines for the Establishment of a Regulatory Programme for Control of Veterinary Drug Residues in Foods, Part III Attributes of analytical Methods for Residue of Veterinary Drugs in Foods, p. 41, CAC/GL 16-1993.

² Codex Guidelines for the Establishment of a Regulatory Programme for Control of Veterinary Drug Residues in Foods, Part III Attributes of analytical Methods for Residue of Veterinary Drugs in Foods, p. 42, CAC/GL 16-1993.

³ Guidance for industry: Bioanalytical method validation U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM) May 2001, BP.

⁴ IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry.

⁵ Codex Alimentarius Procedural Manual, 15th Ed., Twenty-eight Session of the Codex Alimentarius Commission, Rome, 2005, p 81.

⁶ Zorn ME, Gibbons RD, Sonzogni WC. Weighted Least-Squares Approach to Calculating Limits of Detection and Quantification by Modeling Variability as a Function of Concentration, *Anal Chem* 1997, 69, 3069-3075.