



Protocolo Estatístico: Doseamento Biológico

Action Stat Doseamento Versão 4.2

ESTATCAMP

Setembro / 2023

Sumário

1	Aprovação	4
2	Histórico de revisão	5
3	Introdução	5
4	Objetivos	5
5	Análise descritiva	5
5.1	Média amostral	5
5.2	Desvio padrão amostral	6
5.3	Coefficiente de variação	6
5.4	Amplitude	6
6	Modelo de retas paralelas - paralelismo	6
6.1	Retas paralelas $d \times d$	6
6.2	Modelo para validade do ensaio	7
6.2.1	Avaliação segundo Farmacopeia Brasileira	7
6.2.2	Avaliação segundo Farmacopeia Europeia	9
6.3	Modelo para estimativa da potência relativa	11
6.4	Determinação da potência relativa	12
6.5	Incerteza pelo método de Fieller	13
6.6	Fator de correção	16
7	Modelo de interpolação $d \times 1$	16
7.1	Validade do ensaio	16
7.2	Cálculo da potência relativa	17
8	Modelo slope-ratio	18
8.1	Modelo para validade do ensaio	18
8.2	Cálculo da potência relativa	20
9	Medida descritiva da qualidade de ajuste	21
9.1	Coefficiente de associação	21
10	Análise dos resíduos	21
10.1	Resíduos	21
10.1.1	Resíduos ordinários	21
10.1.2	Resíduos padronizados	22
10.1.3	Resíduos studentizados	22
10.2	Teste de normalidade	23
10.2.1	Teste de Anderson-Darling	23
10.2.2	Teste de Shapiro-Wilk	25
10.2.3	Teste de Kolmogorov-Smirnov	26
10.2.4	Teste de Ryan-Joiner	28
10.3	Testes de homoscedasticidade	29
10.3.1	Gráfico: Resíduos X Valores Ajustados	29

10.3.2	Teste de Brown-Forsythe	30
10.3.3	Teste de Cochran	31
10.3.4	Teste de Breusch-Pagan	32
10.3.5	Teste de Goldfeld-Quandt	32
10.4	Testes de independência	33
10.4.1	Gráfico: Resíduos Padronizados X Ordem de Coleta	33
10.4.2	Teste de Durbin-Watson	33
11	Teste de Equivalência	35
11.1	Teste de Equivalência para o Coeficiente do Termo Quadrático	36
11.2	Teste de Equivalência para o Paralelismo	37
12	Aplicação	37
12.1	Aplicação 1 - Paralelismo 3×3	38
12.2	Aplicação 2 - Paralelismo 4×4 com fator de correção	47
12.3	Aplicação 3 - Teste de equivalência para avaliação de desvio de linearidade	52
12.4	Aplicação 4 - Interpolação 5×1	54
12.5	Aplicação 5 - Modelo slope-ratio	61
	Referências	70

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

1 Aprovação

A assinatura abaixo indica a aprovação deste relatório.

ELABORADO POR:

NOME: Dorival Leão Pinto Júnior

CARGO: Consultor estatístico

Registro CONRE: 9795



ASSINATURA:

DATA: 01 de Setembro de 2023

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

2 Histórico de revisão

Tabela 1: Itens Revisados

Revisão	Data	Histórico
00	13 de janeiro de 2022	Emissão inicial
01	3 de abril de 2023	Mudança para versão 4.1
02	01 de Setembro de 2023	Mudança para versão 4.2

3 Introdução

O Action Stat é um sistema estatístico desenvolvido pela Estatcamp, uma empresa que atua desde 1997 nos setores de consultoria, desenvolvimento e treinamento. O início de seu desenvolvimento foi em 2005 por uma equipe de doutores em computação e estatística. O Action Stat utiliza o R, a principal linguagem de programação estatística de uso mundial. Através de um sistema próprio, conecta-se o R com ferramentas Web para que você tenha flexibilidade, agilidade e confiança nas suas aplicações estatísticas utilizando uma interface fácil e amigável.

4 Objetivos

Este protocolo tem por objetivo demonstrar as funcionalidades Action Stat referente ao Doseamento Biológico. Neste protocolo contemplam os tópicos:

- Análise descritiva
- Modelo de retas paralelas: ensaios $d \times d$
- Interpolação: ensaios $d \times 1$
- Modelo de slope-ratio
- Medida descritiva da qualidade de ajuste
- Análise de resíduos

Em cada tópico descreve-se as técnicas estatísticas utilizadas e exibe-se uma aplicação demonstrando as contas calculadas de forma manual e os resultados do Action Stat confirmando os resultados.

5 Análise descritiva

Nesta seção apresentam-se as técnicas voltadas à análise descritiva dos dados.

5.1 Média amostral

A média aritmética ou simplesmente média é uma medida de posição. Medidas de posição orientam onde os valores de interesse estão concentrados. Tem-se que a média $\bar{x}$ é dada por:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

5.2 Desvio padrão amostral

O desvio padrão é definido como a raiz da soma ao quadrado dos desvios dos elementos em relação à sua média $\bar{x}$ dividido por $(n - 1)$. Ou seja, o desvio padrão amostral é dado por:

$$sd = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

5.3 Coeficiente de variação

O coeficiente de variação é definido como a razão entre o desvio padrão, sd , e a média amostral, $\bar{x}$. Tem-se que o coeficiente de variação é dado por:

$$cv = \frac{sd}{\bar{x}} \times 100\%$$

5.4 Amplitude

A amplitude é definida como sendo a diferença entre o maior e o menor valor do conjunto de dados. Denota-se a amplitude por R . Portanto, considere o conjunto de dados ordenado:

$$X_{(1)} \leq X_{(2)} \leq X_{(3)} \leq \dots \leq X_{(n-1)} \leq X_{(n)}$$

A amplitude R dos dados é dada por:

$$R = X_{(n)} - X_{(1)}$$

6 Modelo de retas paralelas - paralelismo

Nesta seção apresentam-se os modelos de retas paralelas (paralelismo). Inicialmente apresenta-se o delineamento de retas paralelas para a validade de ensaios $d \times d$ em que d denota a quantidade de concentrações utilizadas no ensaio.

6.1 Retas paralelas $d \times d$

No modelo de paralelismo, os exemplos de delineamentos $d \times d$ mais frequentes são 2×2 , 3×3 e 4×4 . Previamente a apresentação da modelagem estatística voltada a validade do ensaio.

Conforme a Farmacopeia Brasileira [2], as hipóteses avaliadas na validação do ensaio são:

- **Regressão:**

$$\begin{cases} H_0 : \text{Coeficiente angular igual a zero} \\ H_1 : \text{Coeficiente angular diferente de zero} \end{cases}$$

- **Paralelismo:**

$$\begin{cases} H_0 : \text{As retas possuem coeficientes angulares iguais} \\ H_1 : \text{As retas possuem coeficientes angulares distintos} \end{cases}$$

- **Quadrado:**

$$\begin{cases} H_0 : \text{Coeficiente referente ao polinômio de segundo grau é igual a zero} \\ H_1 : \text{Coeficiente referente ao polinômio de segundo grau é diferente de zero} \end{cases}$$

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

Conforme a Farmacopeia Europeia [3], as hipóteses avaliadas na validação do ensaio são:

• **Regressão:**

$$\begin{cases} H_0 : \text{Coeficiente angular igual a zero} \\ H_1 : \text{Coeficiente angular diferente de zero} \end{cases}$$

• **Paralelismo:**

$$\begin{cases} H_0 : \text{As retas possuem coeficientes angulares iguais} \\ H_1 : \text{As retas possuem coeficientes angulares distintos} \end{cases}$$

• **Desvio da linearidade (falta de ajuste):**

$$\begin{cases} H_0 : \text{O modelo não apresenta desvio da linearidade (Falta de ajuste)} \\ H_1 : \text{O modelo apresenta desvio da linearidade (Falta de ajuste)} \end{cases}$$

Em ensaios 2×2 não se avalia a hipótese referente ao parâmetro Quadrado ou Desvio da linearidade (falta de ajuste). Segundo a Farmacopeia Brasileira [2], usualmente adotam-se os níveis de significância de 1% ($\alpha = 0,01$) e 5%, ($\alpha = 0,05$) para ensaios biológicos.

6.2 Modelo para validade do ensaio

6.2.1 Avaliação segundo Farmacopeia Brasileira

O modelo de regressão linear completo é dado por

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_{i1} + \beta_2 X_{i2} + \beta_3 X_{i3} + \beta_4 X_{i4} + \beta_5 X_{i5} + \varepsilon_i, \quad i = 1, \dots, n \quad (1)$$

em que:

- Y_i : é a variável resposta, que se relaciona com $p = 5$ variáveis explicativas;
- β_0 : é o intercepto do modelo;
- β_1 : é o coeficiente de regressão correspondente a variável explicativa Preparação;
- X_{i1} : é a variável dummy referente a Preparação, 0 para padrão, 1 para teste;
- β_2 : é o coeficiente de regressão correspondente a variável explicativa Dose. Pode-se aplicar o logaritmo na dose, em que as possíveis transformações são $\log_{10}(\text{dose})$ e $\ln(\text{dose})$;
- X_{i2} : é a variável explicativa $\log_{10}(\text{dose})$ ou $\ln(\text{dose})$;
- β_3 : é o coeficiente de regressão correspondente ao paralelismo;
- X_{i3} : é a interação entre as variáveis X_{i1} e X_{i2} ;
- β_4 : é o coeficiente de regressão correspondente ao termo quadrático;
- X_{i4} : é o termo quadrático de X_{i2} , $X_{i4} = X_{i2}^2$;
- β_5 : é o coeficiente de regressão correspondente a diferença de quadráticos;
- X_{i5} : é a interação entre as variáveis X_{i1} e X_{i4} ;
- ε_i : representa o erro experimental.

GRUPO ESTAT CAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

Considera-se o modelo 1 escrito na forma matricial

$$Y = X\beta + \varepsilon.$$

Assim, as estimativas do vetor de parâmetros β via o método de mínimos quadrados na forma:

$$\begin{aligned}\varepsilon^\top \varepsilon &= (Y - X\beta)^\top (Y - X\beta) \\ &= Y^\top Y - 2Y^\top X\beta + \beta^\top X^\top X\beta.\end{aligned}$$

Para encontrar o mínimo de $\varepsilon^\top \varepsilon$ deriva-se em função de β e iguala-se a zero:

$$\frac{\partial \varepsilon^\top \varepsilon}{\partial \beta} = 0 - 2X^\top Y + 2X^\top X\hat{\beta} = 0 \iff \hat{\beta} = (X^\top X)^{-1} X^\top Y$$

Portanto, o ajuste do modelo de regressão e o vetor de resíduos do modelo são definidos por:

$$\hat{Y} = X\hat{\beta} \quad \text{e} \quad e = Y - \hat{Y}.$$

A soma de quadrados total (SQT) para o modelo é calculada da seguinte forma

$$SQT = \sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2$$

Já a soma de quadrados dos resíduos (SQE) é dada por

$$SQE = \sum_{i=1}^n e_i^2 = \sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y})^2$$

Desta forma, obtêm-se que o quadrado médio do erro (QME) para o modelo completo

$$QME = \frac{SQE}{n - 5 - 1} = \frac{SQE}{n - 6}$$

ANOVA sequencial A avaliação de hipóteses é realizada por ANOVA sequencial, ajustam-se modelos conforme a ordem de introdução de variável explicativa na regressão. No teste de significância de cada fator, as hipóteses de interesse são:

$$\begin{cases} H_0 : \beta_i = 0 \\ H_1 : \beta_i \neq 0, \quad i = 1, \dots, 5 \end{cases} \quad (2)$$

Denomina-se por modelo reduzido o modelo supondo que H_0 é verdadeiro. A estatística sob H_0 é dada por:

$$F_0 = \frac{SQR(\beta_i | \beta_R)}{QME} \sim F_{1, (n-p-1)} \quad (3)$$

e

$$p\text{-valor} = \mathbb{P} [F_{1, (n-p-1)} > F_0 \mid H_0].$$

Portanto, se $F_0 > F_{\alpha, 1, (n-p-1)}$ ou $p\text{-valor} \leq \alpha$ rejeita-se a hipótese nula.

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

O numerador da F_0 na 3 é a soma de quadrados extra representa a quantidade adicional que se teria na soma de quadrados da regressão (SQR) ao adicionar-se uma covariável no modelo reduzido. Essa quantidade equivale à redução de soma de quadrados residuais que pode ser calculada por

$$SQR(\beta_i|\beta_R) = SQE(\beta_R) - SQE(\beta_R, \beta_i), \quad (4)$$

em que $SQE(\beta_R)$ e $SQE(\beta_R, \beta_i)$ são a soma de quadrados residual do modelo reduzido e do modelo contendo a nova covariável, respectivamente. Então, se o interesse é testar $H_0 : \beta_2 = 0$, tem-se a soma de quadrados extra ao adicionar X_2 no modelo que tem somente a X_1 é dada por

$$SQR(\beta_2|\beta_1) = SQE(\beta_1) - SQE(\beta_1, \beta_2).$$

A seguir se apresenta a Tabela ANOVA para os ensaios $d \times d$ conforme Farmacopeia Brasileira:

Fonte	SQ	GL	QM	Estatística
Preparações	SQ_{prep}	1	$QM_{prep} = \frac{SQ_{prep}}{1}$	$\frac{SQ_{prep}}{QME}$
Regressão	SQ_{reg}	1	$QM_{reg} = \frac{SQ_{reg}}{1}$	$\frac{SQ_{reg}}{QME}$
Paralelismo	SQ_{par}	1	$QM_{par} = \frac{SQ_{par}}{1}$	$\frac{SQ_{par}}{QME}$
Quadrático	SQ_{qua}	1	$QM_{qua} = \frac{SQ_{qua}}{1}$	$\frac{SQ_{qua}}{QME}$
Diferença de Quadráticos	SQ_{dqua}	1	$QM_{dqua} = \frac{SQ_{dqua}}{1}$	$\frac{SQ_{dqua}}{QME}$
Resíduos	SQE	$n - 5 - 1$	$QME = \frac{SQE}{n - 5 - 1}$	
Total	SQT	$n - 1$		

Tabela 2: Tabela da ANOVA - Ensaios $d \times d$ de Paralelismo (Farmacopeia Brasileira).

Consideram-se os ensaios estatisticamente válidos conforme Farmacopeia Brasileira se os testes apresentarem os seguintes resultados:

- **Regressão significativa:** p -valor do teste menor do que o nível de significância, p -valor $< \alpha$;
- **Quadrado não significativo:** p -valor do teste maior do que o nível de significância, p -valor $> \alpha$;
- **Paralelismo não significativo:** p -valor do teste maior do que o nível de significância, p -valor $> \alpha$.

6.2.2 Avaliação segundo Farmacopeia Europeia

A hipótese do desvio de linearidade é avaliada por teste de falta de ajuste. O modelo de regressão linear completo é dado por

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_{i1} + \beta_2 X_{i2} + \beta_3 X_{i3} + \varepsilon_i, \quad i = 1, \dots, n \quad (5)$$

em que:

- Y_i : é a variável resposta, que se relaciona com $p = 3$ variáveis explicativas;

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

- β_0 : é o intercepto do modelo;
- β_1 : é o coeficiente de regressão correspondente a variável explicativa Preparação;
- X_{i1} : é a variável dummy referente a Preparação, 0 para padrão, 1 para teste;
- β_2 : é o coeficiente de regressão correspondente a variável explicativa Dose. Pode-se aplicar o logaritmo na dose, em que as possíveis transformações são $\log_{10}(\text{dose})$ e $\ln(\text{dose})$;
- X_{i2} : é a variável explicativa $\log_{10}(\text{dose})$ ou $\ln(\text{dose})$;
- β_3 : é o coeficiente de regressão correspondente ao paralelismo;
- X_{i3} : é a interação entre as variáveis X_{i1} e X_{i2} ;
- ε_i : representa o erro experimental.

Análise da falta de ajuste Suponha que tem n_i observações para cada combinação das variáveis X_1 e X_2 , tem-se no total $n = \sum_{j=1}^2 n_j$ observações. O procedimento do teste envolve particionar a soma dos quadrados dos resíduos em dois componentes,

$$Y_{jk} - \hat{Y}_{jk} = (Y_{jk} - \bar{Y}_{j.}) + (\bar{Y}_{j.} - \hat{Y}_j), \quad j = 1, 2 \text{ e } k = 1, \dots, n_j.$$

A primeira parte reflete a variabilidade entre as observações da variável resposta para a mesma combinação de x , enquanto que a segunda parte reflete os desvios das médias das observações em cada x para o modelo.

Assim, associa-se a primeira parte ao erro puro (PE) e a segunda parte à falta de ajuste do modelo (LOF).

$$\begin{aligned}
SQE &= \sum_{j=1}^2 \sum_{k=1}^{n_j} (Y_{jk} - \hat{Y}_j)^2 \\
&= \sum_{j=1}^2 \sum_{k=1}^{n_j} (Y_{jk} - \bar{Y}_{j.} + \bar{Y}_{j.} - \hat{Y}_j)^2 \\
&= \sum_{j=1}^2 \sum_{k=1}^{n_j} ((Y_{jk} - \bar{Y}_{j.}) - (\hat{Y}_j - \bar{Y}_{j.}))^2 \\
&= \sum_{j=1}^2 \sum_{k=1}^{n_j} (Y_{jk} - \bar{Y}_{j.})^2 - 2 \sum_{j=1}^2 \sum_{k=1}^{n_j} (Y_{jk} - \bar{Y}_{j.})(\hat{Y}_j - \bar{Y}_{j.}) + \sum_{j=1}^2 \sum_{k=1}^{n_j} (\hat{Y}_j - \bar{Y}_{j.})^2 \\
&= \sum_{j=1}^2 \sum_{k=1}^{n_j} (Y_{jk} - \bar{Y}_{j.})^2 + \sum_{j=1}^2 n_j (\hat{Y}_j - \bar{Y}_{j.})^2, \text{ pois } 2 \sum_{j=1}^2 \sum_{k=1}^{n_j} (Y_{jk} - \bar{Y}_{j.})(\hat{Y}_j - \bar{Y}_{j.}) = 0 \\
&= SQ_{PE} + SQ_{LOF}.
\end{aligned}$$

Assim,

$$SQ_{PE} = \sum_{j=1}^2 \sum_{k=1}^{n_j} (Y_{jk} - \bar{Y}_{j.})^2 \quad \text{e} \quad SQ_{LOF} = \sum_{j=1}^2 n_j (\hat{Y}_j - \bar{Y}_{j.})^2.$$

O quadrado médio devido ao Falta de Ajuste é dado por

$$QM_{LOF} = \frac{SQ_{LOF}}{c - p - 1},$$

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

em que c é a quantidade de combinação única de x e p é o número de variáveis explicativas no modelo. Logo a estatística para o teste de falta de ajuste, sob H_0 , é dada por

$$F_0 = \frac{QM_{LOF}}{QM_{PE}} = \frac{\frac{SQ_{LOF}}{c-p-1}}{\frac{SQ_{PE}}{n-c}} \sim F_{(c-p-1; n-c)}$$

e

$$p\text{-valor} = \mathbb{P}[F_{c-p-1, n-c} > F_0 \mid H_0].$$

Portanto, se $F_0 > F_{(\alpha, c-p-1; n-c)}$ ou $p\text{-valor} \leq \alpha$ rejeita-se a hipótese nula.

A seguir se apresenta a Tabela ANOVA para os ensaios $d \times d$ conforme Farmacopeia Europeia:

Fonte	SQ	GL	QM	Estatística
Preparações	SQ_{prep}	1	$QM_{prep} = \frac{SQ_{prep}}{1}$	$\frac{SQ_{prep}}{QM_{PE}}$
Regressão	SQ_{reg}	1	$QM_{reg} = \frac{SQ_{reg}}{1}$	$\frac{SQ_{reg}}{QM_{PE}}$
Paralelismo	SQ_{par}	1	$QM_{par} = \frac{SQ_{par}}{1}$	$\frac{SQ_{par}}{QM_{PE}}$
Resíduo	SQE	$n - 3 - 1$	$QME = \frac{SQE}{n - 3 - 1}$	
Desvio da linearidade	$SQE - SQ_{PE}$	$c - 3 - 1$	$QM_{LOF} = \frac{SQE - SQ_{PE}}{c - 3 - 1}$	$\frac{QM_{LOF}}{QM_{PE}}$
Erro Puro	SQ_{PE}	$n - c$	$QM_{PE} = \frac{SQ_{PE}}{n - c}$	

Tabela 3: Tabela da ANOVA - Ensaios $d \times d$ de Paralelismo (Farmacopeia Europeia).

Consideram-se os ensaios estatisticamente válidos conforme Farmacopeia Europeia se os testes apresentarem os seguintes resultados:

- **Regressão significativa:** p -valor do teste menor do que o nível de significância, $p\text{-valor} < \alpha$;
- **Paralelismo não significativo:** p -valor do teste maior do que o nível de significância, $p\text{-valor} > \alpha$;
- **Desvio da linearidade não significativo:** p -valor do teste maior do que o nível de significância, $p\text{-valor} > \alpha$.

Conforme as Farmacopeias Brasileira [2] e Europeia [3], para os ensaios que incluíram Placas terão uma fonte de variação segregada na Tabela de Anova, 2 e 3, entretanto a significância não afeta a validade do ensaio.

6.3 Modelo para estimativa da potência relativa

O cálculo de potência relativa é baseado na suposição de similaridade entre as preparações. Uma vez que as condições estabelecidas para a validade do ensaio forem cumpridas, pode-se proceder para estimar a potência e calcular os limites de confiança. O modelo linear é dado por

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_{i1} + \beta_2 X_{i2} + \varepsilon_i, \quad i = 1, \dots, n \quad (6)$$

em que

- Y_i : é a variável resposta, que se relaciona com $p = 2$ variáveis explicativas;

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

- β_0 : é o intercepto do modelo;
- β_1 : é o coeficiente de regressão correspondente a variável explicativa Preparação;
- X_{i1} : é a variável dummy referente a Preparação, 0 para padrão, 1 para teste;
- β_2 : é o coeficiente de regressão correspondente a variável explicativa Dose com transformação de logaritmo aplicado, as possíveis transformações são $\log_{10}(\text{dose})$ e $\ln(\text{dose})$;
- X_{i2} : é a variável explicativa $\log_{10}(\text{dose})$ ou $\ln(\text{dose})$;
- ε_i : representa o erro experimental.

Então, para a preparação padrão $X_{i1} = 0$, tem-se

$$Y_i = \beta_0 + \beta_2 X_{i2} + \varepsilon_i \quad i = 1, \dots, n$$

e para a preparação teste $X_{i1} = 1$,

$$Y_i = (\beta_0 + \beta_1) + \beta_2 X_{i2} + \varepsilon_i \quad i = 1, \dots, n.$$

6.4 Determinação da potência relativa

Os ensaios de linha paralela são aqueles em que a resposta está linearmente relacionada ao logaritmo da dose, da definição de “potência relativa” ρ , as duas doses são relacionadas por:

$$d_t = \rho d_s \quad (7)$$

em que

- d_s é a dose padrão;
- d_t é a dose teste;
- ρ é a potência relativa.

Pela suposição de paralelismo, tem-se a reta ajustada para a respectiva preparação:

$$\begin{aligned}
\mathbb{E}[Y_s | X_s = \log(d_s)] &= \underbrace{b_0}_{b_{0s}} + b_1 \log(d_s) \quad (\text{padrão}) \\
\mathbb{E}[Y_t | X_t = \log(d_t)] &= b_0 + b_1 \log(\rho d_s) \\
&= \underbrace{b_0 + b_1 \log(\rho)}_{b_{0t}} + b_1 \log(d_s) \quad (\text{teste})
\end{aligned}$$

Assim, o logaritmo da razão de potências pode ser obtido dividindo a diferença entre os interceptos pela inclinação comum da $\log \rho = \frac{b_{0t} - b_{0s}}{b_1}$. Desta forma, usando o modelo 6, obtém-se:

$$M = \log(\hat{\rho}) = \frac{\hat{\beta}_1}{\hat{\beta}_2} \quad (8)$$

O intervalo de confiança para ρ é obtido por meio do método Fieller apresentado na próxima seção.

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

6.5 Incerteza pelo método de Fieller

Na prática tem-se interesse em prever o valor de X , dado uma observação em Y . Com isso obtém-se:

$$\hat{x}_0 = \frac{\hat{y}_0 - \hat{\beta}_0}{\hat{\beta}_1}$$

que é uma razão de duas variáveis aleatórias com distribuição normal, ou seja, $\hat{y}_0 - \hat{\beta}_0$ tem distribuição normal com média $\beta_1 x_0$ e variância $\frac{\sigma^2 x_0^2}{S_{xx}}$ e $\hat{\beta}_1$ tem distribuição normal com média β_1 e variância $\frac{\sigma^2}{S_{xx}}$. Ao padronizar estas duas variáveis aleatórias, obtêm-se duas variáveis aleatórias normais padrão, isto é, $W, V \sim N(0, 1)$. Logo a razão destas duas variáveis aleatórias terá uma distribuição de Cauchy, que não possui média e variância, o que impossibilitaria calcular a incerteza devido à curva de calibração. Porém, é possível utilizar um resultado que possibilite calcular a incerteza devido à curva de calibração, que é o teorema de Fieller.

O teorema de Fieller é um resultado geral para intervalos de confiança da razão de duas variáveis aleatórias normalmente distribuídas.

Seja a variável aleatória $\rho = \frac{\beta_0}{\beta_1}$, em que β_0 e β_1 são estimados por $\hat{\beta}_0$ e $\hat{\beta}_1$ e estes estimadores são normalmente distribuídos com médias β_0 , β_1 e variâncias $\text{Var}(\beta_0)$, $\text{Var}(\beta_1)$ respectivamente. Considerar $\psi = \hat{\beta}_0 - \rho \hat{\beta}_1$.

Com isso, como $\hat{\beta}_0$ e $\hat{\beta}_1$ são estimadores não viciados de β_0 e β_1 , tem-se que:

$$\mathbb{E}(\psi) = \beta_0 - \rho \beta_1 = 0$$

$$\text{Var}(\psi) = \text{Var}(\hat{\beta}_0) + \text{Var}(\rho \hat{\beta}_1) - 2\text{Cov}(\hat{\beta}_0, \rho \hat{\beta}_1) \quad (9)$$

Suponha que ψ seja normalmente distribuído e

$$\frac{\hat{\beta}_0 - \rho \hat{\beta}_1}{\text{Var}(\psi)}$$

tem distribuição normal padrão. Agora, observe a seguinte desigualdade,

$$|\hat{\beta}_0 - \rho \hat{\beta}_1| \leq z_{\alpha/2} \sqrt{\text{Var}(\psi)}$$

Elevando ao quadrado em ambos os lados e igualando a zero.

$$\hat{\beta}_0^2 + \rho^2 \hat{\beta}_1^2 - 2\rho \hat{\beta}_0 \hat{\beta}_1 - z_{\alpha/2}^2 \text{Var}(\psi) = 0$$

Substituindo $\text{Var}(\psi)$ por (9), com isso obtém-se

$$\hat{\beta}_0^2 + \rho^2 \hat{\beta}_1^2 - 2\rho \hat{\beta}_0 \hat{\beta}_1 - z_{\alpha/2}^2 \left(\text{Var}(\hat{\beta}_0) + \text{Var}(\hat{\beta}_1) - 2\rho \text{Cov}(\hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1) \right) = 0$$

Para facilitar a notação, substitui-se $\text{Var}(\hat{\beta}_0) = v_1$, $\text{Var}(\hat{\beta}_1) = v_2$, $\text{Cov}(\hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1) = v_{12}$ e $z_{\alpha/2} = w$. Com isso, têm-se que

$$\hat{\beta}_0^2 + (\rho \hat{\beta}_1)^2 - 2\rho \hat{\beta}_0 \hat{\beta}_1 - w^2 v_1 - \rho^2 w^2 v_2 + 2\rho w^2 v_{12} = 0$$

$$(\hat{\beta}_1^2 - w^2 v_2) \rho^2 - (2\hat{\beta}_0 \hat{\beta}_1 - 2w^2 v_{12}) \rho + (\hat{\beta}_0^2 - w^2 v_1) = 0$$

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

Assim esta expressão é uma equação do segundo grau do tipo $a\rho^2 + b\rho + c = 0$ (Bhaskara). Logo resolve-se esta equação da seguinte forma:

$$\begin{aligned}\Delta &= 4(2\hat{\beta}_0\hat{\beta}_1 - 2w^2v_{12})^2 - 4(\hat{\beta}_1^2 - w^2v_2)(\hat{\beta}_0^2 - w^2v_1) \\ &= 4w^2(w^2v_{12}^2 - w^2v_1v_2 + \beta_0^2v_2 + \beta_0^2v_1 - 2\beta_0\beta_1v_{12})\end{aligned}$$

Portanto, a solução para $\hat{\rho}$ é dada por

$$\hat{\rho} = \frac{\hat{\beta}_0\hat{\beta}_1 - w^2v_{12}}{\hat{\beta}_1^2 - w^2v_2} \pm \frac{w}{\hat{\beta}_1^2 - w^2v_2} \sqrt{w^2v_{12}^2 - w^2v_1v_2 + \beta_0^2v_2 + \beta_1^2v_1 - 2\beta_0\beta_1v_{12}}$$

Voltando as notações originais e chega-se a seguinte expressão:

$$\hat{\rho} = \gamma_1 \pm \gamma_2 \sqrt{\left(z_{\alpha/2} \text{Cov}(\hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1)\right)^2 - z_{\alpha/2}^2 \text{Var}(\hat{\beta}_0) \text{Var}(\hat{\beta}_1) + \beta_0^2 \text{Var}(\hat{\beta}_1) + \beta_1^2 \text{Var}(\hat{\beta}_0) - 2\beta_0\beta_1 \text{Cov}(\hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1)}$$

em que

$$\gamma_1 = \frac{\hat{\beta}_0\hat{\beta}_1 - z_{\alpha/2}^2 \text{Cov}(\hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1)}{\hat{\beta}_1^2 - z_{\alpha/2}^2 \text{Var}(\hat{\beta}_1)} \quad \text{e} \quad \gamma_2 = \frac{z_{\alpha/2}}{\hat{\beta}_1^2 - z_{\alpha/2}^2 \text{Var}(\hat{\beta}_1)}$$

As duas raízes da equação do segundo grau, são os limites de confiança 100(1- α)% para ρ , que é o método de Fieller.

Agora calcula-se a variância para $\hat{x}_0 = \frac{\hat{y}_0 - \hat{\beta}_0}{\hat{\beta}_1}$. Para isto, adapta-se o resultado obtido para $\hat{\rho}$. Então basta trocar $\hat{\beta}_0$ por $\hat{y}_0 - \hat{\beta}_0$. Mas para isto realiza-se alguns cálculos:

$$\text{Var}(\hat{y}_0 - \hat{\beta}_0) = \text{Var}(\hat{y}_0) + \text{Var}(\hat{\beta}_0) - 2\text{Cov}(\hat{y}_0, \hat{\beta}_0) \quad (10)$$

Porém, tem-se:

$$\text{Cov}(\hat{y}_0, \hat{\beta}_0) = \mathbb{E}(\hat{y}_0\hat{\beta}_0) - \mathbb{E}(\hat{y}_0)\mathbb{E}(\hat{\beta}_0) \quad (11)$$

Calcula-se agora

$$\mathbb{E}(\hat{y}_0\hat{\beta}_0) = \mathbb{E}(\hat{\beta}_0^2 + \hat{\beta}_0\hat{\beta}_1x_0) = \mathbb{E}(\hat{\beta}_0^2) + \mathbb{E}(\hat{\beta}_0\hat{\beta}_1)x_0 = \text{Var}(\hat{\beta}_0) + \mathbb{E}^2(\hat{\beta}_0) + \mathbb{E}(\hat{\beta}_0\hat{\beta}_1)x_0$$

Voltando em (11) e obtêm-se

$$\begin{aligned}\text{Cov}(\hat{y}_0, \hat{\beta}_0) &= \text{Var}(\hat{\beta}_0) + \mathbb{E}^2(\hat{\beta}_0) + \mathbb{E}(\hat{\beta}_0\hat{\beta}_1)x_0 - \mathbb{E}^2(\hat{\beta}_0) - \mathbb{E}(\hat{\beta}_0)\mathbb{E}(\hat{\beta}_1)x_0 = \\ &= \text{Var}(\hat{\beta}_0) + \text{Cov}(\hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1)x_0\end{aligned}$$

Agora, voltando em (10) e obtêm-se

$$\begin{aligned}\text{Var}(\hat{y}_0 - \hat{\beta}_0) &= \text{Var}(\hat{y}_0) + \text{Var}(\hat{\beta}_0) - 2\text{Var}(\hat{\beta}_0) - 2\text{Cov}(\hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1)x_0 = \\ &= \text{Var}(\hat{y}_0) - \text{Var}(\hat{\beta}_0) - 2\text{Cov}(\hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1)x_0\end{aligned}$$

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

Vale lembrar que

$$\begin{aligned}
\text{Cov}(\hat{y}_0 - \hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1) &= \text{Cov}(\hat{y}_0, \hat{\beta}_1) - \text{Cov}(\hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1) = \text{Cov}(\hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 x_0, \hat{\beta}_1) - \text{Cov}(\hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1) = \\
&= \text{Cov}(\hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1) + \text{Cov}(\hat{\beta}_1, \hat{\beta}_1) x_0 - \text{Cov}(\hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1) = \text{Var}(\hat{\beta}_1) x_0
\end{aligned}$$

Logo, tem-se que

$$\begin{aligned}
u(\hat{x}_0) &= \gamma_1 \pm \gamma_2 \left(\left(z_{\alpha/2} \text{Var}(\hat{\beta}_1) x_0 \right)^2 - z_{\alpha/2}^2 \text{Var}(\hat{y}_0) \text{Var}(\hat{\beta}_1) + z_{\alpha/2}^2 \text{Var}(\hat{\beta}_0) \text{Var}(\hat{\beta}_1) + \right. \\
&+ 2 z_{\alpha/2}^2 \text{Cov}(\hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1) \text{Var}(\hat{\beta}_1) x_0 + \hat{\beta}_0^2 \text{Var}(\hat{\beta}_1) + \hat{\beta}_1^2 \text{Var}(\hat{y}_0) - \hat{\beta}_1^2 \text{Var}(\hat{\beta}_0) \\
&\left. - 2 \hat{\beta}_1^2 \text{Cov}(\hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1) x_0 - 2 \hat{\beta}_0 \hat{\beta}_1 \text{Var}(\hat{\beta}_1) x_0 \right)^{1/2}
\end{aligned}$$

Substituindo a equação anterior pelos valores:

$$\text{Var}(\hat{\beta}_1) = \frac{\text{QME}}{S_{xx}}, \quad \text{Var}(\hat{\beta}_0) = \text{QME} \left(\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{S_{xx}} \right) \quad \text{e} \quad \text{Cov}(\hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1) = -\frac{\bar{x} \text{QME}}{S_{xx}}$$

e com algumas manipulações algébricas obtêm-se que

$$V(\hat{x}_0) = \frac{\hat{\beta}_0 \hat{\beta}_1 + \bar{x} g}{(\hat{\beta}_1^2 - g)} \pm \frac{z_{\alpha/2}}{(\hat{\beta}_1^2 - g)} \sqrt{2g \frac{\text{QME}}{S_{xx}} \bar{x} \hat{x}_0 + \text{QME} \frac{\hat{y}_0^2}{S_{xx}}}$$

em que $g = \frac{z_{\alpha/2}^2 \text{QME}}{S_{xx}}$. Quando g é zero para $V(\hat{x}_0)$, tem-se os limites para $\hat{\rho}(\hat{x}_0)$. Com isso tem-se que

$$V(\hat{x}_0) = \hat{\rho} \pm \frac{z_{\alpha/2}}{\hat{\beta}_1^2} \sqrt{\text{QME} \frac{\hat{y}_0^2}{S_{xx}}}$$

Agora, observe que

$$-\frac{z_{\alpha/2}}{\hat{\beta}_1^2} \sqrt{\text{QME} \frac{\hat{y}_0^2}{S_{xx}}} \leq \frac{\hat{\beta}_0}{\hat{\beta}_1} \leq \frac{z_{\alpha/2}}{\hat{\beta}_1^2} \sqrt{\text{QME} \frac{\hat{y}_0^2}{S_{xx}}}$$

Multiplicando por -1 a inequação e somando $\frac{\hat{y}_0}{\hat{\beta}_1}$, obtêm-se que

$$\frac{\hat{y}_0}{\hat{\beta}_1} - \frac{z_{\alpha/2}}{\hat{\beta}_1^2} \sqrt{\text{QME} \frac{\hat{y}_0^2}{S_{xx}}} \leq \frac{\hat{y}_0}{\hat{\beta}_1} - \frac{\hat{\beta}_0}{\hat{\beta}_1} \leq \frac{\hat{y}_0}{\hat{\beta}_1} + \frac{z_{\alpha/2}}{\hat{\beta}_1^2} \sqrt{\text{QME} \frac{\hat{y}_0^2}{S_{xx}}}$$

Logo, tem-se que

$$\frac{\hat{y}_0}{\hat{\beta}_1} - \frac{z_{\alpha/2}}{\hat{\beta}_1^2} \sqrt{\text{QME} \frac{\hat{y}_0^2}{S_{xx}}} \leq \hat{x}_0 \leq \frac{\hat{y}_0}{\hat{\beta}_1} + \frac{z_{\alpha/2}}{\hat{\beta}_1^2} \sqrt{\text{QME} \frac{\hat{y}_0^2}{S_{xx}}}$$

Portanto, a incerteza padronizada devido a curva de calibração é dada por:

$$u(\hat{x}_0) = \frac{\hat{y}_0 + \hat{\beta}_1}{\hat{\beta}_1} \sqrt{\frac{\text{QME}}{\hat{\beta}_1^2} \frac{\hat{y}_0^2}{S_{xx} \hat{\beta}_1^2}}$$

	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

6.6 Fator de correção

Para a obtenção da potência se define, conforme a Farmacopeia Europeia [3]

- **Potência atribuída:** potência da preparação do padrão;
- **Potência assumida:** potência atribuída provisoriamente de uma preparação a ser examinada (no caso da amostra), que constitui a base do cálculo das doses que são equipotentes e das doses a serem utilizadas na preparação do padrão.

O fator de correção deve ser aplicado se as soluções estoques não são exatamente equipotentes com base nas potências atribuídas (para o padrão) e assumidas (para a amostra). O fator de correção é dado por:

$$fc = \frac{Pot_{at} \times Sol_{est_p}}{Pot_{as} \times Sol_{est_a}},$$

em que:

- Pot_{at} : potência atribuída para a preparação do padrão;
- Pot_{as} : potência assumida para a preparação da amostra;
- Sol_{est_p} : solução estoque da preparação do padrão;
- Sol_{est_a} : solução estoque da preparação do amostra.

Caso seja considerada mais de uma solução estoque, o fator de correção deve incluir estas em seu cálculo. Logo, a potência é dada por:

$$Pot = \frac{\text{antilog}(M)}{100} \times fc \times Pot_{as},$$

em que $\text{antilog}(M)$ é o antilog da potência relativa M obtida e Pot refere-se a potência.

7 Modelo de interpolação $d \times 1$

Nesta seção apresentam-se as técnicas estatísticas voltadas à análise de ensaios com o delineamento $d \times 1$. O modelo é análogo ao de regressão linear, conforme descrito na seção 6.2, desta forma o modelo de validade é análogo ao descrito na seção 6.2.

7.1 Validade do ensaio

O modelo linear simples é:

$$Y_{ij} = \beta_0 + \beta_1 x_i + \varepsilon \quad \begin{cases} i = 1, 2, \dots, m \\ j = 1, 2, \dots, n_i \end{cases} \quad (12)$$

em que,

- Y_{ij} : representa a j -ésima observação para o i -ésimo valor da variável;
- β_0 : onde a reta intercepta o eixo y ;

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

- β_1 : representa a inclinação da reta de regressão;
- x_i : representa o i -ésimo valor da variável explicativa dose; pode ser aplicado transformação de logaritmo, as possíveis transformações são $\log_{10}(\text{dose})$ e $\ln(\text{dose})$;
- ε_{ij} : representa o erro aleatório associado à i -ésima e j -ésima observação;
- c : o número de valores diferentes da variável explicativa;
- n_i : representa o número de observações para o i -ésimo valor de x .

Fonte	SQ	GL	QM	Estatística
Regressão	SQR	1	$\frac{SQR}{1}$	$\frac{QMR}{QME}$
Resíduo	SQE	$n - 2$	$\frac{SQE}{n - 2}$	
Falta de Ajuste	$SQE - SQ_{PE}$	$c - 2$	$\frac{SQE - SQ_{PE}}{c - 2}$	$\frac{QM_{LOF}}{QM_{PE}}$
Erro Puro	SQ_{PE}	$n - c$	$\frac{SQ_{PE}}{n - c}$	
Total	SQT	$n - 1$		

Tabela 4: Tabela da ANOVA.

Consideram-se os ensaios estatisticamente válidos se os testes apresentarem os seguintes resultados:

- **Regressão significativa:** p -valor do teste menor do que o nível de significância, $p\text{-valor} < \alpha$;
- **Desvio da linearidade não significativo:** p -valor do teste maior do que o nível de significância, $p\text{-valor} > \alpha$.

7.2 Cálculo da potência relativa

O cálculo da potência para ensaios $d \times 1$ é dado por:

$$\text{Potência Relativa} = \text{Antilog}(M) = \text{Antilog}\left(\frac{\sum_{i=1}^n (y_{a_i} - y_{p_i})}{\hat{\beta}_1}\right) \quad (13)$$

em que

- y_{a_i} : i -ésima medição da amostra;
- y_{p_i} : i -ésima medição do padrão;
- $\hat{\beta}_1$: estimativa do coeficiente angular.

	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

8 Modelo slope-ratio

Nesta seção apresentam-se as técnicas estatísticas voltadas ao modelo de slope-ratio (razão entre os coeficientes angulares). Segundo a Farmacopeia Europeia [3] tem-se que os experimentos que utilizam a modelagem via slope-ratio podem ser:

- $d \times d + 1$: nesse tipo de ensaio tem-se d concentrações e se considera o branco, denotado por 1 no ensaio;
- $d \times d$: nesse tipo de ensaios tem-se d concentrações, sem considerar o branco.

Para os ensaios que seguem esse formato, têm-se algumas restrições (para mais detalhes [3]), as quais são:

- As preparações do padrão e da amostra deve ser avaliadas com o mesmo número de diluições e as diluições devem ser equidistantes;
- O branco é definido como o grupo experimental que não recebe nenhum tratamento;
- O número de unidades experimentais deve ser igual para cada tratamento.

A seguir apresentam-se as hipóteses a serem avaliadas na validação do ensaio.

- **Branco:**

$$\begin{cases} H_0 : \text{A variação do branco não é significativa} \\ H_1 : \text{A variação no branco é significativa} \end{cases}$$

- **Regressão:**

$$\begin{cases} H_0 : \text{Coeficiente angular igual a zero} \\ H_1 : \text{Coeficiente angular diferente de zero} \end{cases}$$

- **Igualdade de intercepto:**

$$\begin{cases} H_0 : \text{A preparação do padrão e da amostra têm o mesmo intercepto} \\ H_1 : \text{A preparação do padrão e da amostra têm interceptos distintos} \end{cases}$$

- **Desvio da linearidade (falta de ajuste):**

$$\begin{cases} H_0 : \text{O modelo não apresenta desvio da linearidade (Falta de ajuste)} \\ H_1 : \text{O modelo apresenta desvio da linearidade (Falta de ajuste)} \end{cases}$$

Em relação a hipótese referente ao branco, tem-se que se a variação deste é significativa a hipótese de linearidade no ponto de zero-dose não é válida. Desta forma retira-se tal ponto da análise estatística, obtendo assim um ensaio $d \times d$ e não mais $d \times d + 1$.

8.1 Modelo para validade do ensaio

Com objetivo de avaliar a significância dos parâmetros descritos anteriormente utiliza-se o teste F parcial, analogamente ao descrito na seção 6.2. Inicialmente, considera-se o modelo de regressão linear escrito na forma:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_{i1} + \beta_2 X_{i2} + \beta_3 X_{i3} + \varepsilon_i, \quad i = 1, \dots, n \quad (14)$$

em que

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

- Y_i : é a variável resposta, que se relaciona com $p = 3$ variáveis explicativas;
- β_0 : é o intercepto do modelo;
- β_1 : é o coeficiente de regressão correspondente a variável explicativa Dose;
- X_{i1} : é a variável explicativa correspondente a variável explicativa Dose;
- β_2 : é o coeficiente de regressão correspondente a variável explicativa Preparação;
- X_{i2} : é a variável dummy, referente a Preparação;
- β_3 : é o coeficiente de regressão correspondente a interação entre as variáveis explicativas Dose e Preparação;
- X_{i3} : é a variável explicativa referente a interação entre Dose e Preparação;
- ε_i : representa o erro experimental.

A variável explicativa Preparação, em ensaios $d \times d + 1$ é denotada por:

$$\text{Preparação} = \begin{cases} -1, & \text{branco} \\ 0, & \text{padrão} \\ 1, & \text{teste} \end{cases}$$

Nos ensaios em que não se considera o branco, a variável explicativa Preparação, isto é, em ensaios $d \times d$ é denotada por:

$$\text{Preparação} = \begin{cases} 0, & \text{padrão} \\ 1, & \text{teste} \end{cases}$$

A seguir se apresenta a Tabela ANOVA para os ensaios $d \times d + 1$, isto é, considerando-se o branco.

Fonte	SQ	GL	QM	Estatística
Branco	SQB	1	$QMB = \frac{SQB}{1}$	$\frac{QMB}{QM_{PE}}$
Regressão	SQR	2	$QMR = \frac{SQR}{p-1}$	$\frac{QMR}{QM_{PE}}$
Igualdade do intercepto	SQI	1	$QMI = \frac{SQI}{1}$	$\frac{QMI}{QM_{PE}}$
Resíduos	SQE	$n - 3 - 1$		
Desvio da linearidade	$SQE - SQ_{PE}$	$c - 2$	$QM_{LOF} = \frac{SQE - SQ_{PE}}{c - 2}$	$\frac{QM_{LOF}}{QM_{PE}}$
Erro Puro	SQ_{PE}	$n - c$	$QM_{PE} = \frac{SQE - SQ_{PE}}{n - c}$	
Total	SQT	$n - 1$		

Tabela 5: Tabela da ANOVA - Ensaios $d \times d + 1$.

A seguir se apresenta a Tabela ANOVA para os ensaios $d \times d$, isto é, desconsiderando-se o branco.

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

Fonte	SQ	GL	QM	Estatística
Regressão	SQR	2	$QMR = \frac{SQR}{2}$	$\frac{QMR}{QM_{PE}}$
Igualdade do intercepto	SQI	1	$QMI = \frac{SQI}{1}$	$\frac{QMI}{QME}$
Resíduo	SQE	$n - 4$	$QME = \frac{SQE}{n - 4}$	
Desvio da linearidade	$SQE - SQ_{PE}$	$c - 4$	$QM_{LOF} = \frac{SQE - SQ_{PE}}{c - 4}$	$\frac{QM_{LOF}}{QM_{PE}}$
Erro Puro	SQ_{PE}	$n - c$	$QM_{PE} = \frac{SQE - SQ_{PE}}{n - c}$	
Total	SQT	$n - 1$		

Tabela 6: Tabela da ANOVA - Ensaios $d \times d$.

8.2 Cálculo da potência relativa

Tem-se que o modelo utilizado para o cálculo da potência relativa é

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_{i1} + \beta_2 X_{i2} + \varepsilon_i, \quad i = 1, \dots, n \quad (15)$$

em que

- Y_i : é a variável resposta, que se relaciona com $p = 2$ variáveis explicativas;
- β_0 : é o intercepto do modelo;
- β_1 : é o coeficiente de regressão correspondente a variável explicativa, no caso a Dose;
- X_{i1} : é a variável explicativa Dose;
- β_2 : é o coeficiente de regressão correspondente a interação entre as variáveis explicativas Dose e Preparação;
- X_{i2} : é a variável dummy, referente a interação entre as variáveis explicativas Dose e Preparação;
- ε_i : representa o erro experimental.

O cálculo da potência é dado por:

$$\rho = \frac{\hat{\beta}_1 + \hat{\beta}_2}{\hat{\beta}_1} \quad (16)$$

em que

- ρ : potência relativa;
- $\hat{\beta}_1$: coeficiente de regressão correspondente a variável explicativa Dose;
- $\hat{\beta}_2$: coeficiente de regressão correspondente a interação entre Dose e Preparação.

A determinação do intervalo de confiança para a estimativa da potência relativa é dado pelo Método de Fieller, conforme descrito na seção 6.5.

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

9 Medida descritiva da qualidade de ajuste

Nesta seção apresentam-se o coeficiente de de associação e o coeficiente de correlação de Pearson. Esta medidas medem a qualidade de ajuste do modelo para a estimativa da potência relativa.

9.1 Coeficiente de associação

É uma medida descritiva da qualidade do ajuste obtido, que representa a variabilidade nos dados que é explicada pelo modelo de regressão ajustado. O valor do coeficiente de determinação depende do número de observações (n), tendendo a crescer quando n diminui. Se $n = 2$ tem-se sempre $R^2 = 1$. Para calcular o coeficiente de correlação, se utiliza a expressão dada a seguir

$$R^2 = \frac{SQR}{S_{yy}} = 1 - \frac{SQE}{S_{yy}} = \frac{\hat{\beta}_1 S_{xy}}{S_{yy}} \quad (17)$$

em que:

- $S_{yy} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{ij}^2 - n\bar{Y}^2)$;
- $S_{xy} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (x_{ij}Y_{ij} - n\bar{Y}\bar{x})$;
- R^2 coeficiente de determinação;
- $R = \sqrt{R^2}$ é o coeficiente de correlação.

Vale ressaltar que as fórmulas não estão em notação matricial.

10 Análise dos resíduos

Nesta seção apresentam-se as técnicas estatísticas voltadas à análise de resíduos dos modelos de regressão.

10.1 Resíduos

Nesta subseção apresentam-se os tipos de resíduos.

10.1.1 Resíduos ordinários

Considere o vetor de resíduos ordinários denotado por e :

$$e = Y - \hat{Y} = Y - X\hat{\beta} = Y - HY = (I - H)Y.$$

A matriz de covariâncias dos resíduos é,

$$\begin{aligned} Cov[e] &= Cov[(I - H)Y] = (I - H)Var(Y)(I - H)' \\ &= \sigma^2(I - H)(I - H)' \\ &= \sigma^2(I - H) \end{aligned}$$

no qual $H = X(X'X)^{-1}X'$ é a matriz chapéu (hat) e X a matriz do modelo. Para avaliar a presença de valores extremos (ou outliers), se escalonar os resíduos.

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

10.1.2 Resíduos padronizados

Os resíduos padronizados são dados por

$$r_i = \frac{e_i}{\sqrt{QME(1 - h_{ii})}}, \quad i = 1, 2, \dots, n \quad (18)$$

com $\hat{\sigma}^2 = QME$ e h_{ii} o i -ésimo elemento da diagonal principal da matriz chapéu H .

Os resíduos padronizados têm variâncias constantes $Var(r_i) = 1$ o que consequentemente torna muito prática a procura por outliers, que são observações distantes das demais. Em geral, as observações com resíduo padronizado fora do intervalo $-3 \leq r_i \leq 3$ são considerados valores extremos (outliers).

10.1.3 Resíduos studentizados

Um dos testes mais utilizados para se detectar outlier é o teste da mudança na média. Suponha que a i -ésima resposta é um candidato a outlier. Para todas as outras respostas se assume que $\mathbb{E}[Y | X = x_j] = x'_j\beta$, mas para o i -ésima resposta assume-se que a função média é dada por $\mathbb{E}[Y | X = x_i] = x'_i\beta + \delta$. A resposta esperada para o caso i é modificada pelo parâmetro δ . Assim, pode-se realizar o teste $H_0 : \delta = 0$ versus $H_1 : \delta \neq 0$ para verificar se a i -ésima resposta é um valor extremo (outlier). Assume-se que a variância é constante, isto é, $Var(Y | X) = \sigma^2$.

Resposta com valores altos de resíduos são candidatos a outlier, porém, nem toda observação com resíduo alto é um outlier. Resíduos altos devem ocorrer conforme a distribuição de probabilidade dos dados (normal). Além disso, nem todo outlier é ruim, pois o outlier é detectado em função do modelo ajustado, que pode não ser adequado aos dados. Suponha que a observação i seja suspeita de ser um outlier. Para verificar esta suspeita procede-se da seguinte forma:

1. Retira-se a observação i dos dados, ficando com as $n - 1$ observações restantes;
2. Com os dados reduzidos, estima-se os parâmetros β_0 , β_1 e σ^2 . Denota-se as estimativas por $\beta_{(i)}$ e $\sigma_{(i)}$ para evidenciar que retirou-se a observação i do conjunto de dados. Neste caso, o estimador para $\sigma_{(i)}^2$ tem $n - 1 - p - 1$ graus de liberdade, para o modelo com o intercepto. Se denota por p' o número de linhas da matriz X , obtém-se que $p' = p + 1$ no caso com intercepto. Neste caso, tem-se que $\hat{\sigma}_{(i)}^2$ tem $n - p' - 1$ graus de liberdade.
3. Para os dados sem a observação i , se calcula o valor ajustado $\hat{Y}_{i(i)} = x'_i\beta_{(i)}$. Desde que a i -ésima observação não foi utilizada para estimar os parâmetros $\beta_{(i)}$ conclui-se que Y_i e $\hat{Y}_{i(i)}$ são independentes. Como consequência, obtém-se que

$$Var[Y_i - \hat{Y}_{i(i)}] = \sigma^2 + \sigma^2 x'_i (X'_{(i)} X_{(i)})^{-1} x_i,$$

no qual $X_{(i)}$ é a matriz X sem a linha i . A variância é estimada substituindo-se σ^2 por $\hat{\sigma}_{(i)}^2$ na expressão acima.

4. Sabe-se que $\mathbb{E}[Y_i - \hat{Y}_{i(i)}] = \delta$ que é zero sob H_0 e diferente de zero sob H_1 .

Assumindo distribuição normal para os resíduos, tem-se que sob $H_0 : \delta = 0$, a estatística do teste

$$t_i = \frac{Y_i - \hat{Y}_{i(i)}}{\hat{\sigma} \sqrt{1 + x'_i (X'_{(i)} X_{(i)})^{-1} x_i}},$$

tem distribuição t -Student com $n - p' - 1$ graus de liberdade. Assim, o resíduo studentizado pode ser escrito na forma:

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

$$t_i = r_i \sqrt{\frac{n - p' - 1}{n - p' - r_i^2}},$$

no qual r_i o resíduo padronizado.

10.2 Teste de normalidade

Nesta seção se descreve os testes voltados a avaliação de normalidade dos resíduos.

10.2.1 Teste de Anderson-Darling

O problema é de testar a hipótese de que uma dada amostra tenha sido retirada de uma dada população com função de distribuição acumulada contínua F . Considere $e_1, e_2, \dots, e_N$ os resíduos e suponha que um provável candidato para a FDA¹ dos resíduos seja F , no qual F é a função de distribuição acumulada da normal. Então, o teste de hipóteses para verificar a adequabilidade da distribuição é:

$$\begin{cases} H_0 : \text{a amostra tem distribuição } F(x) \\ H_1 : \text{a amostra não tem distribuição } F(x) \end{cases}$$

De forma genérica, considere $x_1, \dots, x_n$ uma amostra aleatória. Anderson e Darling (1952, 1954) propuseram a seguinte estatística para este teste

$$A^2 = n \int_{-\infty}^{\infty} \frac{[F_n(x) - F(x)]}{F(x)(1 - F(x))} dF(x)$$

no qual F_n é a função de distribuição acumulada empírica definida como

$$F_n(x) = \begin{cases} 0, & \text{se } x < x_{(1)} \\ \frac{k}{n}, & \text{se } x_{(k)} \leq x < x_{(k+1)} \\ 1, & \text{se } x \geq x_{(n)} \end{cases} \quad (7.3.1)$$

para $x_{(1)} \leq x_{(2)} \leq \dots \leq x_{(n)}$, são as estatísticas de ordem da amostra aleatória. A estatística A^2 pode ser escrita numa forma equivalente:

$$A^2 = -n - \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n [(2i-1) \ln(F(x_{(i)})) + (2(n-i)+1) \ln(1 - F(x_{(i)}))]$$

A transformação $F(x_{(i)})$ leva $x_{(i)}$ em $U_{(i)}$ de uma amostra de tamanho n com distribuição uniforme em $(0, 1)$. Logo,

$$A^2 = -n - \frac{1}{n} D$$

em que D é dado por

$$D = \sum_{i=1}^n [(2i-1) \ln(U_{(i)}) + (2(n-i)+1) \ln(1 - U_{(i)})]$$

Para calcular o valor da estatística A^2 procede-se da seguinte forma:

¹Função Distribuição Acumulada

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

- Ordena-se os valores da amostra: $x_{(1)} \leq x_{(2)} \leq \dots \leq x_{(n)}$;
- Quando necessário, estime os parâmetros da distribuição de interesse;
- Calcule $U_i = F(x_{(i)})$ e calcule o valor da estatística de Anderson Darling

$$A^2 = -n - \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n [(2i-1)(\ln(U_{(i)})) + (2(n-i)+1) \ln(1-U_{(i)})]$$

- Para cada uma das distribuições calcule, se for o caso, o valor da estatística modificada de acordo com as tabelas dadas para cada uma delas.

Para uma distribuição com parâmetros conhecidos tem-se os valores da função de distribuição acumulada da estatística A^2 tabulados em Peter and Lewis (1960). O problema surge quando um ou dois dos parâmetros da distribuição precisam ser estimados. Para contornar esse problema Stephens (1974, 1976, 1977) utilizou métodos assintóticos para tabular os valores dessas probabilidades quando os parâmetros das distribuições são desconhecidos.

Para a distribuição Normal com função densidade de probabilidade

$$f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma^2} \exp\left(-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}\right) \quad (-\infty < x, < \infty).$$

a seguinte tabela fornece alguns valores de quantis e a estatística de Anderson Darling modificada, dada por

$$A_m^2 = \left(1 + \frac{0,75}{n} + \frac{2,25}{n^2}\right) A^2.$$

Caso 1: O parâmetro $\theta(\mu, \sigma^2)$ é totalmente conhecido.

Caso 2: μ é conhecido e σ^2 é estimado por s^2 .

Caso 3: σ^2 é conhecido e μ é estimado por $\bar{X}$.

Caso 4: Nenhum dos componentes de $\theta = (\mu, \sigma^2)$ é conhecido e são estimados por $(\bar{X}, s^2)$.

Caso	Modificação	P-Valor				
		15%	10%	5%	2,5%	1%
Caso 0	-	1,61	1,933	2,492	3,07	3,857
Caso 1	-	0,784	0,897	1,088	1,281	1,541
Caso 2	-	1,443	1,761	2,315	2,89	3,682
Caso 3	$A^2(1 + (0,75/n) + (2,25/n^2))$	0,56	0,632	0,751	0,87	1,029

Tabela 7: Valores críticos para o teste de Anderson-Darling.

Nesse caso o p-valor exato é obtido por interpolação dos valores tabelados. Então se $p\text{-valor} > 0,05$ não rejeita-se a hipótese nula e concluiu-se que os resíduos possuem distribuição normal. Caso $p\text{-valor} \leq 0,05$ se rejeita a hipóteses nula e concluiu-se que os resíduos não possuem distribuição normal.

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

10.2.2 Teste de Shapiro-Wilk

O teste Shapiro-Wilk, proposto em 1965, é baseado na estatística W dada por:

$$W = \frac{b^2}{\sum_{i=1}^n (x_{(i)} - \bar{x})^2}$$

em que x_i são os valores da amostra ordenada ($x_{(1)}$ é o menor valor). A constante b é determinada da seguinte forma

$$b = \begin{cases} \sum_{i=1}^{n/2} a_{n-i+1} \times (x_{(n-i+1)} - x_{(i)}) & \text{se } n \text{ é par} \\ \sum_{i=1}^{(n+1)/2} a_{n-i+1} \times (x_{(n-i+1)} - x_{(i)}) & \text{se } n \text{ é ímpar} \end{cases}$$

em que a_{n-i+1} são constantes geradas pelas médias, variâncias e covariâncias das estatísticas de ordem de uma amostra de tamanho n de uma distribuição Normal.

Para aplicar-se o teste de Shapiro-Wilk, segue-se os passos:

1. Formulação da hipótese:

$$\begin{cases} H_0 : \text{os resíduos tem distribuição} \\ H_1 : \text{os resíduos não tem distribuição} \end{cases}$$

2. Estabelecer o nível de significância do teste (α);

3. Calcular a estatística de teste:

- Ordenar as n observações da amostra: $x_{(1)}, x_{(2)}, x_{(3)}, \dots, x_{(n)}$;
- Calcular $\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$;
- Calcular b ;
- Calcular W .

4. Tomar a decisão: rejeitar H_0 ao nível de significância α se $W_{\text{calculado}} < W_{\alpha}$

Os valores críticos da estatística W de Shapiro-Wilk são dados na Tabela a seguir.

N	0,01	0,02	0,05	0,1	0,5	0,9	0,95	0,98	0,99
3	0,753	0,756	0,767	0,789	0,959	0,998	0,999	1	1
4	0,687	0,707	0,748	0,792	0,935	0,987	0,992	0,996	0,997
5	0,686	0,715	0,762	0,806	0,927	0,979	0,986	0,991	0,993
6	0,713	0,743	0,788	0,826	0,927	0,974	0,981	0,986	0,989
7	0,73	0,76	0,803	0,838	0,928	0,972	0,979	0,985	0,988
8	0,749	0,778	0,818	0,851	0,932	0,972	0,978	0,984	0,987
9	0,764	0,791	0,829	0,859	0,935	0,972	0,978	0,984	0,986
10	0,781	0,806	0,842	0,869	0,938	0,972	0,978	0,983	0,986
11	0,792	0,817	0,85	0,876	0,94	0,973	0,979	0,984	0,986
12	0,805	0,828	0,859	0,883	0,943	0,973	0,979	0,984	0,986

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão:
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	01 de Setembro de 2023
		Doseamento Biológico	

13	0,814	0,837	0,866	0,889	0,945	0,974	0,979	0,984	0,986
14	0,825	0,846	0,874	0,895	0,947	0,975	0,98	0,984	0,986
15	0,835	0,855	0,881	0,901	0,95	0,975	0,98	0,984	0,987
16	0,844	0,863	0,887	0,906	0,952	0,976	0,981	0,985	0,987
17	0,851	0,869	0,892	0,91	0,954	0,977	0,981	0,985	0,987
18	0,858	0,874	0,897	0,914	0,956	0,978	0,982	0,986	0,988
19	0,863	0,879	0,901	0,917	0,957	0,978	0,982	0,986	0,988
20	0,868	0,884	0,905	0,92	0,959	0,979	0,983	0,986	0,988
21	0,873	0,888	0,908	0,923	0,96	0,98	0,983	0,987	0,989
22	0,878	0,892	0,911	0,926	0,961	0,98	0,984	0,987	0,989
23	0,881	0,895	0,914	0,928	0,962	0,981	0,984	0,987	0,989
24	0,884	0,898	0,916	0,93	0,963	0,981	0,984	0,987	0,989
25	0,888	0,901	0,918	0,931	0,964	0,981	0,985	0,988	0,989
26	0,891	0,904	0,92	0,933	0,965	0,982	0,985	0,988	0,989
27	0,894	0,906	0,923	0,935	0,965	0,982	0,985	0,988	0,99
28	0,896	0,908	0,924	0,936	0,966	0,982	0,985	0,988	0,99
29	0,898	0,91	0,926	0,937	0,966	0,982	0,985	0,988	0,99
30	0,9	0,912	0,927	0,939	0,967	0,983	0,985	0,988	0,99
31	0,902	0,914	0,929	0,94	0,967	0,983	0,986	0,988	0,99
32	0,904	0,915	0,93	0,941	0,968	0,983	0,986	0,988	0,99
33	0,906	0,917	0,931	0,942	0,968	0,983	0,986	0,989	0,99
34	0,908	0,919	0,933	0,943	0,969	0,983	0,986	0,989	0,99
35	0,91	0,92	0,934	0,944	0,969	0,984	0,986	0,989	0,99
36	0,912	0,922	0,935	0,945	0,97	0,984	0,986	0,989	0,99
37	0,914	0,924	0,936	0,946	0,97	0,984	0,987	0,989	0,99
38	0,916	0,925	0,938	0,947	0,971	0,984	0,987	0,989	0,99
39	0,917	0,927	0,939	0,948	0,971	0,984	0,987	0,989	0,991
40	0,919	0,928	0,94	0,949	0,972	0,985	0,987	0,989	0,991
41	0,92	0,929	0,941	0,95	0,972	0,985	0,987	0,989	0,991
42	0,922	0,93	0,942	0,951	0,972	0,985	0,987	0,989	0,991
43	0,923	0,932	0,943	0,951	0,973	0,985	0,987	0,99	0,991
44	0,924	0,933	0,944	0,952	0,973	0,985	0,987	0,99	0,991
45	0,926	0,934	0,945	0,953	0,973	0,985	0,988	0,99	0,991
46	0,927	0,935	0,945	0,953	0,974	0,985	0,988	0,99	0,991
47	0,928	0,936	0,946	0,954	0,974	0,985	0,988	0,99	0,991
48	0,929	0,937	0,947	0,954	0,974	0,985	0,988	0,99	0,991
49	0,929	0,938	0,947	0,955	0,974	0,985	0,988	0,99	0,991
50	0,93	0,939	0,947	0,955	0,974	0,985	0,988	0,99	0,991

10.2.3 Teste de Kolmogorov-Smirnov

O teste de Kolmogorov-Smirnov pode ser utilizado para avaliar as hipóteses:

$$\begin{cases} H_0 : \text{a amostra tem distribuição normal} \\ H_1 : \text{a amostra não tem distribuição normal} \end{cases}$$

Este teste observa a máxima diferença absoluta entre a função de distribuição acumulada assumida para os dados, no caso a Normal, e a função de distribuição empírica dos dados. Como critério, compara-se esta diferença com um valor crítico, para um dado nível de significância.

Considere uma amostra aleatória simples $X_1, X_2, \dots, X_n$ de uma população com função de distribuição acumulada contínua F_X desconhecida. A estatística utilizada para o teste é:

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

$$D_n = \sup_x |F(x) - F_n(x)|$$

Esta função corresponde a distância máxima vertical entre os gráficos de $F(x)$ e $F_n(x)$ sobre a amplitude dos possíveis valores de x . Em D_n temos que

- $F(x)$ representa a função de distribuição acumulada assumida para os dados;
- $F_n(x)$ representa a função de distribuição acumulada empírica dos dados.

Neste caso, deseja-se testar a hipótese $F_X = F$ contra a hipótese alternativa $F_X \neq F$. Para isto, toma-se $X_{(1)}, X_{(2)}, \dots, X_{(n)}$ as observações aleatórias ordenadas de forma crescente da população com função de distribuição contínua F_X . No caso de análise da normalidade dos dados, assume-se F a função de distribuição da normal.

A função de distribuição acumulada assumida para os dados é definida por $F(x_{(i)}) = \mathbb{P}(X \leq x_{(i)})$ e a função de distribuição acumulada empírica é definida por uma função escada, dada pela fórmula:

$$F_n(x) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n I_{\{(-\infty, x]\}}(x_{(i)})$$

onde I_A é a função indicadora. A função indicadora é definida da seguinte forma:

$$I_A = \begin{cases} 1; & \text{se } x \in A \\ 0; & \text{caso contrário} \end{cases}$$

Observe que a função da distribuição empírica $F_n(x)$ corresponde à proporção de valores menores ou iguais a x . Tal função também pode ser escrita da seguinte forma

$$F_n(x) = \begin{cases} 0, & \text{se } x < x_{(1)} \\ \frac{k}{n}, & \text{se } x_{(k)} \leq x < x_{(k+1)} \\ 1, & \text{se } x > x_{(n)} \end{cases} \quad (12)$$

Sob H_0 , a distribuição assintótica da estatística de Kolmogorov-Smirnov é dada por

$$\lim_{n \rightarrow \infty} P[\sqrt{n}D_n \leq x] = 1 - 2 \sum_{j=1}^{\infty} (-1)^{j-1} \exp(-2j^2 x^2).$$

Esta distribuição assintótica é válida quando se tem conhecimento completo sobre a distribuição de H_0 , entretanto, na prática, H_0 especifica uma família de distribuições de probabilidade. Neste caso, a distribuição assintótica da estatística de Kolmogorov-Smirnov não conhecida e foi determinada via simulação.

Como a função de distribuição empírica F_n é descontínua e a função de distribuição hipotética é contínua, considera-se duas outras estatísticas:

$$D^+ = \sup_{x_{(i)}} |F(x_{(i)}) - F_n(x_{(i)})|$$

$$D^- = \sup_{x_{(i)}} |F(x_{(i)}) - F_n(x_{(i-1)})|$$

para se calcular a estatística de Kolmogorov-Smirnov. Essas estatísticas medem as distâncias (vertical) entre os gráficos das duas funções, teórica e empírica, nos pontos $x_{(i-1)}$ e $x_{(i)}$. Com isso, pode-se utilizar como estatística de teste

$$D_n = \max(D^+, D^-)$$

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

Se D_n é maior que o valor crítico, se rejeita a hipótese de normalidade dos dados com $(1 - \alpha)100\%$ de confiança. Caso contrário, não rejeita-se a hipótese de normalidade. A Tabela de valores críticos para a estatística do teste de Kolmogorov-Smirnov (D_n) é dada a seguir.

n	0,2	0,1	0,05	0,01
5	0,45	0,51	0,56	0,67
10	0,32	0,37	0,41	0,49
15	0,27	0,3	0,34	0,4
20	0,23	0,26	0,29	0,36
25	0,21	0,24	0,27	0,32
30	0,19	0,22	0,24	0,29
35	0,18	0,2	0,23	0,27
40	0,17	0,19	0,21	0,25
45	0,16	0,18	0,2	0,24
50	0,15	0,17	0,19	0,23
Valores maiores	$\frac{1,07}{\sqrt{n}}$	$\frac{1,22}{\sqrt{n}}$	$\frac{1,36}{\sqrt{n}}$	$\frac{1,63}{\sqrt{n}}$

Tabela 9: Valores críticos para Kolmogorov-Smirnov.

10.2.4 Teste de Ryan-Joiner

O teste de Ryan-Joiner é utilizado para testar se os dados provêm de uma população com distribuição normal. É similar ao teste de Shapiro-Wilk, pois também se baseia na relação linear entre a estatística de ordem da distribuição normal de uma amostra de tamanho n e a amostra da população em estudo após ser ordenada.

Suponha que $\mathbf{X} = X_1, X_2, \dots, X_n$ represente o vetor contendo uma amostra de tamanho n da população de interesse. Denotando por $\mathbf{Y} = Y_1, Y_2, \dots, Y_n$ o vetor ordenado de forma crescente dos elementos de $\mathbf{X}$, ou seja, $Y_1 = \min(\mathbf{X})$ e $Y_n = \max(\mathbf{X})$ e analogamente para os termos intermediários, por fim, seja $\mathbf{Z} = Z_1, Z_2, \dots, Z_n$ um vetor contendo os valores dos quantis teóricos de uma distribuição $N(0, 1)$, dado por:

$$Z_i = \Phi^{-1} \left(\frac{i - 3/8}{n + 1/4} \right), i = 1, 2, \dots, n$$

em que $\left(\frac{i - 3/8}{n + 1/4} \right)$ é conhecido como posição de plotagem.

O teste de Ryan-Joiner se resume em estudar o gráfico normal de probabilidade entre $\mathbf{Z}$ e $\mathbf{Y}$ através do método de regressão linear. Caso a amostra $\mathbf{X}$ provenha de uma população normal espera-se que $\mathbf{Z}$ e $\mathbf{Y}$ tenha, de fato, uma relação linear. A ideia central do teste está em estudar o quão significativa é essa relação, para isso Ryan-Joiner propôs a estatística de teste baseada no coeficiente de correlação amostral de Pearson, dada por

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y}) (Z_i - \bar{Z})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (Z_i - \bar{Z})^2}}$$

O teste de Ryan-Joiner rejeita a hipótese de normalidade dos dados se $r \leq c_\alpha$ onde c_α é o valor crítico do teste. Porém, sob H_0 , a distribuição de r depende de n , ou seja, para tamanhos de amostras diferentes tem-se distribuições diferentes e consequentemente valores críticos distintos.

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

Por sua vez, o p -valor é calculado como $p\text{-valor} = \mathbf{P}[r < r_{obs} | H_0]$, porém, como mencionado a distribuição de r , sob H_0 , depende do tamanho da amostra, portanto necessita-se de apoio computacional para o cálculo do p -valor e c_α .

De maneira prática, o teste de Ryan-Joiner é realizado pelos seguintes passos:

- Fixar as hipóteses:

$$\begin{cases} H_0 : \text{A amostra provém de população com distribuição normal} \\ H_1 : \text{A amostra não provém de população com distribuição normal} \end{cases}$$

- Definir o tamanho da amostra n ;
- Ordenar a amostra $x_1, x_2, \dots, x_n$ em $y_1, y_2, \dots, y_n$;
- Calcular os quantis $z_1, z_2, \dots, z_n$;

$$\bullet \text{ Calcular } r = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y}) (Z_i - \bar{Z})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (Z_i - \bar{Z})^2}};$$

- Fixar o nível de significância α ;
- Calcular c_α ;
- Se $r \leq c_\alpha$, a um nível de significância α , rejeitar H_0 , caso contrário, não rejeitar H_0 .

10.3 Testes de homoscedasticidade

Homoscedasticidade é o termo utilizado para designar variância constante dos erros ε_{ij} para observações diferentes. Caso a suposição de homoscedasticidade não seja válida, pode-se listar alguns efeitos no ajuste do modelo:

- Os erros padrões dos estimadores, obtidos pelo método dos mínimos quadrados, são incorretos e portanto a inferência estatística não é válida;
- Não se pode mais afirmar que os estimadores de mínimos quadrados são os melhores estimadores de mínima variância para β , embora ainda possam ser não viciados.

10.3.1 Gráfico: Resíduos X Valores Ajustados

O gráfico dos resíduos versus valores ajustados (valores preditos) é uma das principais técnicas utilizadas para verificar as suposições dos resíduos. Para o diagnóstico de heteroscedasticidade, se visa encontrar algum comportamento atípico no gráfico, como o efeito “funil”, a variabilidade dos resíduos aumenta conforme aumenta o valor ajustado. A presença de “funil” é um indicativo da presença de heteroscedasticidade.

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

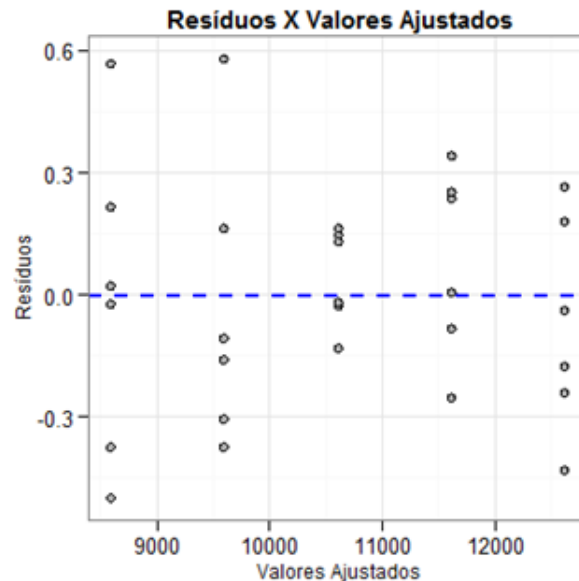


Figura 1: Gráfico dos Resíduos X Valores Ajustados para detectar heteroscedasticidade.

10.3.2 Teste de Brown-Forsythe

O teste de Brown-Forsythe é utilizado para o teste de igualdade de variâncias, que também pode ser utilizado para testar a homoscedasticidade dos resíduos no caso de uma variável explicativa. As hipóteses são dadas por

$$\begin{cases} H_0 : \sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2 = \dots = \sigma_k^2 \\ H_1 : \text{Pelo menos um } \sigma_i^2 \text{ é diferente. } i = 1, \dots, k. \end{cases}$$

Para definir a estatística do teste, seja $x_{ij} = \mu_i + \varepsilon_{ij}$, em que x_{ij} é a j -ésima observação no i -ésimo grupo, μ_i representa a media de cada grupo i e são desconhecidas e desiguais. Assume-se que ε_{ij} são independentes e identicamente distribuídos com média zero e variância possivelmente desiguais. Para cada grupo se toma a mediana $\tilde{x}_i$ e a variância amostral s_i^2 e define-se os desvios absolutos por $z_{ij} = |x_{ij} - \tilde{x}_i|$. O cálculo da estatística é dada pela equação 19

$$F_{BF} = \frac{\sum_{i=1}^k \frac{n_i(\bar{z}_{i.} - \bar{z}_{..})^2}{(k-1)}}{\frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (z_{ij} - \bar{z}_{i.})^2}{\sum_{i=1}^k (n_i - 1)}} \sim F_{(k-1, n-1)} \quad (19)$$

em que

- k = número de grupos da amostra;
- n_i = tamanho da amostra por grupo $i, i = 1, \dots, k$;

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

$$\begin{aligned} \bullet \bar{z}_{i.} &= \sum_{j=1}^k \frac{z_{ij}}{n_i}; \\ \bullet \bar{z}_{..} &= \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} z_{ij}}{\sum_{i=1}^k n_i}. \end{aligned}$$

Calcula-se o p-valor por:

$$\text{P-valor} = \mathbb{P} \left[F_{(k-1, \sum_{i=1}^k (n_i-1))} > F_{BF} \right]$$

Então, se $\text{P-valor} > 0,05$ não rejeita-se a hipótese nula e conclui-se que os resíduos são homoscedásticos. Caso $\text{P-valor} \leq 0,05$ se rejeita a hipótese nula e conclui-se que pelo menos um grupo possui variância significativamente diferente dos outros grupos.

10.3.3 Teste de Cochran

O teste de Cochran é o teste de igualdade de variância sugerido pela ANVISA.

- O teste consiste inicialmente em determinar a maior variância para todos os níveis.
- Após isso, divide-se a maior variância pela soma de todas as variâncias e compara-se com o valor crítico do teste.
- As hipóteses do teste são dadas por:

$$\begin{cases} H_0 : \sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2 = \dots = \sigma_k^2 \\ H_1 : \text{Pelo menos um } \sigma_i^2 \text{ é diferente. } i = 1, \dots, k. \end{cases}$$

- A estatística do teste é dada pela equação 20

$$C = \frac{s_{max}^2}{\sum_{i=1}^k s_i^2} = \frac{\text{maior variância}}{\text{soma de todas as variâncias}} \quad (20)$$

Os valores críticos para a estatística de Cochran são tabelados e podem ser calculados por

$$C_L(\alpha, k, n) = \left[1 + \frac{n-1}{F_{\left(\frac{\alpha}{n}; ((n-1)*(k-1), n-1)\right)}} \right]^{-1}$$

e o p-valor é calculado por

$$\text{P-valor} = \mathbb{P} \left[\frac{\frac{1}{C} - 1}{n-1} > F_{((n-1)*(k-1), n-1)} \right] * k$$

em que:

- k = número de grupos da amostra
- $n = n_i$ = tamanho da amostra por grupo $i, i = 1, \dots, k$

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

Portanto se $p\text{-valor} > 0,05$ não rejeita-se a hipótese nula e conclui-se que os dados são homoscedásticos. Caso $p\text{-valor} \leq 0,05$ rejeita-se a hipótese nula e concluiu-se que pelo menos um grupo possui variância significativamente diferente dos outros grupos.

10.3.4 Teste de Breusch-Pagan

Baseado no teste multiplicador de Lagrange, o teste de Breusch-Pagan é bastante utilizado para testar a hipótese nula de que as variâncias dos erros são iguais (homoscedasticidade) versus a hipótese alternativa de que as variâncias dos erros são uma função multiplicativa de uma ou mais variáveis, sendo que esta(s) variável(eis) pode(m) pertencer ou não ao modelo em questão. É indicado para grandes amostras e quando a suposição de normalidade nos erros é assumida.

Para o cálculo da estatística do teste, tem-se que a partir dos resíduos $e = (e_1, \dots, e_n)$ e dos valores ajustados $\hat{y} = (\hat{y}_1, \dots, \hat{y}_n)$, considera-se os resíduos ao quadrado e os padroniza-se de modo que a média do vetor de resíduos padronizados, denotada por u , seja 1. Esta padronização é feita dividindo cada resíduo ao quadrado pela SQE/n em que SQE é a soma de quadrados dos resíduos do modelo ajustado e n é o número de observações. Desta forma, tem-se que cada resíduo padronizado é dado por

$$u_i = \frac{e_i^2}{SQE/n}, \quad i = 1, \dots, n,$$

$$\text{em que } SQE = \sum_{i=1}^n e_i^2.$$

Por fim, se faz a regressão entre $u = (u_1, \dots, u_n)$ (variável resposta) e o vetor $\hat{y}$ (variável explicativa) e obtém-se a estatística do teste χ_{BP}^2 calculando a Soma de Quadrados da Regressão de u sobre $\hat{y}$ e dividindo o valor encontrado por 2. A estatística usada no teste é a χ_{BP}^2 studentizada que é dada por

$$\chi_{BP}^2 \text{ studentizada} = \frac{\chi_{BP}^2}{\lambda},$$

$$\text{em que } \lambda = \frac{\text{Var}(\varepsilon^2)}{2 \text{Var}(\varepsilon)^2}.$$

Sob a hipótese nula, esta estatística tem distribuição qui-quadrada com 1 grau de liberdade. Resumidamente, se não existe heteroscedasticidade, é de se esperar que os resíduos ao quadrado não aumentem ou diminuam com o aumento do valor predito, $\hat{y}$ e assim, a estatística de teste deveria ser insignificante.

Desta forma, calcula-se o P-valor do teste e conclui-se que:

- se $P\text{-valor} = \mathbb{P} \left[\chi_{(1)}^2 > \chi_{BP}^2 \right] > 0,05$ não rejeita-se a hipótese nula e conclui-se que os resíduos são homoscedásticos.
- se $P\text{-valor} = \mathbb{P} \left[\chi_{(1)}^2 > \chi_{BP}^2 \right] \leq 0,05$ rejeita-se a hipótese nula e conclui-se que os resíduos são heteroscedásticos.

10.3.5 Teste de Goldfeld-Quandt

O teste de Goldfeld-Quandt também é utilizado para testar a homoscedasticidade dos resíduos. Entre as limitações deste teste está a exigência de que a amostra seja relativamente grande.

O teste consiste inicialmente em ordenar as observações de acordo com a variável explicativa que se acredita a responsável pela heteroscedasticidade. Após isso, divide-se a amostra ordenada em 3 partes de tal forma que a parte do meio tenha aproximadamente 20% dos dados e que as partes 1 e 3 tenham quantidade de dados semelhantes. Então, ajusta-se um modelo de regressão com os dados da parte 1 (contendo os menores valores da variável explicativa

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

utilizada na ordenação) e outro modelo de regressão com os dados da parte 3 (contendo os maiores valores da variável explicativa utilizada na ordenação). Por fim, testa-se a hipótese de que as variâncias dos erros em ambas regressões são iguais contra a hipótese de que a variância dos erros na parte 3 é maior do que a variância dos erros na parte 1, utilizando o teste F.

A estatística de teste neste caso é dada por

$$F_{GQ} = \frac{SQE^b / (n_3 - (p + 1))}{SQE^a / (n_1 - (p + 1))},$$

em que SQE^a e SQE^b são as somas de quadrados dos resíduos da regressão para o grupo inferior (parte 1) e para o grupo superior (parte 3), respectivamente, n_1 é o número de observações da parte 1 e n_3 é o número de observações da parte 3. Denota-se d o número de observações omitidas (parte 2). Essa estatística tem distribuição $F_{(n_3-(p+1), n_1-(p+1))}$. Desta forma, considerando um nível de significância $\alpha = 0,05$, rejeita-se a hipótese nula, ou seja, a hipótese de que as variâncias são iguais se $F_{GQ} > F_{(\alpha)}$. Pode-se também tomar decisão avaliando o P-valor do teste:

- se $P\text{-valor} = \mathbb{P}[F_{(n_3-(p+1), n_1-(p+1))} > F_{GQ}] > 0,05$ não rejeita-se a hipótese nula e conclui-se que os resíduos são homoscedásticos.
- se $P\text{-valor} = \mathbb{P}[F_{(n_3-(p+1), n_1-(p+1))} > F_{GQ}] \leq 0,05$ rejeita-se a hipótese nula e conclui-se que os resíduos são heterocedásticos.

10.4 Testes de independência

Para verificar se os resíduos são independentes, pode-se utilizar técnicas gráficas e testes. A seguir, tem-se o diagnóstico de independência por meio da análise visual gráfica e teste estatístico.

10.4.1 Gráfico: Resíduos Padronizados X Ordem de Coleta

Se no gráfico de Resíduos Padronizados X Ordem de Coleta se observa que existe uma tendência dos pontos, tem-se indícios de dependência dos resíduos.

10.4.2 Teste de Durbin-Watson

O teste de Durbin-Watson possui as seguintes características:

- é utilizado para detectar a presença de auto correlação (dependência) nos resíduos de uma análise de regressão;
- o teste é baseado na suposição de que os erros no modelo de regressão são gerados por um processo autorregressivo de primeira ordem, de acordo com $\varepsilon_i = \rho_{i-1} + a_i$ em que ε_i é o termo do erro do modelo na i -ésima observação;
- $a_i \stackrel{i.i.d.}{\sim} \mathbb{N}(0, \sigma_a^2)$
- $\rho(|\rho| < 1)$ é o parâmetro de autocorrelação.
- Testa-se a presença de autocorrelação por meio das hipóteses

$$\begin{cases} H_0 : \rho = 0 \\ H_1 : \rho \neq 0 \end{cases}$$

GRUPO ESTAT CAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

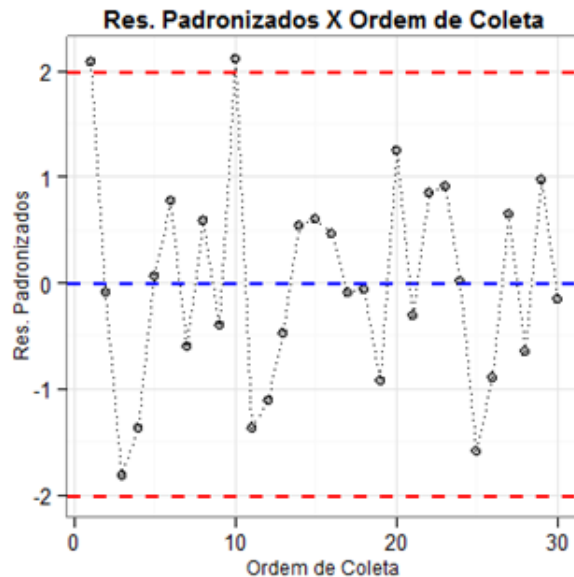


Figura 2: Gráfico dos Resíduos Padronizados X Ordem de Coleta para detectar independência.

- A estatística do teste de Durbin-Watson é dada pela equação 21

$$d_w = \frac{\sum_{i=2}^n (e_i - e_{i-1})^2}{\sum_{i=1}^n e_i^2} \quad (21)$$

A distribuição de d_w depende da matriz X . Entretanto, pode-se tomar a decisão comparando o valor de d_w com os valores críticos d_L e d_U da Tabela de Durbin-Watson 10.

Utiliza-se os seguintes critérios:

- se $0 \leq d_w < d_L$ então rejeita-se H_0 (dependência);
- se $d_L \leq d_w \leq d_U$ então o teste é inconclusivo;
- se $d_U \leq d_w < 4 - d_U$ então não rejeita-se H_0 (independência);
- se $4 - d_U \leq d_w \leq 4 - d_L$ então o teste é inconclusivo;
- se $4 - d_L < d_w < 4$ então rejeita-se H_0 (dependência).

Quando $0 \leq d_w < d_L$ tem-se evidência de uma correlação positiva. Já se $4 - d_L < d_w < 4$, a correlação é negativa. No caso em que não rejeita-se H_0 tem-se que não existe autocorrelação, ou seja, os resíduos são independentes.

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

Número de variáveis explicativas											
n	α	1		2		3		4		5	
		d_L	d_U	d_L	d_U	d_L	d_U	d_L	d_U	d_L	d_U
<15	0,01	0,81	1,07	0,7	1,25	0,59	1,46	0,49	1,7	0,39	1,96
	0,025	0,95	1,23	0,83	1,4	0,71	1,61	0,59	1,84	0,48	2,09
15	0,05	1,08	1,36	0,95	1,54	0,82	1,75	0,69	1,97	0,56	2,21
	0,01	0,95	1,15	0,86	1,27	0,77	1,41	0,63	1,57	0,6	1,74
20	0,025	1,08	1,28	0,99	1,41	0,89	1,55	0,79	1,7	0,7	1,87
	0,05	1,2	1,41	1,1	1,54	1	1,68	0,9	1,83	0,79	1,99
25	0,01	1,05	1,21	0,98	1,3	0,9	1,41	0,83	1,52	0,75	1,65
	0,025	1,13	1,34	1,1	1,43	1,02	1,54	0,94	1,65	0,86	1,77
30	0,05	1,2	1,45	1,21	1,55	1,12	1,66	1,04	1,77	0,95	1,89
	0,01	1,13	1,26	1,07	1,34	1,01	1,42	0,94	1,51	0,88	1,61
40	0,025	1,25	1,38	1,18	1,46	1,12	1,54	1,05	1,63	0,98	1,73
	0,05	1,35	1,49	1,28	1,57	1,21	1,65	1,14	1,74	1,07	1,83
50	0,01	1,25	1,34	1,2	1,4	1,15	1,46	1,1	1,52	1,05	1,58
	0,025	1,35	1,45	1,3	1,51	1,25	1,57	1,2	1,63	1,15	1,69
	0,05	1,44	1,54	1,39	1,6	1,34	1,66	1,29	1,72	1,23	1,79
	0,01	1,32	1,4	1,28	1,45	1,24	1,49	1,2	1,54	1,16	1,59
	0,025	1,42	1,5	1,38	1,54	1,34	1,59	1,3	1,64	1,26	1,69
	0,05	1,5	1,59	1,46	1,63	1,42	1,67	1,38	1,72	1,34	1,7

Tabela 10: Tabela de Durbin-Watson.

Pode-se também tomar a decisão pelo p-valor. Nesse caso, o Action Stat calcula o p-valor por duas formas diferentes, dependendo o tamanho da amostra.

- Se o tamanho da amostra for maior do que 100, uma aproximação para a distribuição normal é realizada e o p-valor é calculado. Para maiores informações consulte [16], [17] e [18].
- Se o tamanho da amostra for menor do que 100, o p-valor é calculado utilizando um algoritmo conhecido por 'pan' ou 'gradsol'. Mais informações consulte [19], [20] e [23].

Portanto, se $P\text{-valor} > 0,05$ não rejeita-se a hipótese nula e conclui-se que os dados são independentes. Caso $P\text{-valor} \leq 0,05$ rejeita-se a hipótese nula e conclui-se que existe uma correlação serial entre os resíduos.

11 Teste de Equivalência

As análises de bioassay, segundo as farmacopeias brasileira e europeia, contemplam os testes de paralelismo e não-linearidade como requisitos para a validade do ensaio. No entanto, muitas vezes, a alta precisão do método pode ocasionar um baixo erro residual, o que torna mais provável a rejeição da hipótese nula de não-linearidade ou paralelismo no teste F da ANOVA.

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

11.1 Teste de Equivalência para o Coeficiente do Termo Quadrático

Um dos requisitos para a validade do ensaio, segundo a farmacopeia brasileira, é a avaliação da significância do termo quadrático. A seguir, mostram-se os passos para a implementação do teste de equivalência.

- **Passo 1:** O modelo de regressão com a inclusão do termo quadrático é ajustado da seguinte forma:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_{i1} + \beta_2 X_{i2} + \beta_3 X_{i3} + \beta_4 X_{i4} + \varepsilon_i, \quad i = 1, \dots, n \quad (22)$$

em que:

- Y_i : é a variável resposta, que se relaciona com $p = 4$ variáveis explicativas;
 - β_0 : é o intercepto do modelo;
 - β_1 : é o coeficiente de regressão correspondente a variável explicativa Preparação;
 - X_{i1} : é a variável dummy (0 para padrão, 1 para teste), referente a Preparação;
 - β_2 : é o coeficiente de regressão correspondente a variável explicativa. Nesse caso aplica-se o logaritmo na dose, em que as possíveis transformações são $\log_{10}(\text{dose})$ e $\ln(\text{dose})$;
 - X_{i2} : é a variável explicativa $\log_{10}(\text{dose})$ ou $\ln(\text{dose})$;
 - β_3 : é o coeficiente de regressão correspondente a interação;
 - X_{i3} : é a interação entre a variável dummy e a variável explicativa;
 - β_4 : é o coeficiente de regressão correspondente ao termo quadrático;
 - X_{i4} : é o termo quadrático $(\text{Log}(\text{Dose}))^2$;
 - ε_i : representa o erro experimental.
- **Passo 2:** Especificar um intervalo de valores aceitáveis, ou intervalo de tolerância.
O grande desafio ao implementar o teste de equivalência é determinar os limites para a não-linearidade. Uma forma de fazê-lo é compilando os dados históricos e usando esses dados para criar um intervalo de tolerância para a medida de não-linearidade.
 - **Passo 3:** Verificar se o intervalo de confiança para o coeficiente de termo quadrático se encontra dentro do intervalo de tolerância determinado.
O termo quadrático será considerado desprezível se o intervalo de confiança de 90% para o coeficiente de termo quadrático estiver contido dentro do intervalo de tolerância.

Para calcular o intervalo de confiança de 90% para o coeficiente de termo quadrático, calcula-se primeiro o erro padrão para o $\hat{\beta}_5$. Para isso, multiplica-se $\hat{\sigma}^2$ por elemento de $\hat{\beta}_5$ no $(X^T X)^{-1}$ e aplicar o resultado por raiz quadrado onde

$$\hat{\sigma}^2 = QME = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2}{n - 4 - 1}$$

Então, um intervalo de confiança de 90% para o β_5 é dado por

$$\left(\hat{\beta}_5 - t_{(0,05,n-4-1)} * \text{ep}(\hat{\beta}_5), \hat{\beta}_5 + t_{(0,95,n-4-1)} * \text{ep}(\hat{\beta}_5) \right).$$

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

11.2 Teste de Equivalência para o Paralelismo

O teste de equivalência, sugerido pela USP [4], surge como uma alternativa para avaliar a não-linearidade e paralelismo. A seguir, mostram-se os passos para a implementação do teste de equivalência.

- **Passo 1:** Escolher uma medida de não similaridade.

O paralelismo pode ser avaliado considerando a razão de inclinações. O modelo de regressão pode ser ajustado da seguinte forma:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_{i1} + \beta_2 X_{i2} + \beta_3 X_{i3} + \varepsilon_i, \quad i = 1, \dots, n \quad (23)$$

em que:

- Y_i : é a variável resposta, que se relaciona com $p = 3$ variáveis explicativas;
- β_0 : é o intercepto do modelo;
- β_1 : é o coeficiente de regressão correspondente a variável explicativa Preparação;
- X_{i1} : é a variável dummy (0 para padrão, 1 para teste), referente a Preparação;
- β_2 : é o coeficiente de regressão correspondente a variável explicativa. Nesse caso aplica-se o logaritmo na dose, em que as possíveis transformações são $\log_{10}(\text{dose})$ e $\ln(\text{dose})$;
- X_{i2} : é a variável explicativa $\log_{10}(\text{dose})$ ou $\ln(\text{dose})$;
- β_3 : é o coeficiente de regressão correspondente a interação;
- X_{i3} : é a interação entre a variável dummy e a variável explicativa;
- ε_i : representa o erro experimental.

A medida de não similaridade é a razão entre os coeficientes angulares das preparações de teste e padrão $\frac{\beta_{\text{Teste}}}{\beta_{\text{Padrão}}} = \frac{\beta_2 + \beta_3}{\beta_2}$. O intervalo para a razão é obtido pelo método de Fieller.

- **Passo 2:** Especificar um intervalo de valores aceitáveis, ou intervalo de tolerância.

O grande desafio ao implementar o teste de equivalência é determinar os limites para a não-similaridade. Uma forma de fazê-lo é compilando os dados históricos e usando esses dados para criar um intervalo de tolerância para a medida de não-paralelismo e depois, determinar seu afastamento máximo do paralelismo perfeito.

- **Passo 3:** Verificar se o intervalo de confiança para a razão se encontra dentro do intervalo de tolerância determinado.

Será considerado “suficientemente paralelo” se o intervalo de confiança de 90% para a razão das inclinações estiver contido dentro do intervalo de tolerância.

12 Aplicação

Esta seção é dedicada a validação dos cálculos das técnicas estatísticas para a validação dos ensaios de doseamento.

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

12.1 Aplicação 1 - Paralelismo 3×3

Inicia-se a aplicação para doseamento, para isto, toma-se o seguinte produto:

Data:	Produto / Matéria-prima:	Lote:
21/05/19	Gingilone Pomada (Neomicina)	B19E0715
Especificação do teor:	3,38 (3,042 a 4,563) mg/g ou 100,0 (90,0 a 135,0)	
Potência do padrão:	732,81 µg/mg	Númeror do lote do padrão 213222018
Condições de incubação:	30°C por 16 a 20 horas	

Figura 3: Produto para validação do doseamento 3×3 .

A partir da coleta de dados obtêm-se:

Doses	16	20	25	16	20	25
$\log_{10}(\text{Doses})$	1,20	1,30	1,40	1,20	1,30	1,40
Placas	p1	p2	p3	a1	a2	a3
1	16,39	18,00	19,35	16,36	18,66	19,50
2	16,28	18,11	19,66	16,47	17,87	19,72
3	16,85	17,71	18,99	16,89	17,94	19,00
4	16,36	18,09	19,84	16,31	18,06	20,00
5	16,04	17,66	19,89	16,39	17,92	19,38
6	16,49	18,14	19,59	16,62	18,46	19,30

Tabela 11: Leituras do diâmetro (mm) dos halos de inibição.

Defina-se o modelo matricial para validade de ensaio:

$$\mathbf{Y} = \begin{bmatrix} 16,39 \\ 16,28 \\ \vdots \\ 18,00 \\ 18,11 \\ \vdots \\ 19,35 \\ 19,66 \\ \vdots \\ 16,36 \\ 16,47 \\ \vdots \\ 18,66 \\ 17,87 \\ \vdots \\ 19,50 \\ 19,72 \end{bmatrix}; \quad \mathbf{X} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 1,20 & 0 & 1,45 & 0 \\ 1 & 0 & 1,20 & 0 & 1,45 & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & 0 & 1,30 & 0 & 1,69 & 0 \\ 1 & 0 & 1,30 & 0 & 1,69 & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & 0 & 1,40 & 0 & 1,95 & 0 \\ 1 & 0 & 1,40 & 0 & 1,95 & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & 1 & 1,20 & 1,20 & 1,45 & 1,45 \\ 1 & 1 & 1,20 & 1,20 & 1,45 & 1,45 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & 1 & 1,30 & 1,30 & 1,69 & 1,69 \\ 1 & 1 & 1,30 & 1,30 & 1,69 & 1,69 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & 1 & 1,40 & 1,40 & 1,95 & 1,95 \\ 1 & 1 & 1,40 & 1,40 & 1,95 & 1,95 \end{bmatrix}$$

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

Então, tem-se

$$X^T X = \begin{bmatrix} 36,00000 & 18,00000 & 46,83708 & 23,41854 & 61,16184 & 30,58092 \\ 18,00000 & 18,00000 & 23,41854 & 23,41854 & 30,58092 & 30,58092 \\ 46,83708 & 23,41854 & 61,16184 & 30,58092 & 80,15989 & 40,07994 \\ 23,41854 & 23,41854 & 30,58092 & 30,58092 & 40,07994 & 40,07994 \\ 61,16184 & 30,58092 & 80,15989 & 40,07994 & 105,43711 & 52,71856 \\ 30,58092 & 30,58092 & 40,07994 & 40,07994 & 52,71856 & 52,71856 \end{bmatrix},$$

$$(X^T X)^{-1} = \begin{bmatrix} 8076,204 & -8076,204 & -12449,469 & 12449,469 & 4780,030 & -4780,030 \\ -8076,204 & 16152,408 & 12449,469 & -24898,939 & -4780,030 & 9560,060 \\ -12449,469 & 12449,469 & 19199,980 & -19199,980 & -7375,351 & 7375,351 \\ 12449,469 & -24898,939 & -19199,980 & 38399,959 & 7375,351 & -14750,702 \\ 4780,030 & -4780,030 & -7375,351 & 7375,351 & 2834,428 & -2834,428 \\ -4780,030 & 9560,060 & 7375,351 & -14750,702 & -2834,428 & 5668,856 \end{bmatrix},$$

$$X^T y = \begin{bmatrix} 648,2900 \\ 324,8500 \\ 847,0081 \\ 424,3704 \\ 1110,6731 \\ 556,3985 \end{bmatrix}$$

e de $\hat{\beta} = (X'X)^{-1} X'Y$ encontra-se

$$\hat{\beta} = \begin{bmatrix} 1,451943 \\ -31,518051 \\ 9,103305 \\ 49,661269 \\ 2,750699 \\ -19,432361 \end{bmatrix}$$

$$SQE = \sum_{i=1}^n e_i^2 = \sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2 = 2,5244500$$

$$QME = \frac{SQE}{36 - 5 - 1} = \frac{2,5244500}{30} = 0,0841483$$

Para testar o hipótese de

$$\begin{cases} H_0 : \beta_2 = 0 \\ H_1 : \beta_2 \neq 0 \end{cases}$$

Calcula-se a soma de quadrados extra

$$\begin{aligned} SQR(\beta_2|\beta_1) &= SQE(\beta_1) - SQE(\beta_1, \beta_2) \\ &= 59,00594 - 2,671235 \\ &= 56,3347 \end{aligned}$$

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

Então, a estatística sob H_0 é dada por:

$$F_0 = SQR(\beta_2|\beta_1)QME^{-1} = \frac{56,3347}{0,0841483} = 669,4693$$

Desta forma, tem-se que $\mathbb{P}(F_0 > F_{1,30})$ desprezível. Portanto, ao nível de significância de 5%, rejeita-se a hipóteses nula, ou seja, conclui-se que a regressão é significativa. Analogamente, testa-se os outros coeficientes de regressão. Abaixo encontram-se os resultados:

	g.l.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Est. F	P-valor)
Preparação	1	0,0552250	0,0552250	0,6562816	0,4242555
Regressão	1	56,3347042	56,3347042	669,4690428	< 2e-16
Paralelismo	1	0,0459375	0,0459375	0,5459110	0,4657351
Quadrático	1	0,0342347	0,0342347	0,4068378	0,5284177
Diferença de quadráticos	1	0,0666125	0,0666125	0,7916081	0,3806938
Resíduos	30	2,5244500	0,0841483		

Tabela 12: Tabela ANOVA.

Utilizando o Action Stat obtêm-se:

Tabela da Anova

—

	G.L. ⬆	Soma dos quadrados ⬆	Quadrados médios ⬆	Estat. F ⬆	P-valor ⬆
Preparações	1	0.055	0.055	0.656	0.424
Regressão	1	56.335	56.335	669.469	0
Paralelismo	1	0.046	0.046	0.546	0.466
Quadrático	1	0.034	0.034	0.407	0.528
Diferença de quadráticos	1	0.067	0.067	0.792	0.381
Resíduos	30	2.524	0.084		

GRUPO ESTAT CAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

Agora, defina-se o modelo matricial para modelo utilizado no cálculo de potência relativa.

$$\mathbf{Y} = \begin{bmatrix} 16,39 \\ 16,28 \\ \vdots \\ 18,00 \\ 18,11 \\ \vdots \\ 19,35 \\ 19,66 \\ \vdots \\ 16,36 \\ 16,47 \\ \vdots \\ 18,66 \\ 17,87 \\ \vdots \\ 19,50 \\ 19,72 \end{bmatrix}; \quad \mathbf{X} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 1,20 \\ 1 & 0 & 1,20 \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & 0 & 1,30 \\ 1 & 0 & 1,30 \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & 0 & 1,40 \\ 1 & 0 & 1,40 \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & 1 & 1,20 \\ 1 & 1 & 1,20 \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & 1 & 1,30 \\ 1 & 1 & 1,30 \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & 1 & 1,40 \\ 1 & 1 & 1,40 \end{bmatrix}$$

• Estimativa dos parâmetros:

Inicialmente, encontram-se as estimativas para os parâmetros do modelo.

$$\mathbf{X}^T \mathbf{X} = \begin{bmatrix} 36,00000 & 18,00000 & 46,83708 \\ 18,00000 & 18,00000 & 23,41854 \\ 46,83708 & 23,41854 & 61,16184 \end{bmatrix},$$

$$(\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1} = \begin{bmatrix} 7,565316 & -0,055556 & -5,772165 \\ -0,055556 & 0,111111 & 0 \\ -5,772165 & 0 & 4,436612 \end{bmatrix},$$

$$\mathbf{X}^T \mathbf{y} = \begin{bmatrix} 648,2900 \\ 324,8500 \\ 847,0081 \end{bmatrix}$$

e de $\hat{\beta} = (\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}'\mathbf{Y}$ encontra-se

$$\hat{\beta} = \begin{bmatrix} -2,59954 \\ 0,07833 \\ 15,80934 \end{bmatrix}$$

Assim, o modelo ajustado é dado por:

$$\text{Diâmetro} = -2,59954 + 0,07833 * \text{Preparação} + 15,80934 * \log_{10}(\text{dose})$$

• Somas de quadrados

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

$$\begin{aligned}
- SQT &= y'y - \frac{\left(\sum_{i=1}^{36} y_i\right)^2}{36} = 11733,5 - \frac{(648,29)^2}{36} = 59,06116 \\
- SQR &= SQR_{x_1} + SQR_{x_2} = 0,055225 + 56,334704 = 56,38993 \\
- SQE &= SQT - SQR = 59,06116 - 56,38993 = 2,6712335 \\
- \hat{\sigma}^2 &= QME = \frac{SQE}{n - 2 - 1} = \frac{2,671235}{33} = 0,080947
\end{aligned}$$

- **Coefficiente de associação e correlação:** O coeficiente de associação R^2 é calculado por:

$$R^2 = 1 - \frac{SQE}{SQT} = 1 - \frac{2,6712335}{59,06116} = 0,95477$$

Dessa forma, o coeficiente de correlação seria:

$$R = \sqrt{R^2} = 0,97712$$

Utilizando o Action Stat constatam-se os seguintes resultados:

Resumo descritivo por fator

Preparação	Log10Dose	Mínimo	Média	Máximo	Desvio Padrão	CV (%)	Amplitude	Tamanho
Padrão	1.204	16.04	16.402	16.85	0.267	1.628	0.81	6
Padrão	1.301	17.66	17.952	18.14	0.212	1.183	0.48	6
Padrão	1.398	18.99	19.553	19.89	0.337	1.722	0.9	6
Teste	1.204	16.31	16.507	16.89	0.217	1.313	0.58	6
Teste	1.301	17.87	18.152	18.66	0.329	1.81	0.79	6
Teste	1.398	19	19.483	20	0.347	1.78	1	6

Qualidade do Ajuste

Desvio padrão dos resíduos	G.L.	R	R² ajustado
0.285	33	0.977	0.952

Coefficientes

	Estimativa	Erro padrão	Estat. t	P-valor
Intercepto	-2.6	0.783	-3.322	0.002
PreparaçãoTeste	0.078	0.095	0.826	0.415
Log10Dose	15.809	0.599	26.381	0

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

Cálculo da potência relativa:

$$M = \log_{10} \rho = \frac{\hat{\beta}_1}{\hat{\beta}_2} = \frac{15,80934}{0,07833} = 0,004955$$

Aplicando o *antilog* em M , encontra-se:

$$\text{Potência relativa} = \text{antilog } M = 10^{0,004955} = 1,011474$$

$$1,011474 \cdot 100\% = 101,1474\%$$

Utilizando o Action Stat constatam-se os seguintes resultados:

Estimativa da Potência			
	Estimativa	Limite inferior 2,5%	Limite superior 97,5%
Razão de betas (Log10)	0.005	-0.007	0.017
Potência relativa (%)	101.147	98.342	104.048

Para este exemplo, adota-se o teste de Shapiro-Wilk, para isto, considere os resíduos e_i para $i = 1, \dots, 36$ da Tabela 13:

i	$n - i + 1$	a_{n-i+1}	x_{n-i+1}	$x_{(i)}$	$a_{n-i+1}(x_{n-i+1} - x_{(i)})$
1	36	0,4068	0,61277778	-0,57930556	0,484939503
2	35	0,2813	0,42069444	-0,51097222	0,262077831
3	34	0,2415	0,41319444	-0,39680556	0,195615
4	33	0,2121	0,41277778	-0,30888889	0,153065501
5	32	0,1883	0,38902778	-0,27930556	0,125847168
6	31	0,1678	0,37486111	-0,25888889	0,10634325
7	30	0,1496	0,33902778	-0,20513889	0,081407334
8	29	0,1331	0,17111111	-0,19930556	0,049302459
9	28	0,1179	0,15902778	-0,17722222	0,039643875
10	27	0,1036	0,14111111	-0,15680556	0,030864167
11	26	0,090	0,14069444	-0,15513889	0,026625
12	25	0,0770	0,12111111	-0,15097222	0,020950416
13	24	0,0645	0,10486111	-0,12722222	0,014969375
14	23	0,0523	0,08902778	-0,12513889	0,011200917
15	22	0,0404	0,05319444	-0,10722222	0,006480833
16	21	0,0287	0,03111111	-0,07930556	0,003168958
17	20	0,0172	0,01277778	-0,07680556	0,001540833
18	19	0,0057	-0,04513889	-0,04680556	9,50002E-06
SW					0,97776

Tabela 13: Dados para cálculo da estatística de Shapiro-Wilk.

A partir da Tabela 13, tem-se que $SW > W_\alpha = 0,935$. Portanto não rejeita-se H_0 , isto é, não se rejeita a hipótese de normalidade dos erros experimentais ao nível de significância de 5%.

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

• Diagnóstico de Homoscedasticidade

A seguir apresenta-se o teste de Breusch-Pagan para avaliar a homoscedasticidade. As hipóteses de interesse são

$$\begin{cases} H_0 : \sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \dots = \sigma_k^2 \\ H_1 : \text{pelo menos um dos } \sigma_i^2 \text{'s diferente} \end{cases}$$

Os resíduos padronizados u_i são dados por:

$$u_i = \frac{e_i^2}{SQE/n}, \quad i = 1, \dots, n.$$

Na Tabela 14 apresentam-se os resíduos padronizados u_i e os valores ajustados.

N.Observação	u_i	Valores ajustados
1	0,029524684	16,44
2	0,331370117	16,44
3	2,300908756	16,44
4	0,079501573	16,44
5	2,122002726	16,44
6	0,038134934	16,44
7	0,013044321	17,97
8	0,268356966	17,97
9	0,903269347	17,97
10	0,197678040	17,97
11	1,285863955	17,97
12	0,394590725	17,97
13	0,307174065	19,50
14	0,340828913	19,50
15	3,518722615	19,50
16	1,549034233	19,50
17	2,039631329	19,50
18	0,106817280	19,50
19	0,324363369	16,52
20	0,027459472	16,52
21	1,893787413	16,52
22	0,567134996	16,52
23	0,211044986	16,52
24	0,148190158	16,52
25	5,060535364	18,05
26	0,423279081	18,05
27	0,154938753	18,05
28	0,002200397	18,05
29	0,218130505	18,05
30	2,296270607	18,05
31	0,084761313	19,58
32	0,266774520	19,58
33	4,522783887	19,58
34	2,385195621	19,58

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

N.Observação	u_i	Valores ajustados
35	0,535339463	19,58
36	1,051355517	19,58

Tabela 14: Dados para análise de regressão.

Para testar as hipóteses, com os valores obtidos na Tabela 14, realiza-se uma análise de regressão com u como a variável resposta e o valor ajustado como covariável de entrada. A estatística do teste de Breusch-Pagan é dada pela soma de quadrados da regressão dividido por 2. A seguir, calculam-se as quantidades necessárias para se determinar a estatística do teste.

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n x_i^2 - n\bar{x}^2 = 56,38993$$

e

$$S_{xy} = \sum_{i=1}^n x_i Y_i - n\bar{x}\bar{Y} = 13,39979$$

A estimativa do parâmetro β_1 é dada por

$$\hat{\beta}_1 = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} = \frac{13,39979}{56,38993} = 0,2376274$$

Logo, a soma de quadrado da regressão é dada por

$$SQ_{Reg} = \hat{\beta}_1 S_{xy} = 0,2376274 \times 13,39979 = 3,184159$$

Assim,

$$\chi_{BP}^2 = \frac{SQ_{Reg}}{2} = \frac{3,184159}{2} = 1,592079$$

$$\lambda = \frac{\text{Var}(\varepsilon^2)}{2 \text{Var}(\varepsilon)^2} = \frac{0,008968763}{2 \cdot 0,005505783} = 0,8144857$$

$$\chi_{BP \text{ studentizada}}^2 = \frac{\chi_{BP}^2}{\lambda} = \frac{1,592079}{0,8144857} = 1,954705$$

$$P\text{-valor} = \mathbb{P}(\chi_{BP \text{ studentizada}}^2 \geq 1,954705) = 0,1620807$$

no qual $\chi_{BP \text{ studentizada}}^2$ é a distribuição qui-quadrado com 1 grau de liberdade.

Portanto, utilizando um nível de significância de 5%, não rejeita-se a hipótese de homogeneidade.

• Diagnóstico de Independência:

Para calcular a estatística do teste de Durbin-Watson utiliza-se a Tabela 15:

Observação	e_i	e_i^2	$(e_i - e_{i-1})^2$
------------	-------	---------	---------------------

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

1	-0,04680556	0,0021907600	-
2	-0,15680556	0,0245879823	0,0121000000
3	0,41319444	0,1707296489	0,3249000000
4	-0,07680556	0,0058990934	0,2401000000
5	-0,39680556	0,1574546489	0,1024000000
6	0,05319444	0,0028296489	0,2025000000
7	0,03111111	0,0009679012	0,0004876736
8	0,14111111	0,0199123457	0,0121000000
9	-0,25888889	0,0670234568	0,1600000000
10	0,12111111	0,0146679012	0,1444000000
11	-0,30888889	0,0954123457	0,1849000000
12	0,17111111	0,0292790123	0,2304000000
13	-0,15097222	0,0227926119	0,1037376736
14	0,15902778	0,0252898341	0,0961000000
15	-0,51097222	0,2610926119	0,4489000000
16	0,33902778	0,1149398341	0,7225000000
17	0,38902778	0,1513426119	0,0025000000
18	0,08902778	0,0079259452	0,0900000000
19	-0,15513889	0,0240680748	0,0596173611
20	-0,04513889	0,0020375193	0,0121000000
21	0,37486111	0,1405208526	0,1764000000
22	-0,20513889	0,0420819637	0,3364000000
23	-0,12513889	0,0156597415	0,0064000000
24	0,10486111	0,0109958526	0,0529000000
25	0,61277778	0,3754966049	0,2579793403
26	-0,17722222	0,0314077160	0,6241000000
27	-0,10722222	0,0114966049	0,0049000000
28	0,01277778	0,0001632716	0,0144000000
29	-0,12722222	0,0161854938	0,0196000000
30	0,41277778	0,1703854938	0,2916000000
31	-0,07930556	0,0062893711	0,2421460069
32	0,14069444	0,0197949267	0,0484000000
33	-0,57930556	0,3355949267	0,5184000000
34	0,42069444	0,1769838156	1,0000000000
35	-0,19930556	0,0397227045	0,3844000000
36	-0,27930556	0,0780115934	0,0064000000
Soma		2,671235	7,134168

Tabela 15: Dados para o cálculo da estatística do teste de Durbin-Watson.

Então,

$$d_w = \frac{\sum_{i=2}^n (e_i - e_{i-1})^2}{\sum_{i=1}^n e_i^2} = \frac{7,134168}{2,6712347} = 2,671$$

A partir da Tabela de Durbin-Watson, 10, tem-se que $d_U = 1,18 < d_w < 4 - d_U = 2,76$, logo não rejeita-se H_0 . Portanto não rejeita-se a hipótese de independência das observações.

Utilizando o Action Stat constatam-se os seguintes resultados:

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

📊 Teste de normalidade

—

	Estatística	P-valor
Shapiro-Wilk	0.978	0.669

📊 Teste de Homocedasticidade

—

	Estatística	GL	P-valor
Breusch-Pagan	1.955	1	0.162

📊 Teste de Independência

—

	Estatística	P-valor
Durbin-Watson	2.671	0.078

12.2 Aplicação 2 - Paralelismo 4×4 com fator de correção

Para validar o função referente ao fator de correção do modelo de paralelismo toma-se o exemplo da Farmacopeia Europeia [3] 5.1.3, no qual tem-se um ensaio 4×4 . A seguir apresentam-se os dados utilizados na aplicação.

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

Preparação	Dose	ln(Dose)	Resposta	Potência	Dissolução
Padrão	0,296296304	-1,2163953	252	670	0,668
Padrão	0,296296304	-1,2163953	249	670	0,668
Padrão	0,296296304	-1,2163953	247	670	0,668
Padrão	0,296296304	-1,2163953	250	670	0,668
Padrão	0,296296304	-1,2163953	235	670	0,668
Padrão	0,444444452	-0,8109302	207	670	0,668
Padrão	0,444444452	-0,8109302	201	670	0,668
Padrão	0,444444452	-0,8109302	193	670	0,668
Padrão	0,444444452	-0,8109302	207	670	0,668
Padrão	0,444444452	-0,8109302	207	670	0,668
Padrão	0,666666672	-0,4054651	168	670	0,668
Padrão	0,666666672	-0,4054651	187	670	0,668
Padrão	0,666666672	-0,4054651	162	670	0,668
Padrão	0,666666672	-0,4054651	155	670	0,668
Padrão	0,666666672	-0,4054651	140	670	0,668
Padrão	1	0,0000000	113	670	0,668
Padrão	1	0,0000000	107	670	0,668
Padrão	1	0,0000000	111	670	0,668
Padrão	1	0,0000000	108	670	0,668
Padrão	1	0,0000000	98	670	0,668
Amostra	0,296296304	-1,2163953	242	20000	0,025
Amostra	0,296296304	-1,2163953	236	20000	0,025
Amostra	0,296296304	-1,2163953	246	20000	0,025
Amostra	0,296296304	-1,2163953	231	20000	0,025
Amostra	0,296296304	-1,2163953	232	20000	0,025
Amostra	0,444444452	-0,8109302	206	20000	0,025
Amostra	0,444444452	-0,8109302	197	20000	0,025
Amostra	0,444444452	-0,8109302	197	20000	0,025
Amostra	0,444444452	-0,8109302	191	20000	0,025
Amostra	0,444444452	-0,8109302	186	20000	0,025
Amostra	0,666666672	-0,4054651	146	20000	0,025
Amostra	0,666666672	-0,4054651	153	20000	0,025
Amostra	0,666666672	-0,4054651	148	20000	0,025
Amostra	0,666666672	-0,4054651	159	20000	0,025
Amostra	0,666666672	-0,4054651	146	20000	0,025
Amostra	1	0,0000000	115	20000	0,025
Amostra	1	0,0000000	102	20000	0,025
Amostra	1	0,0000000	104	20000	0,025
Amostra	1	0,0000000	106	20000	0,025
Amostra	1	0,0000000	95	20000	0,025

Tabela 16: Dados para a aplicação.

Para esse exemplo se considera:

- **Potência atribuída** Pot_{at} : potência da preparação do padrão é dada por 670 UI/mg ;
- **Potência assumida** Pot_{as} : potência assumida para preparação do teste é dada por 20000 UI/vial
- Sol_{est_p} solução estoque padrão;

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

- Sol_{est_a} solução estoque amostra.

Conforme dado na Farmacopeia Europeia, tem-se que a solução estoque para o padrão é dada por:

$$Sol_{est_p} = \frac{16,7 \text{ mg}}{25 \text{ mL}} = 0,668 \text{ mg/mL}$$

E tem-se que a solução estoque para amostra é dada por:

$$Sol_{est_a} = \frac{1 \text{ vial}}{40 \text{ mL}} = 0,025 \text{ vial/mL}$$

As demonstrações dos cálculos referentes as estimativas do modelo de retas paralelas são dadas na primeira aplicação 12.1, desta forma como os cálculos foram validados anteriormente, apresenta-se apenas a validação referente ao fator de correção.

O fator de correção é dado por:

$$f_c = \frac{Pot_{at} \times Sol_{est_p}}{Pot_{as} \times Sol_{est_a}} = \frac{670 \text{ UI/mg} \times 0,668 \text{ mg/mL}}{20000 \text{ UI/vial} \times 0,025 \text{ vial/mL}} = \frac{670 \times 0,668 \text{ UI/mL}}{20000 \times 0,025 \text{ UI/mL}} = 0,89512$$

Tem-se que a estimativa da potência relativa é dada por:

$$antilog(M) = 1,074072$$

Logo, a potência é dada por:

$$Pot = \frac{1,074072}{100} \times 0,89512 \times 20000 = 19228,47 \text{ UI/vial}$$

A seguir, apresentam-se os resultados obtidos pelo Action Stat.

Resumo descritivo por fator								
Preparação	LnDose	Mínimo	Média	Máximo	Desvio padrão	CV (%)	Amplitude	Tamanho
Padrão	-1.216	235	246.6	252	6.731	2.729	17	5
Padrão	-0.811	193	203	207	6.164	3.037	14	5
Padrão	-0.405	140	162.4	187	17.271	10.635	47	5
Padrão	0	98	107.4	113	5.771	5.373	15	5
Amostra	-1.216	231	237.4	246	6.465	2.723	15	5
Amostra	-0.811	186	195.4	206	7.503	3.84	20	5
Amostra	-0.405	146	150.4	159	5.595	3.72	13	5
Amostra	0	95	104.4	115	7.232	6.927	20	5

Figura 4: Análise descritiva.

GRUPO ESTAT CAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

Teste de Falta de Ajuste

—

	G.L.	Soma dos quadrados	Quadrados médios	Estat. F	P-valor
Preparações	1	632.025	632.025	8.475	0.007
Regressão	1	101745.605	101745.605	1364.339	0
Paralelismo	1	25.205	25.205	0.338	0.565
Resíduos	36	2645.54	73.487		
Não linearidade	4	259.14	64.785	0.869	0.493
Erro puro	32	2386.4	74.575		

Coeficientes

—

	Estimativa	Erro padrão	Estat. t	P-valor
Intercepto	112.185	2.619	42.841	0
PreparaçãoAmostra	-7.95	2.687	-2.959	0.005
LnDose	-111.255	2.963	-37.544	0

Qualidade do Ajuste

—

Desvio padrão dos resíduos	G.L.	R	R² ajustado
8.496	37	0.987	0.973

Figura 5: Estimativas do modelo para a potência.

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

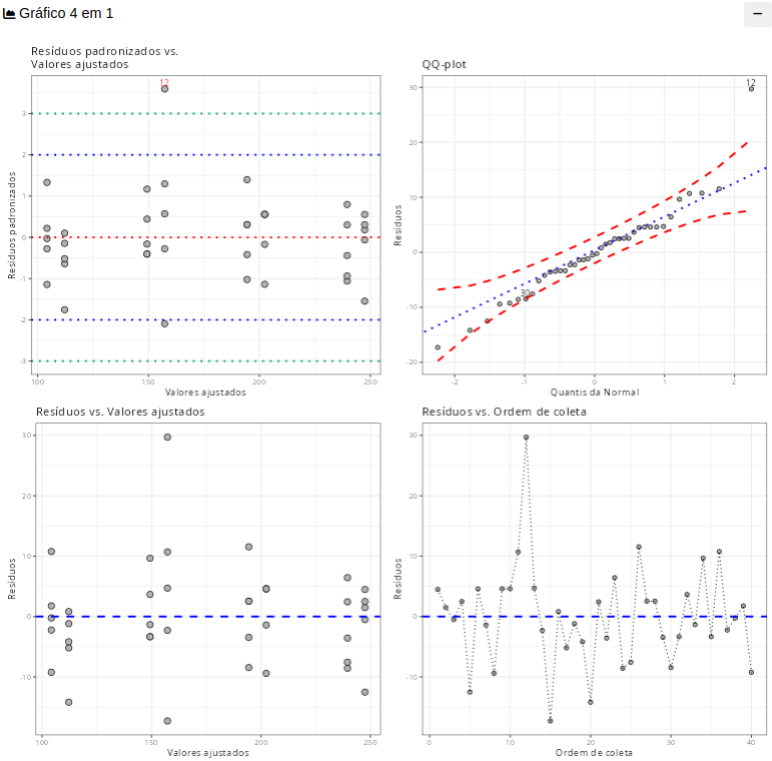


Figura 6: Gráfico 4 em 1 dos resíduos.

Teste de normalidade				
	Estadística		P-valor	
Shapiro-Wilk	0.938		0.031	
Teste de Homocedasticidade				
	Estadística	G.L.	P-valor	
Breusch-Pagan	0.291	1	0.589	
Teste de Independência				
	Estadística		P-valor	
Durbin-Watson	1.743		0.253	

Figura 7: Testes de normalidade, homocedasticidade e independência.

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

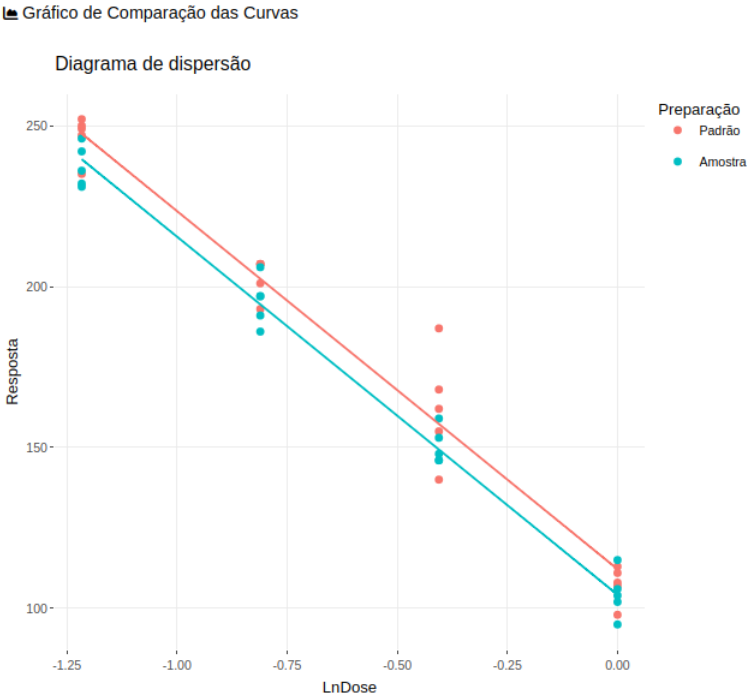


Figura 8: Gráfico de dispersão.

Estimativa da Potência

	Estimativa	Limite inferior 2,5%	Limite superior 97,5%
Razão de betas (Ln)	0.071	0.023	0.121
Potência relativa (%)	107.407	102.277	112.842
Potência UI/mL	19228.475	18309.994	20201.462

Figura 9: Estimativa da potência.

12.3 Aplicação 3 - Teste de equivalência para avaliação de desvio de linearidade

Considere os seguintes dados:

GRUPO ESTAT CAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão:
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	01 de Setembro de 2023
		Doseamento Biológico	

Doses	0,010017	0,015026	0,020034	0,025043	0,009716	0,014573	0,019431	0,024289
$\log_{10}(\text{Doses})$	-1,999262	-1,823157	-1,698232	-1,601314	-2,012512	-1,836451	-1,711505	-1,614590
Replicas	p1	p2	p3	p4	a1	a2	a3	a4
1	0,29	0,221	0,18	0,148	0,282	0,206	0,167	0,137
2	0,283	0,222	0,177	0,144	0,279	0,211	0,166	0,137

Tabela 17: Leituras do diâmetro (mm) dos halos de inibição.

Usando procedimento de metodo de minimos quadrados, obtém-se as estimativas para coeficientes do modelo de validade de ensaio

$$\hat{\beta} = [-0,19916770 \ 0,43529063 \ -0,10578773 \ 0,50489202 \ 0,06858361 \ 0,14066277]^T$$

e a soma de quadrados de resíduos

$$SQE = \sum_{i=1}^n e_i^2 = \sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2 = 0,000056$$

$$QME = \frac{SQE}{16 - 5 - 1} = \frac{0,000056}{10} = 0,000006$$

Deseja-se testar se o termo quadrático é desprezível com seguinte hipótese:

$$\begin{cases} H_0 : \beta_5 = 0 \\ H_1 : \beta_5 \neq 0 \end{cases}$$

A estatística sob H_0 é dada por $F_0 = \frac{SQR(\beta_5|\beta_R)}{QME} = \frac{0,000093}{0,000006} = 16,605110$. Observe que, neste caso, o quadrado médio dos resíduos é pequeno, o que pode ser atribuído à alta precisão ou baixo erro no experimento. Portanto, tem-se que $\mathbb{P}(F_0 > F_{1,10}) = 0,002232$, ao nível de significância de 5%, rejeita-se a hipóteses nula, ou seja, conclui-se que há evidência para desvio de linearidade.

Utilizando o Action Stat obtém-se:

Tabela da Anova

	G.L.	Soma dos quadrados	Quadrados médios	Estat. F	P-valor
Preparações	1	0	0	71.304	0
Regressão	1	0.045	0.045	8066.759	0
Paralelismo	1	0	0	1.084	0.322
Quadrático	1	0	0	16.605	0.002
Diferença de quadráticos	1	0	0	4.257	0.066
Resíduos	10	0	0		

Para verificar a relevância da magnitude de curvatura expressa pelo termo quadrático, segue-se em aplicar o teste de equivalência. O modelo ajustado é dado por

$$\hat{Y} = 0,028196598 - 0,022885403 * \text{Preparação} + 0,147989585 \log_{10} \text{Doses} \\ - 0,004604875 * \text{interação} + 0,138904350 * (\log_{10} \text{Doses})^2$$

GRUPO ESTAT CAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

Calcula-se o intervalo de confiança de 90% para o coeficiente de termo quadrático da seguinte maneira:

$$SQE = \sum_{i=1}^n e_i^2 = \sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2 = 0,000080$$

$$\hat{\sigma}^2 = QME = \frac{SQE}{16 - 4 - 1} = \frac{0,000080}{11} = 7,270775e - 06$$

$$(X^T X)^{-1} = \begin{bmatrix} 2183,353708 & 14,141301 & 2426,92934 & 7,706542 & 669,707218 \\ 14,141301 & 36,797396 & 25,84960 & 20,446520 & 9,948568 \\ 2426,929343 & 25,849600 & 2703,29191 & 14,176667 & 747,507392 \\ 7,706542 & 20,446520 & 14,17667 & 11,439032 & 5,492892 \\ 669,707218 & 9,948568 & 747,50739 & 5,492892 & 207,131476 \end{bmatrix},$$

Fazendo multiplicação de $\hat{\sigma}^2$ por elemento de $\hat{\beta}_5$ no $(X^T X)^{-1}$ e aplica raiz quadrado, obtém-se o erro padrão para o $\hat{\beta}_5$:

$$\sqrt{7,270775e - 06 * 207,131476} = \sqrt{0,001506006} = 0,0388073$$

Então, um intervalo de confiança de 90% para o β_5 é

$$\left(\hat{\beta}_5 - t_{(0,05,11)} * \text{ep}(\hat{\beta}_5), \hat{\beta}_5 + t_{(0,95,11)} * \text{ep}(\hat{\beta}_5) \right)$$

$$(0,138904350 - 1,795885 * 0,0388073, 0,138904350 + 1,795885 * 0,0388073)$$

$$(0,06921091, 0,20859779)$$

Como o intervalo está contido no intervalo de equivalência (-0,5;0,5), conclui-se que o coeficiente do termo quadrático é desprezível (zero). Utilizando o Action Stat constatam-se os seguintes resultados:

Ensaio Paralelismo

Potência relativa (%) = 110

Limites de Confiança = (107,2 ; 112,9) ; Limites de Especificação = (90 ; 110)

Intervalo de confiança de 90% para o coeficiente quadrático (0.07; 0.21)

Intervalo de equivalência (-0.5; 0.5)

12.4 Aplicação 4 - Interpolação 5×1

Para validar o doseamento em ensaios 5×1 , toma-se o exemplo 7 da farmacopeia brasileira (2010) [2]. O ensaio é referente a um antibiótico usando placas de Petri. Neste caso, doseamento microbiológico de Benzilpenicilina benzatina pó para injetável. A potência suposta é de $S_A = 600.000 \text{ UI/frasco}$. Os dados estão na tabela a seguir.

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão:
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	01 de Setembro de 2023
		Doseamento Biológico	

Doses UI/mL		0,15	0,3	0,6	1,2	2,4	0,6
$\log_{10}$ Doses		-0,823908741	-0,522878745	-0,22184875	0,079181246	0,380211242	-0,823908741
Placas		p1	p2	p3	p4	p5	ponto da amostra
Ponto	Réplica	PADRÃO REFERENCIA (P3)			AMOSTRA/PADRÃO		
		ZONA 1	ZONA 3	ZONA 5	ZONA 2	ZONA 4	ZONA 6
P1	1	19,88	19,85	19,75	13,87	12,86	12,88
P1	2	20,6	20,07	20,3	12,95	13,24	13,39
P1	3	20,43	20,06	20,3	13,08	13,08	13,31
P2	1	19,54	18,49	19,96	16,24	15,34	16,26
P2	2	19,85	19,06	19,7	16,35	15,98	16,7
P2	3	19,86	19,2	19,95	16,88	15,5	16,7
P4	1	19,21	19,68	19,81	23,47	23,04	23,99
P4	2	18,97	19,14	19,72	23,04	22,65	23,85
P4	3	19,39	19,65	19,55	23,19	23,01	23,82
P5	1	19,32	19,65	19,25	27,41	27,5	27,3
P5	2	19,61	19,27	19,53	27,62	27,41	27,49
P5	3	19,72	20,04	19,9	26,67	26,53	27,27
AMOSTRA	1	19,78	18,73	18,57	19,66	19,57	18,69
AMOSTRA	2	19,45	19,12	18,89	19,49	18,91	19,04
AMOSTRA	3	19,5	19,7	19,12	19,94	19,02	19,28

Tabela 18: Leituras do diâmetro (mm) dos halos de inibição

Inicialmente tem-se a Tabela do modelo:

Dose	$X = \log_{10} \text{Dose}$	$Y = \text{Diâmetro}$	X^2	Y^2	$Y \times X$
0,15	-0,82391	13,40611	0,678826	179,7238	-11,0454
0,15	-0,82391	12,48611	0,678826	155,903	-10,2874
0,15	-0,82391	12,61611	0,678826	159,1663	-10,3945
0,15	-0,82391	12,39611	0,678826	153,6636	-10,2133
0,15	-0,82391	12,77611	0,678826	163,229	-10,5263
0,15	-0,82391	12,61611	0,678826	159,1663	-10,3945
0,15	-0,82391	12,41611	0,678826	154,1598	-10,2297
0,15	-0,82391	12,92611	0,678826	167,0843	-10,6499
0,15	-0,82391	12,84611	0,678826	165,0226	-10,584
0,3	-0,52288	16,40167	0,273402	269,0147	-8,57608
0,3	-0,52288	16,51167	0,273402	272,6351	-8,6336
0,3	-0,52288	17,04167	0,273402	290,4184	-8,91073
0,3	-0,52288	15,50167	0,273402	240,3017	-8,10549
0,3	-0,52288	16,14167	0,273402	260,5534	-8,44013
0,3	-0,52288	15,66167	0,273402	245,2878	-8,18915
0,3	-0,52288	16,42167	0,273402	269,6711	-8,58654
0,3	-0,52288	16,86167	0,273402	284,3158	-8,81661
0,3	-0,52288	16,86167	0,273402	284,3158	-8,81661
0,6	-0,22185	19,67389	0,049217	387,0619	-4,36463
0,6	-0,22185	19,67389	0,049217	387,0619	-4,36463
0,6	-0,22185	19,67389	0,049217	387,0619	-4,36463

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

0,6	-0,22185	19,67389	0,049217	387,0619	-4,36463
0,6	-0,22185	19,67389	0,049217	387,0619	-4,36463
0,6	-0,22185	19,67389	0,049217	387,0619	-4,36463
0,6	-0,22185	19,67389	0,049217	387,0619	-4,36463
0,6	-0,22185	19,67389	0,049217	387,0619	-4,36463
0,6	-0,22185	19,67389	0,049217	387,0619	-4,36463
1,2	0,079181	23,68611	0,00627	561,0319	1,875496
1,2	0,079181	23,25611	0,00627	540,8467	1,841448
1,2	0,079181	23,40611	0,00627	547,846	1,853325
1,2	0,079181	23,25611	0,00627	540,8467	1,841448
1,2	0,079181	22,86611	0,00627	522,859	1,810567
1,2	0,079181	23,22611	0,00627	539,4522	1,839072
1,2	0,079181	24,20611	0,00627	585,9358	1,91667
1,2	0,079181	24,06611	0,00627	579,1777	1,905585
1,2	0,079181	24,03611	0,00627	577,7346	1,903209
2,4	0,380211	27,49611	0,144561	756,0361	10,45433
2,4	0,380211	27,70611	0,144561	767,6286	10,53417
2,4	0,380211	26,75611	0,144561	715,8895	10,17297
2,4	0,380211	27,58611	0,144561	760,9935	10,48855
2,4	0,380211	27,49611	0,144561	756,0361	10,45433
2,4	0,380211	26,61611	0,144561	708,4174	10,11974
2,4	0,380211	27,38611	0,144561	749,9991	10,41251
2,4	0,380211	27,57611	0,144561	760,4419	10,48475
2,4	0,380211	27,35611	0,144561	748,3568	10,4011
Soma	-9,98319	896,935	10,37047	19076,72	-100,373
Média	-0,22185	19,93189			

As médias amostrais das variáveis $\log_{10} Dose(X)$ e $Diametro(Y)$ são, respectivamente,

$$\bar{x} = \frac{1}{45} \sum_{i=1}^{45} x_i = -0,22185 \quad \text{e} \quad \bar{y} = \frac{1}{45} \sum_{i=1}^{45} y_i = 19,93189.$$

Além disso, na Tabela anterior, apresentam-se os valores de x^2 , y^2 e xy para cada observação $i = 1, \dots, 45$.

Da Tabela calculam-se as somas de quadrados da seguinte forma:

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n x_i^2 - n\bar{x}^2 = 10,37 - 45 \times (-0,22185)^2 = 8,15522$$

$$S_{yy} = \sum_{i=1}^n y_i^2 - n\bar{y}^2 = 19076,72 - 45 \times 19,9319^2 = 1199,09135$$

$$S_{xy} = \sum_{i=1}^n x_i y_i - n\bar{x}\bar{y} = -100,37 - 45 \times (-0,2218 \times 19,9319) = 98,98514.$$

Logo, as estimativas dos parâmetros β_1 e β_0 são, respectivamente

$$\hat{\beta}_1 = \frac{98,98514}{8,15522} = 12,137642 \quad \text{e} \quad \hat{\beta}_0 = 19,9318889 - (-0,22184875) \times 12,137642 = 22,61427988.$$

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

A seguir apresenta-se o teste de falta de ajuste (desvio de linearidade).

	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Regressão	1	1070,25348	1070,25348	6981,22427	0,00000
Resíduos	43	7,87605	0,18316		
Desvio de Linearidade	3	1,74387	0,58129	3,79173	0,01747
Erro Puro	40	6,13218	0,15330		

Tabela 20: Teste de Falta de Ajuste.

Para o cálculo da potência, utiliza-se a equação 13. Com isso, tem-se:

Amostra	Padrão	Diferença
14,16	14,83	-0,67
14,7	14,88	-0,18
14,5	14,85	-0,35
14,8	14,37	0,43
15,08	14,91	0,17
14,51	14,41	0,1
14,48	14,05	0,43
14,81	14,63	0,18
14,35	13,95	0,4
Média		0,056667

Tabela 21: Cálculo da tendência.

$$M = \frac{1}{\hat{\beta}_1} \sum_{i=1}^n (y_{ai} - y_{pi}) = \frac{0,056667}{12,14} = 0,004687$$

Desta forma a potência é dada por:

$$\text{Potência} = 10^{M + \log_{10} \text{Potência declarada}} = 10^{5,78327} = 607111,652 \text{ UI/frasco.}$$

- $\bar{x} = -0,22185$
- $S_{xx} = 8,15522$
- $\hat{\beta}_1 = 12,1376$
- $\hat{\beta}_0 = 22,6143$
- $QME = 0,1579577$
- $\hat{y}_0 = 12,72$

Suponha-se, $\hat{x}_0 = \log_{10} 0,15$, logo a incerteza devido à curva de calibração pelo método Fieller é dada por

GRUPO ESTAT CAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

$$\begin{aligned}
 u(\hat{x}_0) &= \frac{\hat{y}_0 + \hat{\beta}_1}{\hat{\beta}_1} \sqrt{\frac{\text{QME}}{\hat{\beta}_1^2} \frac{\hat{y}_0^2}{S_{xx} \hat{\beta}_1^2}} = \\
 &= \frac{12,72 + 12,14}{12,14} \sqrt{\frac{0,1579577}{12,14^2} \frac{12,72^2}{20,35366803 \times 12,14^2}} = 0,024647584
 \end{aligned}$$

Uma das fontes de incerteza é o desvio-padrão do $u(M) = 0,031709805/\sqrt{9}$. A incerteza para o doseamento é dados por:

$$U = 2 \times \sqrt{u^2(M) + u^2(\text{Curva})} = 2 \times \sqrt{0,031709805^2 + 0,01057^2} = 0,05637$$

$$M_s = M + U = 0,058323463$$

$$M_i = M - U = -0,048950162$$

O intervalo de confiança é dado por:

$$\text{Potência}_{\text{superior}} = 10^{M_s + \log_{10} \text{Potência declarada}} = 10^{5,81368} = 651.142,58 \text{ UI/frasco}$$

$$\text{Potência}_{\text{inferior}} = 10^{M_i + \log_{10} \text{Potência declarada}} = 10^{5,75287} = 566.058,14 \text{ UI/frasco}$$

Resumo descritivo por fator

Preparação	Log10Dose	Mínimo	Média	Máximo	Desvio Padrão	CV (%)	Amplitude	Tamanho
Amostra	-0.222	19.04	19.589	19.94	0.271	1.385	0.9	18
Padrão	0.079	22.65	23.34	23.99	0.463	1.985	1.34	9
Padrão	0.38	26.53	27.244	27.62	0.382	1.401	1.09	9
Padrão	-0.222	18.49	19.674	20.6	0.435	2.214	2.11	36
Padrão	-0.523	15.34	16.217	16.88	0.532	3.282	1.54	9
Padrão	-0.824	12.86	13.184	13.87	0.317	2.407	1.01	9

Figura 10: Análise descritiva.

Tabela da Anova

	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Regressão	1	1070.253	1070.253	6981.224	0
Resíduos	43	7.876	0.183		
Desvio de Linearidade	3	1.744	0.581	3.792	0.017
Erro Puro	40	6.132	0.153		

Figura 11: Teste de paralelismo.

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

Coeficientes

	Estimativa	Desvio Padrão	Estat.t	P-valor
Intercepto	22.61	0.071	316.83	0
Log10Dose	11.725	0.153	76.44	0

Qualidade do Ajuste

Desvio Padrão dos Resíduos	Graus de Liberdade	R^2	R^2 Ajustado
0.428	43	0.993	0.993

Figura 12: Estimativas do modelo para a potência.

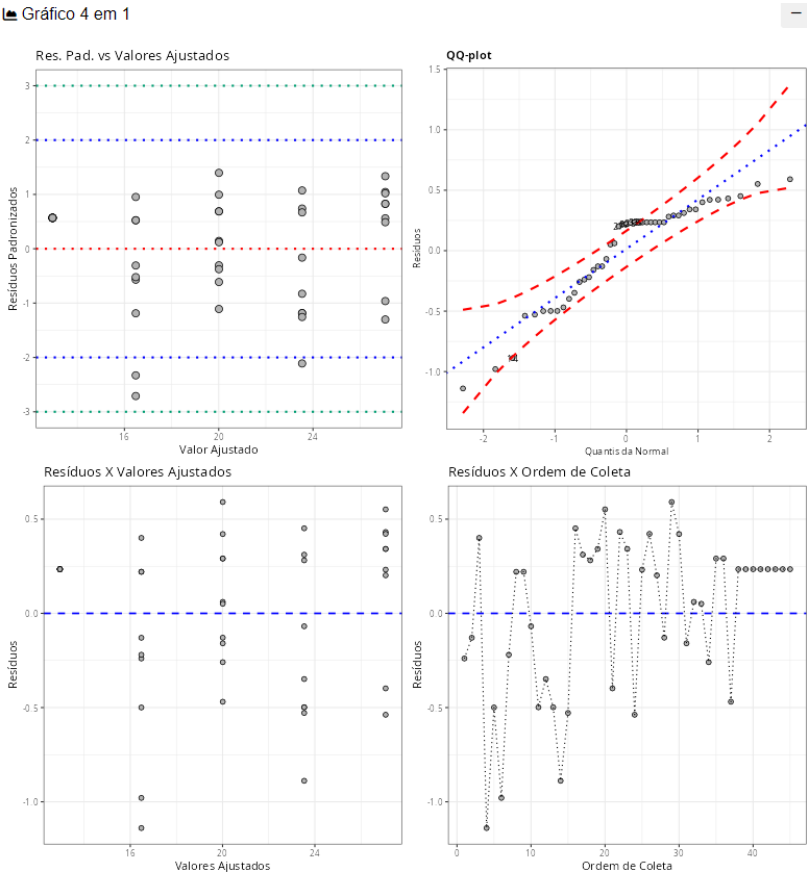


Figura 13: Gráfico 4 em 1 dos resíduos.

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

Teste de normalidade

	Estatística	P-valor
Shapiro-Wilk	0.897	0.001

Teste de Homocedasticidade

	Estatística	GL	P-valor
Breusch-Pagan	0.135	1	0.713

Teste de Independência

	Estatística	P-valor
Durbin-Watson	1.43	0.034

Figura 14: Testes de normalidade, homocedasticidade e independência.

Gráfico de Comparação das Curvas

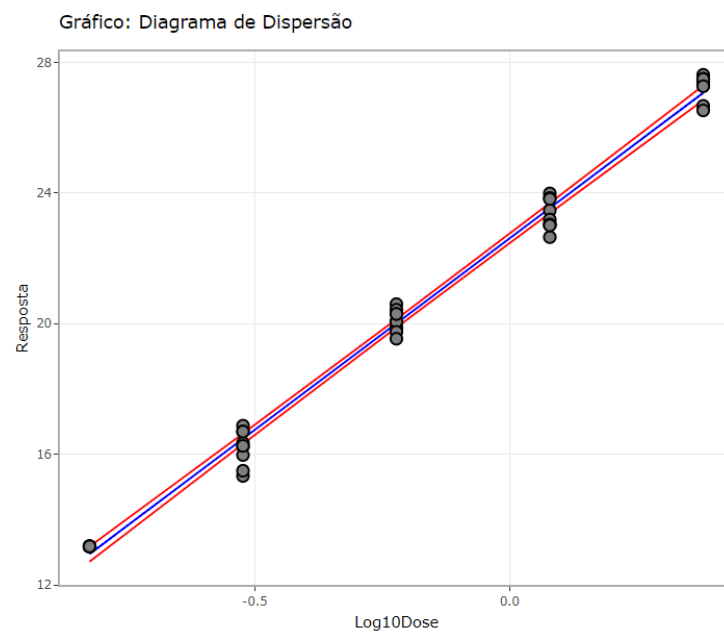


Figura 15: Gráfico de dispersão.

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

Estimativa da Potência

	Estimativa	Limite inferior	Limite superior
Razão Amostra/Coef.Angular (Log10)	0.005	-0.025	0.036
Potência relativa (%)	101.185	94.343	108.524
Potência (UI/mL)	607111.652	566058.139	651142.581

Figura 16: Estimativa da potência.

12.5 Aplicação 5 - Modelo slope-ratio

Para validar o modelo de slope-ratio, toma-se o exemplo da Farmacopeia Europeia [3] 5.2.1, no qual tem-se um ensaio 3×3 . Nesta aplicação, desconsidera-se o branco.

• Modelo para validade do ensaio

Será ajustado um modelo linear baseado nos dados coletados como mostrados na Tabela 22:

Tabela 22: Dados coletados

Dose	Preparação	Absorbância	Dose	Preparação	Absorbância
0,01	Padrão	0,133	0,01	Amostra	0,12
0,01	Padrão	0,133	0,01	Amostra	0,119
0,01	Padrão	0,131	0,01	Amostra	0,118
0,01	Padrão	0,136	0,01	Amostra	0,12
0,01	Padrão	0,137	0,01	Amostra	0,12
0,01	Padrão	0,136	0,01	Amostra	0,121
0,01	Padrão	0,138	0,01	Amostra	0,121
0,01	Padrão	0,137	0,01	Amostra	0,121
0,02	Padrão	0,215	0,02	Amostra	0,188
0,02	Padrão	0,215	0,02	Amostra	0,188
0,02	Padrão	0,216	0,02	Amostra	0,19
0,02	Padrão	0,218	0,02	Amostra	0,19
0,02	Padrão	0,22	0,02	Amostra	0,19
0,02	Padrão	0,22	0,02	Amostra	0,191
0,02	Padrão	0,219	0,02	Amostra	0,191
0,02	Padrão	0,218	0,02	Amostra	0,19
0,03	Padrão	0,299	0,03	Amostra	0,254
0,03	Padrão	0,299	0,03	Amostra	0,253
0,03	Padrão	0,299	0,03	Amostra	0,255
0,03	Padrão	0,297	0,03	Amostra	0,258
0,03	Padrão	0,297	0,03	Amostra	0,257
0,03	Padrão	0,305	0,03	Amostra	0,257
0,03	Padrão	0,299	0,03	Amostra	0,255
0,03	Padrão	0,302	0,03	Amostra	0,254

Adota-se a seguinte notação:

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

- X_1 : Dose;
- X_2 : Preparação $\begin{cases} X_2 = 0, & \text{Preparação Padrão;} \\ X_2 = 1, & \text{Preparação Amostra;} \end{cases}$
- X_3 : Interação entre Dose e Preparação;
- Y : Absorbância.
- **Estimativa dos parâmetros:**

Inicialmente, encontram-se as estimativas para os parâmetros do modelo.

$$Y = \begin{bmatrix} 0,133 \\ 0,133 \\ \vdots \\ 0,299 \\ 0,299 \\ \vdots \\ 0,12 \\ 0,119 \\ \vdots \\ 0,254 \\ 0,253 \end{bmatrix}; \quad X = \begin{bmatrix} 1 & 0,01 & 0 & 0,00 \\ 1 & 0,01 & 0 & 0,00 \\ & & \vdots & \\ 1 & 0,03 & 0 & 0,00 \\ 1 & 0,03 & 0 & 0,00 \\ & & \vdots & \\ 1 & 0,01 & 1 & 0,01 \\ 1 & 0,01 & 1 & 0,01 \\ & & \vdots & \\ 1 & 0,03 & 1 & 0,03 \\ 1 & 0,03 & 1 & 0,03 \end{bmatrix}$$

$$X^T X = \begin{bmatrix} 48,00 & 0,96 & 24,00 & 0,48 \\ 0,96 & 0,02 & 0,48 & 0,01 \\ 24,00 & 0,48 & 24,00 & 0,48 \\ 0,48 & 0,01 & 0,48 & 0,01 \end{bmatrix},$$

$$(X^T X)^{-1} = \begin{bmatrix} 0,29 & -12,50 & -0,29 & 12,50 \\ -12,50 & 625,00 & 12,50 & -625,00 \\ -0,29 & 12,50 & 0,58 & -25,00 \\ 12,50 & -625,00 & -25,00 & 1250,00 \end{bmatrix},$$

$$X^T y = \begin{bmatrix} 9,74 \\ 0,22 \\ 4,52 \\ 0,10 \end{bmatrix}$$

e da $\hat{\beta} = (X'X)^{-1} X'Y$ obtém-se

$$\hat{\beta} = \begin{bmatrix} 0,0530 \\ 8,225 \\ 0,00004 \\ -1,4562 \end{bmatrix}$$

Assim, o modelo ajustado é dado por:

$$\text{Absorbância} = 0,0530 + 8,225 * \text{Dose} + 0,00004 * \text{Preparação} - 1,4562 * \text{Dose} * \text{Preparação} \quad (24)$$

- **Teste de significância dos parâmetros:**

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

$$\begin{aligned}
* SQT &= y'y - \frac{\left(\sum_{i=1}^{48} y_i\right)^2}{48} = 2,16829 - \frac{94,8676}{48} = 0,1918817 \\
* SQE &= Y^T Y - \hat{\beta}^T X^T Y = 2,16829 - 2,168105 = 0,0001850208 \\
* SQR &= SQT - SQE = 0,1918817 - 0,0001850208 = 0,1917 \\
* SQI &= 0,00000000297619 \\
* SQ_{EP} &= 0,000162 \\
* SQ_{FA} &= SQE - SQ_{EP} = 0,1917 - 0,000162 = 0,0002302083 \\
* QM_{EP} &= \frac{SQ_{EP}}{n - m} = \frac{0,000162}{42} = 0,000004
\end{aligned}$$

Portanto, a estatística do teste é calculada por

$$\begin{aligned}
* F_1 &= \frac{QM_{Reg}}{QM_{EP}} = \frac{\frac{SQ_{Reg}}{2}}{\frac{SQ_{EP}}{42}} = \frac{0,09584832}{0,000004} = 24849,57 \\
* F_2 &= \frac{QMI}{QM_{EP}} = \frac{\frac{SQI}{1}}{\frac{SQ_{EP}}{42}} = \frac{0,00000000297619}{0,000004} = 0,000708 \\
* F_3 &= \frac{QM_{FA}}{QM_{EP}} = \frac{\frac{SQ_{FA}}{1}}{\frac{SQ_{EP}}{42}} = \frac{0,00001151042}{0,000004} = 2,984182
\end{aligned}$$

A Tabela ANOVA fica da seguinte forma:

Fatores	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Regressão	2	0,191697	0,095848	24849,565201	0,000000
Igualdade do Intercepto	1	0,000000	0,000000	0,000708	0,978896
Resíduos	44	0,000185	0,000004		
Desvio de Linearidade	2	0,000023	0,000012	2,984182	0,061402
Erro Puro	42	0,000162	0,000004		

• Cálculo da potência relativa

O modelo para cálculo de potência é uma atualização do modelo ajustado [14](#) desconsiderando a variável Preparação. Assim, baseado nos mesmos dados [22](#) encontram-se as estimativas para os parâmetros do novo modelo com a seguinte notação:

- X_1 : Dose;
- X_2 : Interação entre Dose e Preparação e
- Y : Absorbância.
- **Estimativa dos parâmetros:**
Inicialmente, encontra-se as estimativas para os parâmetros do modelo.

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

$$Y = \begin{bmatrix} 0,133 \\ 0,133 \\ \vdots \\ 0,299 \\ 0,299 \\ \vdots \\ 0,12 \\ 0,119 \\ \vdots \\ 0,254 \\ 0,253 \end{bmatrix}; \quad X = \begin{bmatrix} 1 & 0,01 & 0,00 \\ 1 & 0,01 & 0,00 \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & 0,00 & 0,00 \\ 1 & 0,03 & 0,00 \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & 0,01 & 0,01 \\ 1 & 0,01 & 0,01 \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & 0,03 & 0,03 \\ 1 & 0,03 & 0,03 \end{bmatrix}$$

$$X^T X = \begin{bmatrix} 48,00 & 0,96 & 0,48 \\ 0,96 & 0,02 & 0,01 \\ 0,48 & 0,01 & 0,01 \end{bmatrix},$$

$$(X^T X)^{-1} = \begin{bmatrix} 0.15 & -6.25 & 0.00 \\ -6.25 & 357.14 & -89.29 \\ 0.00 & -89.29 & 178.57 \end{bmatrix},$$

$$X^T y = \begin{bmatrix} 9,74 \\ 0,22 \\ 0,10 \end{bmatrix}$$

e da $\hat{\beta} = (X'X)^{-1} X'Y$ obtemos

$$\hat{\beta} = \begin{bmatrix} 0,05297917 \\ 8,22410714 \\ -1,45446429 \end{bmatrix}$$

Assim, o modelo ajustado para potência é dado por:

$$\text{Absorbância} = 0,05297917 + 8,22410714 * \text{Dose} - 1,45446429 * \text{Dose} * \text{Preparação} \quad (25)$$

– Cálculo da potência relativa

$$\text{O cálculo da potência é dado por: } \rho = \frac{\hat{\beta}_1 + \hat{\beta}_2}{\hat{\beta}_1} = \frac{6,769643}{8,22410714} = 0,8231462.$$

Desta forma, tem-se a potência relativa dada por: $0,8231462 \times 100(\%) = 82,31\%$

A seguir, apresentam-se os resultados obtidos pelo Action Stat.

GRUPO ESTAT CAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

Resumo descritivo por fator

—

Preparação	Dose	Mínimo	Média	Máximo	Desvio Padrão	CV (%)	Amplitude	Tamanho
Amostra	0.01	0.118	0.12	0.121	0.001	0.891	0.003	8
Amostra	0.02	0.188	0.19	0.191	0.001	0.614	0.003	8
Amostra	0.03	0.253	0.255	0.258	0.002	0.692	0.005	8
Padrao	0.01	0.131	0.135	0.138	0.002	1.832	0.007	8
Padrao	0.02	0.215	0.218	0.22	0.002	0.949	0.005	8
Padrao	0.03	0.297	0.3	0.305	0.003	0.891	0.008	8

Figura 17: Análise descritiva.

Tabela da Anova

—

	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Regressão	2	0.192	0.096	24849.565	0
Igualdade do Intercepto	1	0	0	0.001	0.979
Resíduos	44	0	0		
Desvio de Linearidade	2	0	0	2.984	0.061
Erro Puro	42	0	0		

Figura 18: Validade do ensaio.

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

Coeficientes

	Estimativa	Desvio Padrão	Estat.t	P-valor
Intercepto	0.053	0.001	68.418	0
Dose	8.224	0.038	214.615	0
Dose:PreparaçãoAmostra	-1.454	0.027	-53.677	0

Qualidade do Ajuste

Desvio Padrão dos Resíduos	Graus de Liberdade	R ²	R ² Ajustado
0.002	45	0.999	0.999

Figura 19: Estimativas do modelo para a potência.

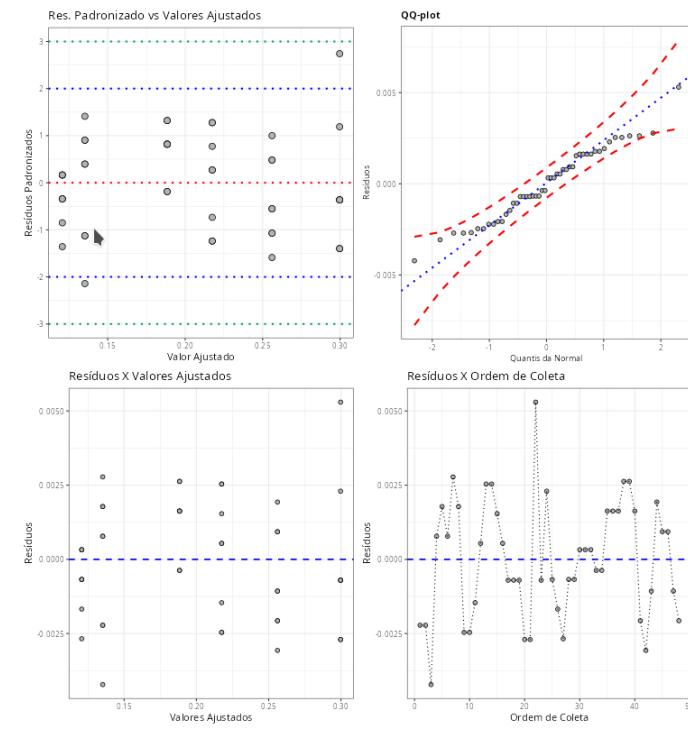


Figura 20: Gráfico 4 em 1 dos resíduos.

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

Teste de normalidade —			
	Estatística		P-valor
Shapiro-Wilk	0.974		0.374
Teste de Homocedasticidade —			
	Estatística	GL	P-valor
Breusch-Pagan	1.267	1	0.26
Teste de Independência —			
	Estatística		P-valor
Durbin-Watson	1.273		0.003

Figura 21: Testes de normalidade, homocedasticidade e independência.

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

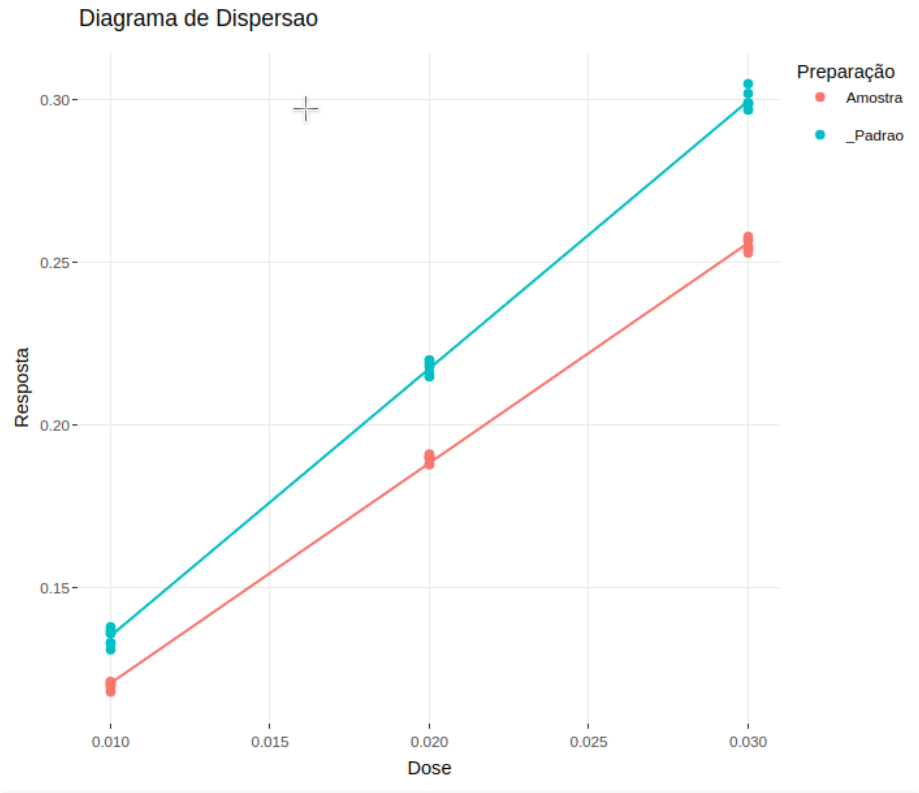


Figura 22: Gráfico de dispersão.

Estimativa da Potência

	Estimativa	Limite inferior	Limite superior
Razão de betas	0.823	0.818	0.828
Potência relativa (%)	82.315	81.794	82.836

Figura 23: Estimativa da potência.

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

Referências

- [1] BRASIL ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 49, 31/10/2013 . Guia para produtos biológicos - Outubro, 2013.
- [2] BRASIL, M. S. Farmacopéia brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.
- [3] European Pharmacopeia, fifth ed., European Directorate for the Quality of Medicines, Strasbourg Cedex, France, 2005.
- [4] United States Pharmacopeia (2021). General Chapter, (1032) Design and Development of Biological Assays. USP-NF.
- [5] Helrich, Kenneth. "Official Methods of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Virginia USA: Association of Official Analytical Chemists." (1990).
- [6] Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Guia: Validação e Controle de Qualidade Analítica (Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários), Brasília, 2011.
- [7] Guedes, Terezinha Aparecida, Ivan Ludgero Ivanqui, and Ana Beatriz Tozzo Martins. "Comparando equações de regressão em dados de saúde." Acta Scientiarum. Technology 23 (2008): 1531-1535.
- [8] González, A. Gustavo, and M. Ángeles Herrador. "A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles." TrAC Trends in Analytical Chemistry 26.3 (2007): 227-238.
- [9] Russell V Lenth. Quick and easy analysis of unreplicated factorials. Technometrics, 31(4):469-473, 1989.
- [10] Isabela da Costa César and Gerson Antônio Pianetti. Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantitation of lumefantrine using youden's test. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 45(2):235-240, 2009.
- [11] Douglas C. Montgomery and Elizabeth A. Peck (1992) - Introduction to Linear Regression Analysis, 2nd ed., John Wiley and Sons, Inc., New York.
- [12] John Neter, William Wasserman and Michael H. Kutner (1985) - Applied linear statistical models: regression, analysis of variance, and experimental designs, 2nd ed., Homewood, Ill. : R.D. Irwin.
- [13] Raymond H. Myers (1990) - Classical and Modern Regression with Applications, 2th Ed., Duxbury Press, California USA, p.488.
- [14] D. W. Hosmer and S. Lemeshow (1985) - Applied Logistic Regression, Second Edition, John Wiley and Sons, Inc., New York.
- [15] S. Weisberg (2005) - Applied Linear Regression, 3ª Edição, John Wiley and Sons, Inc., New York.
- [16] J. Durbin & G.S. Watson (1950), Testing for Serial Correlation in Least Squares Regression I. Biometrika 37, 409-428.
- [17] J. Durbin & G.S. Watson (1951), Testing for Serial Correlation in Least Squares Regression II. Biometrika 38, 159-178.
- [18] J. Durbin & G.S. Watson (1971), Testing for Serial Correlation in Least Squares Regression III. Biometrika 58, 1-19.

GRUPO ESTATCAMP	PROTOCOLO ESTATÍSTICO		Data de Emissão: 01 de Setembro de 2023
	EC.PRO-005.02	Sistema: Action Stat Doseamento Versão 4.2	
		Doseamento Biológico	

- [19] R.W. Farebrother (1980), Pan's Procedure for the Tail Probabilities of the Durbin-Watson Statistic (Corr: 81V30 p189; AS R52: 84V33 p363- 366; AS R53: 84V33 p366-369). Applied Statistics 29, 224-227.
- [20] R. W. Farebrother (1984), [AS R53] A Remark on Algorithms AS 106 (77V26 p92-98), AS 153 (80V29 p224-227) and AS 155: The Distribution of a Linear Combination of χ^2 Random Variables (80V29 p323-333) Applied Statistics 33, 366-369.
- [21] Godfrey, L.G. (1978): 'Testing Against General Autoregressive and Moving Average Error Models when the Regressors Include Lagged Dependent Variables', Econometrica, 46, 1293-1302.
- [22] Breusch, T.S. (1979): 'Testing for Autocorrelation in Dynamic Linear Models', Australian Economic Papers, 17, 334-355.
- [23] R.W. Farebrother (1980), Pan's Procedure for the Tail Probabilities of the Durbin-Watson Statistic (Corr: 81V30 p189; AS R52: 84V33 p363- 366; AS R53: 84V33 p366- 369). Applied Statistics 29, 224-227