

Protocolo Estatístico: Doseamento Biológico

Action Pharma Web 4.0

ESTATCAMP

Rua Maestro João Seppe, 900 sala 171
Jardim Paraíso CEP: 13561-180 São Carlos/SP
Fone/Fax: (16) 3376-2047
E-mail: estatistica@estatcamp.com.br
Site: www.estatcamp.com.br

Maio / 2021

Sumário

1	Aprovação	4
2	Introdução	5
3	Objetivos	5
4	Histórico de Revisões	6
5	Análise descritiva	7
5.1	Média amostral	7
5.2	Desvio padrão amostral	7
5.3	Coefficiente de variação	7
5.4	Amplitude	7
6	Modelo de retas paralelas - paralelismo	7
6.1	Retas paralelas $d \times d$	8
6.1.1	Modelo para validade do ensaio	8
6.1.2	Modelo para estimativa da potência relativa	12
6.1.3	Determinação da potência relativa	14
6.1.4	Incerteza pelo método de Fieller	15
6.1.5	Fator de correção	19
7	Modelo de interpolação $d \times 1$	19
7.1	Análise da falta de ajuste	19
7.2	Cálculo da potência relativa	21
8	Modelo slope-ratio	22
8.1	Modelo para validade do ensaio	23
8.2	Cálculo da potência relativa	24
9	Medida descritiva da qualidade de ajuste	25
9.1	Coefficiente de associação	25
10	Análise dos resíduos	25
10.1	Resíduos	25
10.1.1	Resíduos ordinários	25
10.1.2	Resíduos padronizados	26
10.1.3	Resíduos studentizados	26
10.2	Teste de normalidade	27
10.2.1	Teste de Anderson-Darling	27
10.2.2	Teste de Shapiro-Wilk	29
10.2.3	Teste de Kolmogorov-Smirnov	30
10.2.4	Teste de Ryan-Joiner	32
10.3	Testes de homoscedasticidade	33
10.3.1	Gráfico: Resíduos X Valores Ajustados	33
10.3.2	Teste de Brown-Forsythe	34
10.3.3	Teste de Cochran	35

10.3.4	Teste de Breusch-Pagan	36
10.3.5	Teste de Goldfeld-Quandt	36
10.4	Testes de independência	37
10.4.1	Gráfico: Resíduos Padronizados X Ordem de Coleta	37
10.4.2	Teste de Durbin-Watson	37
11	Aplicação	39
11.1	Aplicação 1 - Paralelismo 3×3	39
11.2	Aplicação 2 - Paralelismo 4×4 com fator de correção	50
11.3	Aplicação 3 - Interpolação 5×1	56
11.4	Aplicação 4 - Modelo slope-ratio	60
	Referências	68

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

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: 19 de maio de 2021

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

2 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 o sistema Web para que você tenha flexibilidade, agilidade e confiança nas suas aplicações estatísticas utilizando uma interface fácil e amigável.

3 Objetivos

Este protocolo tem por objetivo demonstrar as funcionalidades Action Web Pharma 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 Web confirmando os resultados.

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

4 Histórico de Revisões

Nesta seção apresenta-se o histórico das revisões do protocolo de doseamento biológico.

Tabela 1: Histórico de Revisões

Tópico	Alteração	Versão
Doseamento Biológico	Criação do protocolo de Doseamento Biológico	1
Validade do ensaio	Atualizar os critérios de aceitação para modelo de retas paralelas - paralelismo	2

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

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:

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

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:

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

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 $d \times d$ e, também, ensaios $d \times 1$, em que d denota a quantidade de concentrações utilizadas no ensaio.

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

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:**

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

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.

6.1.1 Modelo para validade do ensaio

Com objetivo de avaliar a significância dos parâmetros descritos anteriormente, isto é, Placa, Regressão, Preparação, Paralelismo, Quadrado e Diferença de quadrado, utiliza-se o teste F parcial. Inicialmente, considera-se o modelo de regressão linear escrito na forma matricial:

$$\mathbf{Y} = \mathbf{X}\beta + \varepsilon \quad (1)$$

em que

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

$$\mathbf{Y} = \begin{bmatrix} Y_1 \\ Y_2 \\ \vdots \\ Y_n \end{bmatrix}; \quad \mathbf{X} = \begin{bmatrix} 1 & X_{11} & \dots & X_{16} \\ 1 & X_{21} & \dots & X_{26} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 1 & X_{n1} & \dots & X_{n6} \end{bmatrix} = [X_0 \ X_1 \ \dots \ X_6]; \quad \beta = \begin{bmatrix} \beta_0 \\ \beta_1 \\ \beta_2 \\ \vdots \\ \beta_6 \end{bmatrix} \quad e \quad \varepsilon = \begin{bmatrix} \varepsilon_1 \\ \varepsilon_2 \\ \vdots \\ \varepsilon_n \end{bmatrix}$$

Sejam $X_0, X_1, X_2, \dots, X_6$ vetores referentes a cada coluna da matriz $\mathbf{X}$. Desta forma, pode-se reescrever o modelo matricial de forma particionada:

$$Y = X_0\beta_0 + X_1\beta_1 + X_2\beta_2 + X_3\beta_3 + X_4\beta_4 + X_5\beta_5 + X_6\beta_6 + \varepsilon \quad (2)$$

A soma de quadrados total (SQT) para o modelo matricial (1), é calculada da seguinte forma:

$$SQT = \sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2 = Y^\top Y - \frac{1}{n} Y^\top J Y = Y^\top \left(I - \frac{1}{n} J \right) Y,$$

em que

$$J = \begin{bmatrix} 1 & 1 & \dots & 1 \\ 1 & 1 & \dots & 1 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 1 & 1 & \dots & 1 \end{bmatrix}_{n \times n}.$$

Já a soma de quadrados dos resíduos é dada por:

$$\begin{aligned} SQE &= \sum_{i=1}^n e_i^2 = e^\top e = (Y - \hat{Y})^\top (Y - \hat{Y}) = (Y - X\hat{\beta})^\top (Y - X\hat{\beta}) \\ &= Y^\top Y - Y^\top X\hat{\beta} - \hat{\beta}^\top X^\top Y + \hat{\beta}^\top X^\top X\hat{\beta} = Y^\top Y - 2\hat{\beta}^\top X^\top Y + \hat{\beta}^\top X^\top X\hat{\beta}. \end{aligned}$$

Desde que $X^\top X\hat{\beta} = X^\top Y$, segue que

$$\begin{aligned} SQE &= Y^\top Y - 2\hat{\beta}^\top X^\top Y + \hat{\beta}^\top X^\top Y = Y^\top Y - \hat{\beta}^\top X^\top Y \\ &= Y^\top Y - Y^\top X(X^\top X)^{-1}X^\top Y = Y^\top (I - X(X^\top X)^{-1}X^\top)Y. \end{aligned}$$

Portanto,

$$SQE = Y^\top Y - \hat{\beta}^\top X^\top Y = Y^\top (I - X(X^\top X)^{-1}X^\top)Y = Y^\top (I - H)Y.$$

A matriz I é a matriz identidade com dimensão $n \times n$ e a matriz $H = X[X^\top X]^{-1}X^\top$ é chamada matriz chapéu que transforma o vetor de respostas Y no vetor de valores ajustados $\hat{Y}$.

Desta forma, obtêm-se que a soma de quadrados da regressão é dada por

$$SQR = SQT - SQE = \left(Y^\top Y - \frac{1}{n} Y^\top J Y \right) - (Y^\top Y - \hat{\beta}^\top X^\top Y) = \hat{\beta}^\top X^\top Y - \frac{1}{n} Y^\top J Y.$$

e o quadrado médio do erro (QME) é calculado por

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

Utilizando essas definições, pode-se definir os testes para comparação das curvas.

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

Teste parcial de F No teste de significância de cada fator, as hipóteses de interesse são:

$$\begin{cases} H_0 : \beta_i = 0 \\ H_1 : \beta_i \neq 0, \quad i = 1, \dots, 6 \end{cases} \quad (3)$$

Denomina-se por modelo reduzido o modelo supondo que H_0 é verdadeiro. Utilizando a notação matricial particionada tem-se que o modelo reduzido é

$$Y = X_0\beta_0 + \sum_{\{j \setminus i\}=1}^k X_j\beta_j, \quad i, j = 1, \dots, 6$$

Então, se o interesse é para testar $H_0 : \beta_1 = 0$, a matriz X para o modelo reduzido, denominada por X_R e o vetor de parâmetros β_R são dados por

$$X_R = [X_0 \quad X_2 \quad \dots \quad X_6] = \begin{bmatrix} 1 & X_{12} & \dots & X_{16} \\ 1 & X_{22} & \dots & X_{26} \\ & & \ddots & \\ 1 & X_{n2} & \dots & X_{n6} \end{bmatrix} \quad \text{e} \quad \beta_R = \begin{bmatrix} \beta_0 \\ \beta_2 \\ \vdots \\ \beta_6 \end{bmatrix}$$

Assim, pode-se calcular o SQR do modelo reduzido por

$$SQR(\beta_R) = \beta_R^\top X_R^\top Y - \frac{1}{n} Y^\top J Y$$

Então, a soma de quadrados da regressão de β dado que β_R já está no modelo é calculado da seguinte forma:

$$SQR(\beta|\beta_R) = SQR(\beta) - SQR(\beta_R) = \beta^\top X^\top Y - \frac{1}{n} Y^\top J Y - (\beta_R^\top X_R^\top Y - \frac{1}{n} Y^\top J Y) = \beta^\top X^\top Y - \beta_R^\top X_R^\top Y$$

com $(7 - (7 - 1)) = 1$ grau de liberdade. A soma de quadrados da regressão parcial representa a quantidade adicional que se teria na soma de quadrados da regressão ao adicionar-se uma covariável no modelo reduzido.

Então, a estatística sob H_0 é dada por:

$$F_0 = SQR(\beta|\beta_R) QME^{-1} \sim F_{1,(n-7)}$$

e o p-valor:

$$\text{p-valor} = \mathbb{P}[F_0 > F_{1,(n-7)}]$$

Portanto, se $F_0 > F_{\alpha,1,(n-7)}$ 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 Brasileira:

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

Fonte	SQ	GL	QM	Estatística
Preparações	SQ_{prep}			
Regressão	SQ_{reg}	1	$QM_{reg} = \frac{SQ_{reg}}{p-1}$	$\frac{SQ_{reg}}{SQE}$
Paralelismo	SQ_{par}	1	$QM_{par} = \frac{SQ_{par}}{1}$	$\frac{SQ_{par}}{SQE}$
Quadrático	SQ_{qua}	1	$QM_{qua} = \frac{SQ_{qua}}{1}$	$\frac{SQ_{qua}}{SQE}$
Diferença de Quadráticos	SQ_{dqua}			
Resíduos	SQE			
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, $p - valor > \alpha$.

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

Fonte	SQ	GL	QM	Estatística
Preparações	SQ_{prep}			
Regressão	SQ_{reg}	1	$QM_{reg} = \frac{SQ_{reg}}{p-1}$	$\frac{SQ_{reg}}{SQE}$
Paralelismo	SQ_{par}	1	$QM_{par} = \frac{SQ_{par}}{1}$	$\frac{SQ_{par}}{SQE}$
Desvio da linearidade	$SQE - SQE(puro)$	$m - 2$	$\frac{SQE - SQE(puro)}{m - 2}$	$\frac{SQE - SQE(puro)}{s^2(m - 2)}$
Erro Puro	$SQE(puro)$			
Resíduo	SQE			

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

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.

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

6.1.2 Modelo para estimativa da potência relativa

Nos modelos de regressão, as variáveis independentes podem ser qualitativas ou quantitativas. Algumas variáveis qualitativas indicam presença ou ausência (dicotômicas) de eventos de interesse. Este tipo de variável é denominada variável dummy. Neste modelo pode-se também codificar como 0 e 1. Assim, a variável codificada pode ser modelado na forma:

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

Assim, apresenta-se o seguinte modelo de regressão:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_{i1} + \beta_2 X_{i2} + \varepsilon_i, \quad i = 1, \dots, n \quad (4)$$

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. Nesse caso aplica-se o logaritmo na dose, em que as possíveis transformações são $\log_{10}(\text{dose})$ e $\ln(\text{dose})$;
- X_{i1} : é a variável explicativa $\log_{10}(\text{dose})$ ou $\ln(\text{dose})$;
- β_2 : é o coeficiente de regressão correspondente a variável explicativa Preparação;
- X_{i2} : é a variável dummy, referente a Preparação;
- ε_i : representa o erro experimental.

Vale ressaltar que no modelo de retas paralelas, como descrito acima, aplica-se o logaritmo na dose, isto é, $\log_{10}(\text{dose})$ ou $\ln(\text{dose})$.

Para entender os testes de comparação de curvas descrito a seguir, observe que:

$$\mathbb{E}[Y_i | X_{i1}; X_{i2} = 1] = (\beta_0 + \beta_2) + \beta_1 X_{i1} \quad (5)$$

$$\mathbb{E}[Y_i | X_{i1}; X_{i2} = 0] = \beta_0 + \beta_1 X_{i1} \quad (6)$$

a) para $X_{i2} = 0$ tem-se que

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_{i1} + \varepsilon_i \quad i = 1, \dots, n$$

b) para $X_{i2} = 1$

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

Então, das equações (5) e (6) tem-se que a diferença entre as curvas é dada por:

$$\begin{aligned} \mathbb{E}[Y_i | X_{i1}; X_{i2} = 1] - \mathbb{E}[Y_i | X_{i1}; X_{i2} = 0] &= (\beta_0 + \beta_2 + \beta_1 X_{i1}) - (\beta_0 + \beta_1 X_{i1}) \\ &= \beta_2 \end{aligned} \quad (7)$$

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

A diferença entre as retas esperadas (com e sem efeito matriz respectivamente, isto é, preparação do padrão e teste) é representada pela equação (7). Com objetivo de testar a igualdade do intercepto, avalia-se as hipóteses do coeficiente β_2 ($H_0 : \beta_2 = 0$). No paralelismo avalia-se o coeficiente β_1 ($H_0 : \beta_1 = 0$). Se os dois coeficientes forem nulos, tem-se o teste de coincidência (teste de igualdade das curvas com e sem efeito matriz).

Modelagem matricial Com objetivo de avaliar o Paralelismo se utiliza o teste F parcial. Inicialmente, considera-se o modelo de regressão linear escrito na forma matricial:

$$\mathbf{Y} = \mathbf{X}\beta + \varepsilon \quad (8)$$

em que

$$\mathbf{Y} = \begin{bmatrix} Y_1 \\ Y_2 \\ \vdots \\ Y_n \end{bmatrix}; \quad \mathbf{X} = \begin{bmatrix} 1 & X_{11} & X_{12} \\ 1 & X_{21} & X_{22} \\ & \vdots & \\ 1 & X_{n1} & X_{n2} \end{bmatrix} = [X_0 \ X_1 \ X_2]; \quad \beta = \begin{bmatrix} \beta_0 \\ \beta_1 \\ \beta_2 \end{bmatrix} \quad e \quad \varepsilon = \begin{bmatrix} \varepsilon_1 \\ \varepsilon_2 \\ \vdots \\ \varepsilon_n \end{bmatrix}$$

Sejam X_0, X_1, X_2 vetores referentes a cada coluna da matriz $\mathbf{X}$. Desta forma, pode-se reescrever o modelo matricial de forma particionada:

$$Y = X_0\beta_0 + X_1\beta_1 + X_2\beta_2 + \varepsilon \quad (9)$$

O método de mínimos quadrados tem como objetivo encontrar o vetor $\hat{\beta}$ que minimiza

$$L = \sum_{i=1}^n \varepsilon_i^2 = \varepsilon'\varepsilon = (Y - X\beta)'(Y - X\beta) =$$

$$= Y'Y - Y'X\beta - \beta'X'Y + \beta'X'X\beta = Y'Y - 2\beta'X'Y + \beta'X'X\beta,$$

sendo que $Y'X\beta = \beta'X'Y$, pois o produto resulta em um escalar. A notação X' representa o transposto da matriz X enquanto que Y' e β' representam os transpostos dos vetores Y e β , respectivamente. Usando a técnica de derivação (em termos matriciais) obtêm-se:

$$\frac{\partial L}{\partial \beta} = -2X'Y + 2X'X\beta.$$

Igualando a zero e substituindo o vetor β pelo vetor $\hat{\beta}$, tem-se:

$$(X'X)\hat{\beta} = X'Y.$$

Em geral, a matriz $(X'X)$ é não singular, ou seja, tem determinante diferente de zero e, portanto é invertível. Desta forma, conclui-se que os estimadores para os parâmetros β_j , $j = 0, \dots, p$ são dados pelo vetor

$$\hat{\beta} = (X'X)^{-1}X'Y.$$

Portanto, o modelo de regressão linear ajustado e o vetor de resíduos são respectivamente

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

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

Ao substituir os estimadores de mínimos quadrados, obtém-se que $\hat{Y} = HY$ no qual $H = X(X'X)^{-1}X'$ é a matriz chapéu ou matriz de projeção do vetor de respostas Y no vetor de valores ajustados $\hat{Y}$.

A soma de quadrados total (SQT) para o modelo matricial (8), é calculada da seguinte forma:

$$SQT = \sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2 = Y^T Y - \frac{1}{n} Y^T J Y = Y^T \left(I - \frac{1}{n} J \right) Y,$$

em que

$$J = \begin{bmatrix} 1 & 1 & \dots & 1 \\ 1 & 1 & \dots & 1 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 1 & 1 & \dots & 1 \end{bmatrix}_{n \times n}.$$

Já a soma de quadrados dos resíduos é dada por:

$$\begin{aligned} SQE &= \sum_{i=1}^n e_i^2 = e^T e = (Y - \hat{Y})^T (Y - \hat{Y}) = (Y - X\hat{\beta})^T (Y - X\hat{\beta}) \\ &= Y^T Y - Y^T X\hat{\beta} - \hat{\beta}^T X^T Y + \hat{\beta}^T X^T X\hat{\beta} = Y^T Y - 2\hat{\beta}^T X^T Y + \hat{\beta}^T X^T X\hat{\beta}. \end{aligned}$$

Desde que $X^T X\hat{\beta} = X^T Y$, segue que

$$\begin{aligned} SQE &= Y^T Y - 2\hat{\beta}^T X^T Y + \hat{\beta}^T X^T Y = Y^T Y - \hat{\beta}^T X^T Y \\ &= Y^T Y - Y^T X(X^T X)^{-1}X^T Y = Y^T (I - X(X^T X)^{-1}X^T)Y. \end{aligned}$$

Portanto,

$$SQE = Y^T Y - \hat{\beta}^T X^T Y = Y^T (I - X(X^T X)^{-1}X^T)Y = Y^T (I - H)Y.$$

A matriz I é a matriz identidade com dimensão $n \times n$ e a matriz $H = X[X^T X]^{-1}X^T$ é chamada matriz chapéu que transforma o vetor de respostas Y no vetor de valores ajustados $\hat{Y}$.

Desta forma, obtém-se que a soma de quadrados da regressão é dada por

$$SQR = SQT - SQE = \left(Y^T Y - \frac{1}{n} Y^T J Y \right) - (Y^T Y - \hat{\beta}^T X^T Y) = \hat{\beta}^T X^T Y - \frac{1}{n} Y^T J Y.$$

e o quadrado médio do erro (QME) é calculado por

$$QME = \frac{1}{n - 2 - 1} SQE = \frac{1}{n - 3} SQE$$

Utilizando essas definições, pode-se definir os testes para comparação das curvas.

6.1.3 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:

$$d_s = \rho d_t \quad (10)$$

em que

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

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

O modelo é dado por:

$$\begin{aligned}\mathbb{E}[Y_s|X_s = \log_{10}(d_s)] &= \beta_0 + \beta_1 x_s \quad (\text{padrão}) \\ \mathbb{E}[Y_t|X_t = \log_{10}(d_t)] &= \mathbb{E}[Y_t|X_t = \log_{10}(\rho d_t)] = \beta_0 + \beta_1 \log_{10} \rho x_t \quad (\text{teste})\end{aligned}\quad (11)$$

O objetivo principal de uma análise estatística é estimar a “potência relativa” ρ de um estímulo (uma estimativa pontual), bem como limites de confiança (intervalo de confiança de $100(1 - \alpha)\%$). Para isto, estima-se $\log_{10} \rho$, subtraindo os interceptos e dividindo pela inclinação comum da equação 11,

Do modelo descrito em 21 pode-se reescrever:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_{i1} + \beta_2 X_{i2} + \varepsilon_i, \quad i = 1, \dots, n \quad (12)$$

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. Nesse caso aplica-se o logaritmo na dose, em que as possíveis transformações são $\log_{10}(\text{dose})$ e $\ln(\text{dose})$;
- X_{i1} : é a variável explicativa $\log_{10}(\text{dose})$ ou $\ln(\text{dose})$;
- β_2 : é o coeficiente de regressão correspondente a variável explicativa Preparação;
- X_{i2} : é a variável dummy, referente a Preparação;
- ε_i : representa o erro experimental.

Desta forma, obtém-se a potência relativa:

$$M = \text{logaritmo}(\rho) = \frac{\hat{\beta}_2}{\hat{\beta}_1} \quad (13)$$

6.1.4 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

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

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:

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

$$\text{Var}(\psi) = \text{Var}(\hat{\beta}_0) + \text{Var}(\rho\hat{\beta}_1) - 2\text{Cov}(\hat{\beta}_0, \rho\hat{\beta}_1) \quad (14)$$

Suponha que ψ seja normalmente distribuído e

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

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 (14), com isso obtêm-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

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

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

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:

$$\Delta = 4(2\hat{\beta}_0\hat{\beta}_1 - 2w^2v_{12})^2 - 4(\hat{\beta}_1^2 - w^2v_2)(\hat{\beta}_0^2 - w^2v_1)$$

$$= 4w^2(w^2v_{12}^2 - w^2v_1v_2 + \hat{\beta}_0^2v_2 + \hat{\beta}_0^2v_1 - 2\hat{\beta}_0\hat{\beta}_1v_{12})$$

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

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

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

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 $100(1-\alpha)\%$ 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:

$$\text{Var}(\hat{y}_0 - \hat{\beta}_0) = \text{Var}(\hat{y}_0) + \text{Var}(\hat{\beta}_0) - 2\text{Cov}(\hat{y}_0, \hat{\beta}_0) \quad (15)$$

Porém, tem-se:

$$\text{Cov}(\hat{y}_0, \hat{\beta}_0) = \mathbb{E}(\hat{y}_0\hat{\beta}_0) - \mathbb{E}(\hat{y}_0)\mathbb{E}(\hat{\beta}_0) \quad (16)$$

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 (16) 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 (15) e obtêm-se

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

Vale lembrar que

$$\begin{aligned} \text{Cov}(\hat{y}_0 - \hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1) &= \text{Cov}(\hat{y}_0, \hat{\beta}_1) - \text{Cov}(\hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1) = \text{Cov}(\hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1x_0, \hat{\beta}_1) - \text{Cov}(\hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1) = \\ &= \text{Cov}(\hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1) + \text{Cov}(\hat{\beta}_1, \hat{\beta}_1)x_0 - \text{Cov}(\hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1) = \text{Var}(\hat{\beta}_1)x_0 \end{aligned}$$

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

Logo, tem-se que

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

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:

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

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

6.1.5 Fator de correção

Para a obtenção da potência se define, conforme a Famacopeia 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 6.1.1, desta forma o modelo de validade é análogo ao descrito na seção 6.1.1. Vale ressaltar que a hipótese referente ao parâmetro Placa é opcional.

7.1 Análise da falta de ajuste

O modelo linear simples é:

$$Y_{ij} = \beta_0 + \beta_1 x_i + \varepsilon \quad \begin{cases} i = 1, 2, \dots, m \\ j = 1, 2, \dots, n_i \end{cases} \quad (17)$$

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 ;

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

- β_1 : representa a inclinação da reta de regressão;
- x_i : representa o i -ésimo valor da variável explicativa;
- ε_{ij} : representa o erro aleatório associado à i -ésimo e j -ésima observação;
- n_i representa o número de observações para o i -ésimo valor de x .

Supondo que se tem m diferentes valores da variável explicativa ($x_1, x_2, \dots, x_m$) e que se tem n_i réplicas da variável resposta para cada valor da variável explicativa, ou seja,

$$\left\{ \begin{array}{l} x_1 \Rightarrow Y_{11} \ Y_{12} \ Y_{13} \ \dots \ Y_{1n_1} \\ x_2 \Rightarrow Y_{21} \ Y_{22} \ Y_{23} \ \dots \ Y_{2n_2} \\ x_3 \Rightarrow Y_{31} \ Y_{32} \ Y_{33} \ \dots \ Y_{3n_3} \\ \vdots \quad \vdots \quad \vdots \quad \vdots \quad \ddots \quad \vdots \\ x_m \Rightarrow Y_{m1} \ Y_{m2} \ Y_{m3} \ \dots \ Y_{mn_m} \end{array} \right.$$

Decompõe-se a soma de quadrados do erro em dois componentes.

Para se entender a decomposição, toma-se,

$$Y_{ij} - \hat{Y}_i = (Y_{ij} - \bar{Y}_{i.}) + (\bar{Y}_{i.} - \hat{Y}_i).$$

A primeira parte reflete a variabilidade entre as observações da variável resposta para o mesmo x_i , enquanto que a segunda parte reflete os desvios das médias das observações (em cada x_i) para o modelo.

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

$$\begin{aligned} SQE &= \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{ij} - \hat{Y}_i)^2 \\ &= \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_{i.} + \bar{Y}_{i.} - \hat{Y}_i)^2 \\ &= \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} ((Y_{ij} - \bar{Y}_{i.}) - (\hat{Y}_i - \bar{Y}_{i.}))^2 \\ &= \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_{i.})^2 - 2 \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_{i.})(\hat{Y}_i - \bar{Y}_{i.}) + \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} (\hat{Y}_i - \bar{Y}_{i.})^2 \\ &= \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_{i.})^2 + \sum_{i=1}^m n_i (\hat{Y}_i - \bar{Y}_{i.})^2, \text{ pois } 2 \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_{i.})(\hat{Y}_i - \bar{Y}_{i.}) = 0 \\ &= SQ_{PE} + SQ_{LOF}. \end{aligned}$$

Assim,

$$SQ_{PE} = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_{i.})^2 \quad \text{e} \quad SQ_{LOF} = \sum_{i=1}^m n_i (\hat{Y}_i - \bar{Y}_{i.})^2.$$

O quadrado médio devido ao Falta de Ajuste é dado por

$$QM_{LOF} = \frac{SQ_{LOF}}{m - 2}.$$

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

Logo o teste para a falta de ajuste é dada por

$$F_0 = \frac{QM_{LOF}}{QM_{PE}} = \frac{\frac{(SQ_{LOF})}{(m-2)}}{\frac{(SQ_{PE})}{(n-m)}} \sim F_{(m-2;n-m)}$$

Tem-se que

$$E[QM_{LOF}] = \sigma^2 + \frac{\sum_{i=1}^m n_i [E(Y_i) - \beta_0 - \beta_1 x_i]^2}{m-2}. \quad (18)$$

Se a regressão linear for perfeita obtém-se que $E(Y_i) = \beta_0 + \beta_1 x_i$ e o segundo termo da equação (18) é zero. Neste caso,

$$E[QM_{LOF}] = \sigma^2$$

Se o modelo linear não for adequado, obtém-se que $E(Y_i) \neq \beta_0 + \beta_1 x_i$. Neste caso,

$$E[QM_{LOF}] > \sigma^2$$

Seja,

$$E(Y_i) \neq \beta_0 + \beta_1 x_i \text{ modelo linear inadequado}$$

Se H_0 é verdadeiro, obtém-se que $F_0 \sim F_{(m-2;n-m)}$. Com isso, rejeita-se H_0 se $F_0 > F_{(\alpha, m-2; n-m)}$. O P-valor é dado por

$$\text{P-valor} = P[F_{(m-2;n-m)} > F_0].$$

Fonte	SQ	GL	QM	Estatística
Regressão	SQR	1	$SQR/1$	$\frac{QMR}{QME}$
Falta de Ajuste	$SQE - SQE(puro)$	$m-2$	$\frac{SQE - SQE(puro)}{m-2}$	$\frac{QM_{LOF}}{QME_{puro}}$
Erro Puro	$SQE(puro)$	$n-m$	$\frac{SQE(puro)}{n-m}$	
Resíduo	SQE	$n-2$	$\frac{SQE}{n-2}$	
Total	SQT	$n-1$		

Tabela 4: Tabela da ANOVA.

7.2 Cálculo da potência relativa

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

$$\text{Potência Relativa} = \text{Antilog} M = \text{Antilog} \frac{1}{\beta_1} \sum_{i=1}^n (y_{a_i} - y_{p_i}) \quad (19)$$

em que

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

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

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 $d \times d + 1$.

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

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 6.1.1. Inicialmente, considera-se o modelo de regressão linear escrito na forma:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_{i1} + \beta_2 X_{i2} + \beta_3 X_{i3} + \varepsilon_i, \quad i = 1, \dots, n \quad (20)$$

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 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 modelagem é análoga ao descrito na seção 6.1.2. Assim como o teste referente ao desvio da linearidade (falta de ajuste) é análogo ao descrito na seção 7.1.

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	$QMB = \frac{SQB}{1}$	$\frac{SQB}{QMEP}$
Regressão	SQR	$p - 1$	$QMR = \frac{SQR}{p-1}$	$\frac{SQR}{QMEP}$
Igualdade do intercepto	SQI	1	$QMI = \frac{SQI}{1}$	$\frac{SQI}{QMEP}$
Desvio da linearidade	$SQE - SQE(\text{puro})$	$m - 2$	$QMD = \frac{SQE - SQE(\text{puro})}{m-2}$	$\frac{SQE - SQE(\text{puro})}{s^2(m-2)}$
Erro Puro	$SQE(\text{puro})$	$n - m$	$QMEP = \frac{SQE - SQE(\text{puro})}{m-2}$	
Resíduos	SQE	$n - 2$		
Total	SQT	$n - 1$		

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

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

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

Fonte	SQ	GL	QM	Estatística
Regressão	SQR	$p - 1$	$QMR = \frac{SQR}{p-1}$	$\frac{SQR}{QMEP}$
Igualdade do intercepto	SQI	1	$QMI = \frac{SQI}{1}$	$\frac{SQI}{QMEP}$
Desvio da linearidade	$SQE - SQE(puro)$	$m - 2$	$QMD = \frac{SQE - SQE(puro)}{m-2}$	$\frac{SQE - SQE(puro)}{s^2(m-2)}$
Erro Puro	$SQE(puro)$	$n - m$	$QMEP = \frac{SQE - SQE(puro)}{m-2}$	
Resíduo	SQE	$n - 2$		
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

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_{i1} + \beta_2 X_{i2} + \varepsilon_i, \quad i = 1, \dots, n \quad (21)$$

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:

$$\rho = \frac{\hat{\beta}_1 + \hat{\beta}_2}{\hat{\beta}_1} \quad (22)$$

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 6.1.4.

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

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

$$R^2 = \frac{SQR}{S_{yy}} = 1 - \frac{SQE}{S_{yy}} = \frac{\hat{\beta}_1 S_{xy}}{S_{yy}} \quad (23)$$

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.

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

10.1.2 Resíduos padronizados

Os resíduos padronizados são dados por

$$r_i = \frac{e_i}{\sqrt{QME(1 - h_{ii})}}, \quad i = 1, 2, \dots, n \quad (24)$$

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:

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

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

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

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

- 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-valor $> 0,05$ não rejeita-se a hipótese nula e concluiu-se que os resíduos possuem distribuição normal. Caso p-valor $\leq 0,05$ se rejeita a hipóteses nula e concluiu-se que os resíduos não possuem distribuição normal.

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

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
13	0,814	0,837	0,866	0,889	0,945	0,974	0,979	0,984	0,986

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

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:

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

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

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

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

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.

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

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 Kolgomorov-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.

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:

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

- 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 $z_1, z_2, \dots, z_n$;

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

- 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.

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

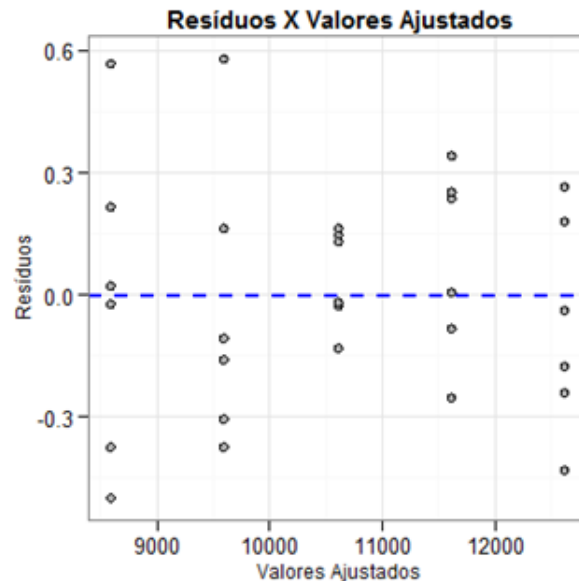


Figura 1: Gráfico dos Resíduos X Valores Ajustados para detectar heteroscedasticidade.

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 média 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 25

$$F_{BF} = \frac{\sum_{i=1}^k \frac{n_i(\bar{z}_{i.} - \bar{z}_{..})^2}{(k-1)}}{\frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (z_{ij} - \bar{z}_{i.})^2}{\sum_{i=1}^k (n_i - 1)}} \sim F_{(k-1, n-1)} \quad (25)$$

em que

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

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

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

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 26

$$C = \frac{s_{max}^2}{\sum_{i=1}^k s_i^2} = \frac{\text{maior variância}}{\text{soma de todas as variâncias}} \quad (26)$$

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 $i, i = 1, \dots, k$

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

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

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

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

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

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

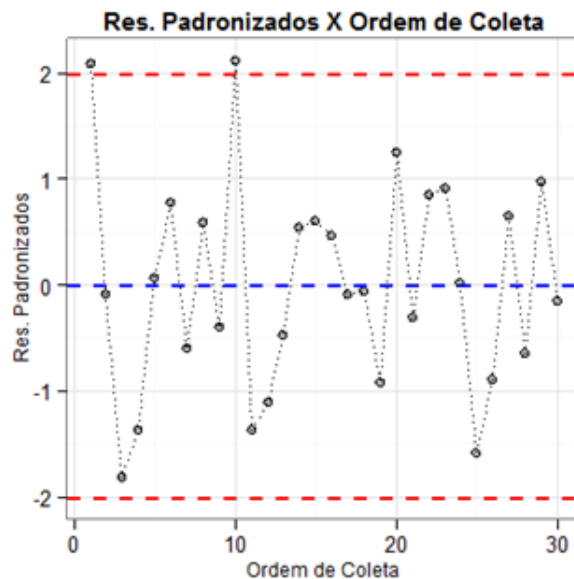


Figura 2: Gráfico dos Resíduos Padronizados X Ordem de Coleta para detectar independência.

- A estatística do teste de Durbin-Watson é dada pela equação 27

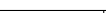
$$d_w = \frac{\sum_{i=2}^n (e_i - e_{i-1})^2}{\sum_{i=1}^n e_i^2} \quad (27)$$

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.

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

		Número de variáveis explicativas									
		1		2		3		4		5	
<i>n</i>	α	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 [15], [16] e [17].
- 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 [18], [19] e [22].

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 Aplicação

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

11.1 Aplicação 1 - Paralelismo 3×3

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

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

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 3x3.

A partir da coleta de dados obtêm-se:

Doses	16	20	25	16	20	25
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.

Da Tabela 11 disponha-se o modelo com as colunas dadas a seguir:

Placa	Preparação	Regressão	Paralelismo	Quadrado	DifQuadrado	Diâmetro
1	-1	-1	1	1	-1	16,39
1	-1	0	0	-2	2	18
1	-1	1	-1	1	-1	19,35
1	1	-1	-1	1	1	16,36
1	1	0	0	-2	-2	18,66
1	1	1	1	1	1	19,5
2	-1	-1	1	1	-1	16,28
2	-1	0	0	-2	2	18,11
2	-1	1	-1	1	-1	19,66
2	1	-1	-1	1	1	16,47
2	1	0	0	-2	-2	17,87
2	1	1	1	1	1	19,72
3	-1	-1	1	1	-1	16,85
3	-1	0	0	-2	2	17,71
3	-1	1	-1	1	-1	18,99
3	1	-1	-1	1	1	16,89
3	1	0	0	-2	-2	17,94
3	1	1	1	1	1	19
4	-1	-1	1	1	-1	16,36
4	-1	0	0	-2	2	18,09
4	-1	1	-1	1	-1	19,84
4	1	-1	-1	1	1	16,31
4	1	0	0	-2	-2	18,06

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

4	1	1	1	1	1	20
5	-1	-1	1	1	-1	16,04
5	-1	0	0	-2	2	17,66
5	-1	1	-1	1	-1	19,89
5	1	-1	-1	1	1	16,39
5	1	0	0	-2	-2	17,92
5	1	1	1	1	1	19,38
6	-1	-1	1	1	-1	16,49
6	-1	0	0	-2	2	18,14
6	-1	1	-1	1	-1	19,59
6	1	-1	-1	1	1	16,62
6	1	0	0	-2	-2	18,46
6	1	1	1	1	1	19,3

Agora, defina-se o modelo matricial:

$$\mathbf{Y} = \begin{bmatrix} 16,39 \\ 18 \\ \vdots \\ 16,28 \\ 18,11 \\ \vdots \\ 16,85 \\ 17,71 \\ \vdots \\ 16,36 \\ 18,09 \\ \vdots \\ 16,04 \\ 17,66 \\ \vdots \\ 18,46 \\ 19,3 \end{bmatrix}; \quad \mathbf{X} = \begin{bmatrix} 1 & 1 & -1 & -1 & 1 & 1 & -1 \\ 1 & 1 & -1 & 0 & 0 & -2 & 2 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & 2 & -1 & -1 & 1 & 1 & -1 \\ 1 & 2 & -1 & 0 & 0 & -2 & 2 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & 3 & -1 & -1 & 1 & 1 & -1 \\ 1 & 3 & -1 & 0 & 0 & -2 & 2 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & 4 & -1 & -1 & 1 & 1 & -1 \\ 1 & 4 & -1 & 0 & 0 & -2 & 2 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & 5 & -1 & -1 & 1 & 1 & -1 \\ 1 & 5 & -1 & 0 & 0 & -2 & 2 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & 6 & 1 & 0 & 0 & -2 & -2 \\ 1 & 6 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \end{bmatrix}$$

Apresenta-se o exemplo para testar se as placas são iguais formulando a hipótese:

$$\begin{cases} H_0 : \beta_1 = 0 \\ H_1 : \beta_1 \neq 0 \end{cases}$$

Assim, a matriz X_R para o modelo reduzido e o vetor de parâmetros β_R são dados por

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

$$\beta_R = \begin{pmatrix} \beta_0 \\ \beta_2 \\ \beta_3 \\ \vdots \\ \beta_6 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 2,56036984 \\ 0,0391667 \\ 15,80933988 \\ \vdots \\ 0,03041667 \end{pmatrix}; \quad \mathbf{X}_R = \begin{pmatrix} 1 & -1 & -1 & 1 & 1 & -1 \\ 1 & -1 & 0 & 0 & -2 & 2 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & -1 & -1 & 1 & 1 & -1 \\ 1 & -1 & 0 & 0 & -2 & 2 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & -1 & -1 & 1 & 1 & -1 \\ 1 & -1 & 0 & 0 & -2 & 2 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & -1 & -1 & 1 & 1 & -1 \\ 1 & -1 & 0 & 0 & -2 & 2 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & -1 & -1 & 1 & 1 & -1 \\ 1 & -1 & 0 & 0 & -2 & 2 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & 1 & 0 & 0 & -2 & -2 \\ 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \end{pmatrix}$$

Então, a soma de quadrados de regressão de β dado que β_R já está no modelo é calculada da seguinte forma:

$$SQR(\beta|\beta_R) = \beta^T X^T Y - \beta_R^T X_R^T Y = 0,0005716667$$

com 1 grau de liberdade. A soma de quadrados da regressão parcial representa a quantidade adicional que se teria na soma de quadrados da regressão ao se adicionar uma covariável no modelo reduzido.

Então, a estatística sob H_0 é dada por:

$$F_0 = SQR(\beta|\beta_R)QME^{-1} = \frac{0,0005716667}{2,523878333} = 0,006568594$$

Desta forma, tem-se que $\mathbb{P}(F_0 > F_{1,29}) = 0,935961445 > 0,05$. Portanto, ao nível de significância de 5%, não rejeita-se a hipótese nula, ou seja, conclui-se que há evidências para aceitar a igualdade das placas.

Analogamente, testa-se os outros coeficientes de regressão. Abaixo encontram-se os resultados:

	g.l.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Est. F	P-valor)
Placa	1	0,00057167	0,00057167	0,00656859	0,93596145
Preparação	1	0,05522500	0,05522500	0,63454921	0,43216489
Regressão	1	56,33470417	56,33470417	647,29999036	< 2e-16
Paralelismo	1	0,04593750	0,04593750	0,52783349	0,47334301
Quadrado	1	0,03423472	0,03423472	0,39336561	0,53544280
Diferença quadrado	1	0,06661250	0,06661250	0,76539446	0,38883395
Resíduos	29	2,52387833	0,08703029		

Tabela 13: Tabela ANOVA.

Utilizando o Action Stat obtêm-se:

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

Tabela da ANOVA					
Fatores	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Placa	1	0,000571667	0,000571667	0,006568594	0,935961445
Regressao	1	56,33470417	56,33470417	647,2999904	2,20617E-21
Preparacao	1	0,055225	0,055225	0,634549209	0,432164888
Quadrado	1	0,034234722	0,034234722	0,393365612	0,535442796
Paralelismo	1	0,0459375	0,0459375	0,527833486	0,473343007
Dif_Quadrado	1	0,0666125	0,0666125	0,765394462	0,38883395
Resíduos	29	2,523878333	0,087030287		

Será ajustado um modelo linear baseado nos dados coletados como dado na Tabela 14:

Tabela 14: Dados coletados					
$\log_{10}(\text{dose})$	Preparação	Diâmetro(mm)	$\log_{10}(\text{dose})$	Preparação	Diâmetro(mm)
1,2041	padrão	16,3900	1,2041	teste	16,3600
1,2041	padrão	16,2800	1,2041	teste	16,4700
1,2041	padrão	16,8500	1,2041	teste	16,8900
1,2041	padrão	16,3600	1,2041	teste	16,3100
1,2041	padrão	16,0400	1,2041	teste	16,3900
1,2041	padrão	16,4900	1,2041	teste	16,6200
1,3010	padrão	18,0000	1,3010	teste	18,6600
1,3010	padrão	18,1100	1,3010	teste	17,8700
1,3010	padrão	17,7100	1,3010	teste	17,9400
1,3010	padrão	18,0900	1,3010	teste	18,0600
1,3010	padrão	17,6600	1,3010	teste	17,9200
1,3010	padrão	18,1400	1,3010	teste	18,4600
1,3979	padrão	19,3500	1,3979	teste	19,5000
1,3979	padrão	19,6600	1,3979	teste	19,7200
1,3979	padrão	18,9900	1,3979	teste	19,0000
1,3979	padrão	19,8400	1,3979	teste	20,0000
1,3979	padrão	19,8900	1,3979	teste	19,3800
1,3979	padrão	19,5900	1,3979	teste	19,3000

Utiliza-se a seguinte notação:

- X_1 : $\log_{10}(\text{dose})$;
- X_2 : Preparação $\begin{cases} X_2 = 0, & \text{Preparação padrão;} \\ X_2 = 1, & \text{Preparação teste;} \end{cases}$
- Y : Diâmetro(mm).
- **Estimativa dos parâmetros:**

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

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

$$Y = \begin{bmatrix} 16,39 \\ 16,28 \\ \vdots \\ 19,89 \\ 19,59 \\ \vdots \\ 16,36 \\ 16,47 \\ \vdots \\ 19,38 \\ 19,30 \end{bmatrix}; \quad X = \begin{bmatrix} 1 & 1,2041 & 0 \\ 1 & 1,2041 & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & 1,3979 & 0 \\ 1 & 1,3979 & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & 1,2041 & 1 \\ 1 & 1,2041 & 1 \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & 1,3979 & 1 \\ 1 & 1,3979 & 1 \end{bmatrix}$$

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

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

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

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

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

Assim, o modelo ajustado é dado por:

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

• **Teste de significância dos parâmetros:**

$$\begin{aligned} - SQT &= y'y - \frac{\left(\sum_{i=1}^{36} y_i\right)^2}{36} = 11733,5 - \frac{(648,29)^2}{36} = 59,06116 \\ - SQR &= SQR_{x_1} + SQR_{x_2} = 56,334704 + 0,055225 = 56,38993 \\ - SQE &= SQT - SQR = 59,06116 - 56,38993 = 2,67123135 \\ - \hat{\sigma}^2 &= QME = \frac{SQE}{n-p-1} = \frac{2,671235}{33} = 0,080947 \\ - \hat{\sigma}^2(X^T X)^{-1} &= \begin{bmatrix} 0,612386 & -0,467237 & -0,004497 \\ -0,467237 & 0,359128 & 0 \\ -0,004497 & 0 & 0,008994 \end{bmatrix} \end{aligned}$$

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

$$- \widehat{\text{Var}}(\hat{\beta}_0) = 0,612386$$

$$- \widehat{\text{Var}}(\hat{\beta}_1) = 0,359128$$

$$- \widehat{\text{Var}}(\hat{\beta}_0) = 0,008994$$

Portanto, a estatística do teste é calculada por

$$- F_1 = \frac{QMR_{x1}}{QME} = \frac{\frac{SQR_{x1}}{1}}{\frac{SQE}{33}} = \frac{\frac{56,334704}{1}}{\frac{2,67123135}{33}} = \frac{56,334704}{0,080946507} = 695,9497876$$

$$- F_2 = \frac{QMR_{x2}}{QME} = \frac{\frac{SQR_{x2}}{1}}{\frac{SQE}{33}} = \frac{\frac{0,055225}{1}}{\frac{2,67123135}{33}} = \frac{0,055225}{0,080946507} = 0,682240682$$

A Tabela ANOVA fica da seguinte forma:

Fatores	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
log ₁₀ (dose)	1	56,33	56,33	695,95	9,33E-24
Preparação	1	0,06	0,06	0,68	0,4147
Resíduos	33	2,67	0,08		

Tabela 15: Tabela ANOVA para o exemplo utilizando o método de mínimos quadrados ordinários.

• Coeficiente de associação:

O coeficiente de associação R^2 é calculado por:

$$R^2 = 1 - \frac{SQE}{SQT} = 1 - \frac{2,67123135}{59,06116} = 0,95477$$

Utilizando o Action Stat constata-se os seguintes resultados:

Tabela da ANOVA					
Fatores	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Log10_Dose	1	56.33470417	56.33470417	695.9497876	9.32902E-24
Preparacao	1	0.055225	0.055225	0.682240682	0.414748151
Resíduos	33	2.671234722	0.080946507		

Análise exploratória (resíduos)					
Mínimo	1Q	Mediana	Média	3Q	Máximo
-0.5793	-0.1721	-0.04597	3.078E-18	0.1545	0.6128

Coeficientes				
Preditor	Estimativa	Desvio Padrão	Estat.t	P-valor
Intercepto	-2.599536505	0.782550886	-3.321875361	0.002193687
Log10_Dose	15.80933988	0.599273099	26.38086025	9.32902E-24
Preparacao_Padrão	0.078333333	0.094836999	0.825978621	0.414748151

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

Medida Descritiva da Qualidade do Ajuste			
Desvio Padrão dos Resíduos	Graus de Liberdade	R²	R² Ajustado
0.284510996	33	0.954771722	0.952030615
Intervalo de confiança para os parâmetros			
	2.50%	97.50%	
(Intercept)	-4.191648253	-1.007424758	
Log10_Dose	14.59010959	17.02857017	
Preparacao_Padrão	-0.114613991	0.271280658	
Estimativa da potência			
	Estimativa		
Razão de betas (Log10)	0.005		
Potência relativa (%)	101.1474		
Potência (NA)	50.5737		

Cálculo da potência relativa:

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

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
Razão de betas (Log10)	0.005
Potência relativa (%)	101.1474
Potência (NA)	50.5737

Para este exemplo, adota-se o teste de Shapiro-Wilk, para isto, considere os resíduos e_i para $i = 1, \dots, 36$ da Tabela 16:

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

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

18	19	0,0057	-0,04513889	-0,04680556	9,50002E-06
SW					0,97776

Tabela 16: Dados para cálculo da estatística de Shapiro-Wilk.

A partir da Tabela 16, 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%.

• 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 17 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

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

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

Tabela 17: Dados para análise de regressão.

Para testar as hipóteses, com os valores obtidos na Tabela 17, 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 18:

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

Observação	e_i	e_i^2	$(e_i - e_{i-1})^2$
1	-0,04680556	0,00219076	-
2	0,03111111	0,000967901	0,006071007
3	-0,15097222	0,022792611	0,033154339
4	-0,15513889	0,024068075	1,73611E-05
5	0,61277778	0,375496608	0,589696012
6	-0,07930556	0,006289372	0,47897935
7	-0,15680556	0,024587984	0,00600625
8	0,14111111	0,019912345	0,088754342
9	0,15902778	0,025289835	0,000321007
10	-0,04513889	0,002037519	0,041684029
11	-0,17722222	0,031407715	0,017446006
12	0,14069444	0,019794925	0,101071003
13	0,41319444	0,170729645	0,07425625
14	-0,25888889	0,067023457	0,451696002
15	-0,51097222	0,26109261	0,063546005
16	0,37486111	0,140520852	0,784700689
17	-0,10722222	0,011496604	0,232404337
18	-0,57930556	0,335594932	0,22286268
19	-0,07680556	0,005899094	0,25250625
20	0,12111111	0,014667901	0,039171008
21	0,33902778	0,114939836	0,047487675
22	-0,20513889	0,042081964	0,296117365
23	0,01277778	0,000163272	0,047487675
24	0,42069444	0,176983812	0,166396002
25	-0,39680556	0,157454652	0,66830625
26	-0,30888889	0,095412346	0,007729341
27	0,38902778	0,151342614	0,487087678
28	-0,12513889	0,015659742	0,264367365
29	-0,12722222	0,016185493	4,34026E-06
30	-0,19930556	0,039722706	0,005196008
31	0,05319444	0,002829648	0,06375625
32	0,17111111	0,029279012	0,013904341
33	0,08902778	0,007925946	0,006737673
34	0,10486111	0,010995852	0,000250694
35	0,41277778	0,170385496	0,094812676
36	-0,27930556	0,078011596	0,47897935

Tabela 18: Dados para o cálculo da estatística do teste de Durbin-Watson.

Então,

$$d_w = \frac{\sum_{i=2}^n (e_i - e_{i-1})^2}{\sum_{i=1}^n e_i^2} = \frac{6,1329646}{2,6712347} = 2,295929$$

1,18 1,46 A partir da Tabela de Durbin-Watson, 10, tem-se que $d_U = 1,18 < d_w < 4 - d_U = 2,54$, logo não rejeita-se H_0 . Portanto não rejeita-se a hipótese de independência das observações.

Utilizando o Action Stat constata-se os seguintes resultados:

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

Testes de Homocedasticidade

Teste de Homocedasticidade - Breusch Pagan		
Estatística	GL	P-valor
1,954704963	1	0,162080747

Teste de Homocedasticidade - Goldfeld Quandt				
Variável	Estatística	GL1	GL2	P-valor
Log10Dose	2,033774231	12	11	0,249904296
Prep	1,915911701	12	11	0,291336149

Teste de Independência

Teste de Independência - Durbin-Watson	
Estatística	P-valor
2,670737991	0,077602395

11.2 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.

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

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

Tabela 19: 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;

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

- 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 11.1, 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:

$$\text{antilog}(M) = 91,68361308$$

Logo, a potência é dada por:

$$Pot = \frac{91,68361308}{100} \times 0,89512 \times 20000 = 19228,47543 \text{ UI/vial}$$

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

Resumo Descritivo por Fator									
Sample	LnDose	Mínimo	Média	Máximo	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação	Amplitude	Tamanho da Amostra	
S	-0,4054651	140	162,4	187	17,271364	0,10635076	47	5	
S	-0,8109302	193	203	207	6,164414	0,03036657	14	5	
S	-1,2163953	235	246,6	252	6,730527	0,0272933	17	5	
S	0	98	107,4	113	5,770615	0,05373012	15	5	
T	-0,4054651	146	150,4	159	5,59464	0,03719841	13	5	
T	-0,8109302	186	195,4	206	7,503333	0,03839986	20	5	
T	-1,2163953	231	237,4	246	6,465292	0,02723375	15	5	
T	0	95	104,4	115	7,231874	0,06927082	20	5	

Figura 4: Análise descritiva.

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

Teste de Paralelismo

Teste de Falta de Ajuste					
	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
LnDose	1	101745,605	101745,605	1364,339323	8,1894E-28
Sample	1	632,025	632,025	8,475025142	0,006507434
I(LnDose^2)	1	148,225	148,225	1,987596379	0,168238233
LnDose:Sample	1	25,205	25,205	0,337981897	0,565069382
Sample:I(LnDose^2)	1	34,225	34,225	0,458933959	0,502991425
Resíduos	34	2463,09	72,44382353		
Falta de Ajuste	2	76,69	38,345	0,514180355	0,602847341
Erro Puro	32	2386,4	74,575		

Tabela da ANOVA					
Fatores	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Regressao	1	101745,605	101745,605	1404,47591	3,08111E-29
Preparacao	1	632,025	632,025	8,724346248	0,005662447
Quadrado	1	148,225	148,225	2,04606815	0,161726457
Paralelismo	1	25,205	25,205	0,347924761	0,559190136
Dif_Quadrado	1	34,225	34,225	0,472435031	0,496531236
Resíduos	34	2463,09	72,44382353		

Figura 5: Teste de paralelismo.

Modelo para Potência

Tabela da ANOVA					
Fatores	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
LnDose	1	101745,605	101745,605	1409,564517	4,63151E-31
Sample	1	632,025	632,025	8,755955735	0,005355358
Resíduos	37	2670,745	72,1822973		

Figura 6: Modelo para a potência.

Coeficientes				
Preditor	Estimativa	Desvio Padrão	Estat.t	P-valor
Intercepto	112,185	2,618648171	42,84080666	3,90528E-33
LnDose	-111,2549514	2,963308516	-37,54416754	4,63151E-31
SampleT	-7,95	2,686676335	-2,959046423	0,005355358

Medida Descritiva da Qualidade do Ajuste			
Desvio Padrão dos Resíduos	Graus de Liberdade	R²	R² Ajustado
8,496016555	37	0,974576047	0,973201779

Intervalo de confiança para os parâmetros		
	2,50%	97,50%
(Intercept)	106,8791148	117,4908852
LnDose	-117,2591848	-105,250718
SampleT	-13,39372334	-2,506276659

Figura 7: Estimativas do modelo para a potência.

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

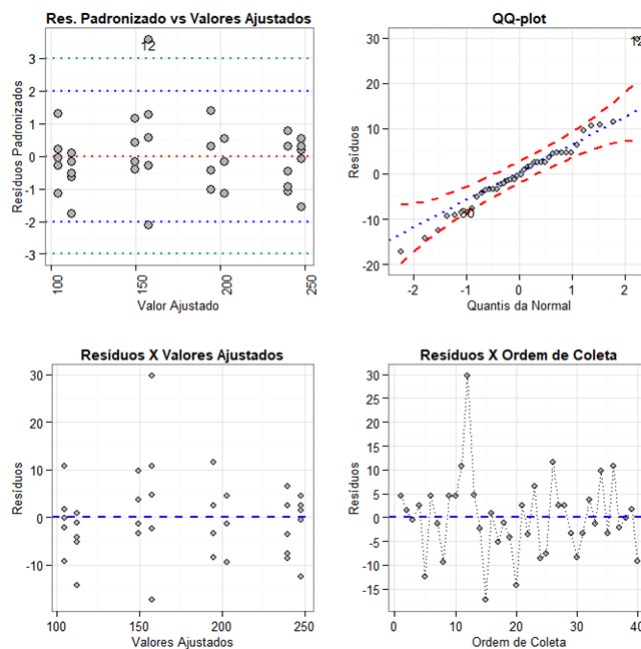


Figura 8: Gráfico 4 em 1 dos resíduos.

Teste de Normalidade		
Teste de Normalidade		
	Estatística	P-valor
Anderson-Darling	0,536189104	0,159485524
Shapiro-Wilk	0,938473272	0,030724379
Kolmogorov-Smirnov	0,134827647	0,064725237
Ryan-Joiner	0,961628481	0,0151

Figura 9: Testes de normalidade.

Testes de Homocedasticidade		
Teste de Homocedasticidade - Breusch Pagan		
Estatística	GL	P-valor
0,29125403	1	0,589418037

Figura 10: Teste de homoscedasticidade.

Teste de Independência	
Teste de Independência - Durbin-Watson	
Estatística	P-valor
1,742838421	0,252942256

Figura 11: Teste de independência.

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

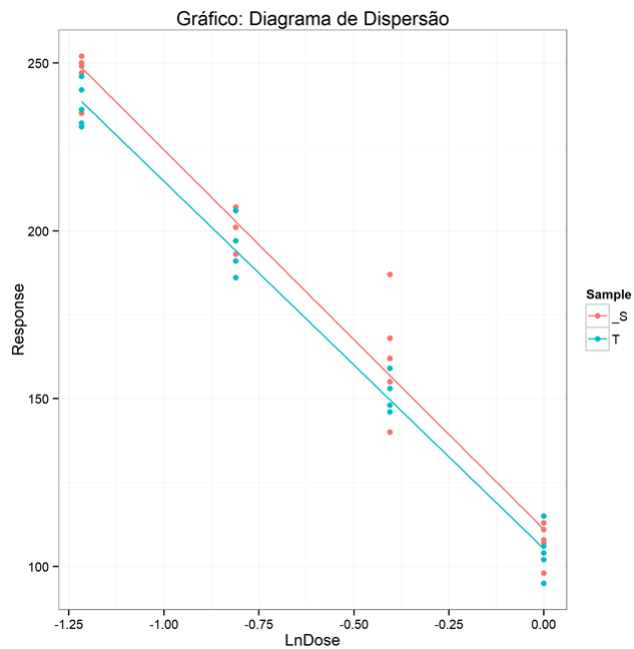


Figura 12: Gráfico de dispersão.

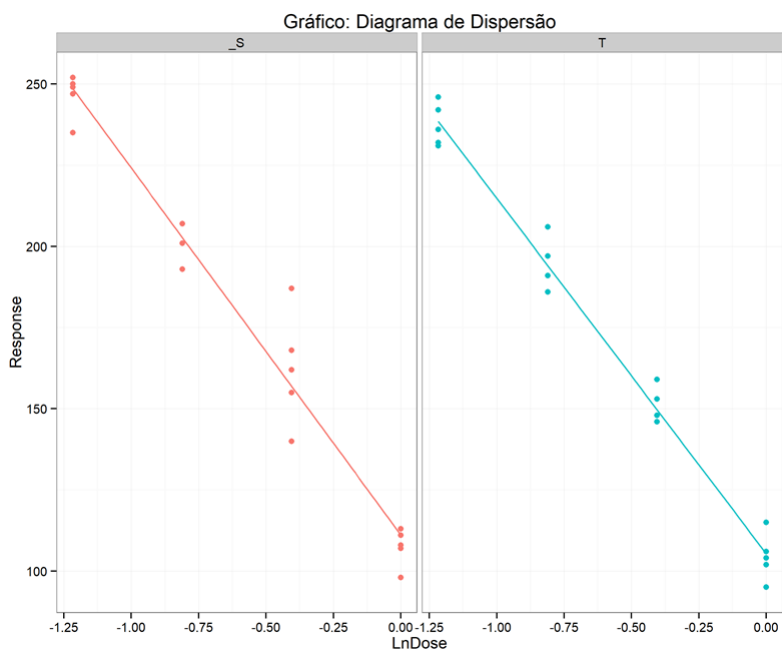
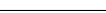
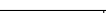


Figura 13: Gráfico de dispersão.

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

Estimativa da Potência			
	Estimativa da potência		
	Estimativa	Limite inferior	Limite superior
Razão de betas (Ln)	0,071457494	0,030692827	0,112511328
Potência relativa (%)	107,4072495	103,1168708	111,9084934
Potência (LJ)	19228.47543	18460.39467	20034.30612

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

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
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
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 $i = 1, \dots, 45$.

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

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

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n x_i^2 - n\bar{x}^2 = 10,37 - 45 \times -0,22185^2 = 20,35366803$$

$$S_{yy} = \sum_{i=1}^n y_i^2 - n\bar{y}^2 = 19076,72 - 45 \times 19,9319^2 = 18179,78435$$

$$S_{xy} = \sum_{i=1}^n x_i y_i - n\bar{x}\bar{y} = -100,37 - 45 \times -0,2218 \times 19,9319 = 98,61140598.$$

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

$$\hat{\beta}_1 = \frac{98,61140598}{20,35366803} = 12,09108006 \quad \text{e} \quad \hat{\beta}_0 = 19,93188889 - (-0,22184875) \times 12,09108006 = 22,61427988.$$

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	1192,318404	1192,318404	8009,603015	1,0591E-47
Resíduos	43	6,7921822	0,1579577		
Desvio de Linearidade	3	0,8377378	0,2792459	1,875882	0,149180783
Erro Puro	40	5,9544444	0,1488611		

Tabela 22: Teste de Falta de Ajuste.

A saída do sistema é dada por:

Tabela da ANOVA						
	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor	Disposição
Regressão	1	1192,318404	1192,318404	8009,603015	1,0591E-47	Aprovado
Resíduos	43	6,7921822	0,1579577			
Desvio de Linearidade	3	0,8377378	0,2792459	1,875882	0,149180783	Aprovado
Erro Puro	40	5,9544444	0,1488611			

Para o cálculo da potência, utiliza-se a equação 19. 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 23: Cálculo da tendência.

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

$$M = \frac{1}{\hat{\beta}_1} \sum_{i=1}^n (y_{a_i} - y_{p_i}) = \frac{0,056667}{12,09} = 0,004963$$

Desta forma a potência é dada por:

$$\text{Potência} = 10^{M + \log_{10} \text{Potência declarada}} = 10^{5,78311} = 606.895,0374 \text{ UI/frasco.}$$

Estimativa da potência	
	Estimativa
Dose_amostra (Log10)	0,005
Potência relativa (%)	100,058
Potência (UI/frasco)	606895,0374

Figura 15: Resultado para cálculo de potência.

- $\bar{x} = -0,22185$
- $S_{xx} = 20,35366803$
- $\hat{\beta}_1 = 12,09$
- $\hat{\beta}_0 = 22,6143$
- $QME = 0,1579577$
- $\hat{y}_0 = 12,72$

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

$$\begin{aligned} u(\hat{x}_0) &= \frac{\hat{y}_0 + \hat{\beta}_1}{\hat{\beta}_1} \sqrt{\frac{QME}{\hat{\beta}_1^2} \frac{\hat{y}_0^2}{S_{xx} \hat{\beta}_1^2}} = \\ &= \frac{12,72 + 12,09}{12,09} \sqrt{\frac{0,1579577}{12,09^2} \frac{12,72^2}{20,35366803 \times 12,09^2}} = 0,024647584 \end{aligned}$$

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:

$$\text{Potência}_{\text{superior}} = 10^{M_s + \log_{10} \text{Potência declarada}} = 10^{5,836474714} = 686.237,92 \text{ UI/frasco}$$

$$\text{Potência}_{\text{inferior}} = 10^{M_i + \log_{10} \text{Potência declarada}} = 10^{5,729201088} = 536.044,8 \text{ UI/frasco}$$

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

11.4 Aplicação 4 - 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 24:

Tabela 24: 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:

- 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.

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

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

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

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

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

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

$$\hat{\beta} = \begin{bmatrix} -0,053 \\ 8,225 \\ -0,00004 \\ -1,456 \end{bmatrix}$$

Assim, o modelo ajustado é dado por:

$$\text{Absorbância} = -0,053 + 8,225 * \text{Dose} - 0,00004 * \text{Preparação} - 1,456 * \text{Dose} * \text{Preparação} \quad (28)$$

– Teste de significância dos parâmetros:

$$* SQT = y'y - \frac{\left(\sum_{i=1}^{48} y_i\right)^2}{48} = 2,16829 - \frac{(94,8676)^2}{48} = 0,19188$$

$$* SQE = Y^T Y - \hat{\beta}^T X^T Y = 2,16829 - 2,168105 = 0,000185$$

$$* SQR = SQR_{x_1} + SQR_{x_2} + SQR_{x_3} = 0,17985 + 0,01015 + 0,0017 = 0,1917$$

$$* SQI = 2,98 \times 10^{-9}$$

$$* SQ_{EP} = 0,000162$$

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

$$* SQ_{FA} = SQ_E - SQ_{EP} = 0,000185 - 0,000162 = 0,000023$$

$$* QM_{EP} = \frac{SQ_{EP}}{n - m} = \frac{0,000162}{42} = 0,000004$$

Portanto, a estatística do teste é calculada por

$$* F_1 = \frac{QM_{Reg}}{QM_{EP}} = \frac{\frac{SQ_{Reg}}{2}}{\frac{SQ_{EP}}{42}} = \frac{\frac{0,1917}{2}}{\frac{0,000162}{42}} = \frac{0,0958}{0,000004} = 24849,57$$

$$* F_2 = \frac{QM_{R1}}{QM_{EP}} = \frac{\frac{SQ_{R1}}{1}}{\frac{SQ_{EP}}{42}} = \frac{\frac{2,98 \times 10^{-9}}{1}}{\frac{0,000162}{42}} = \frac{2,98 \times 10^{-9}}{0,000004} = 0,0007$$

$$* F_3 = \frac{QM_{FA}}{QM_{EP}} = \frac{\frac{SQ_{FA}}{1}}{\frac{SQ_{EP}}{42}} = \frac{\frac{0,000023}{1}}{\frac{0,000162}{42}} = \frac{0,0000115}{0,000004} = 2,98418$$

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	24849,57	2,87E-65
Igualdade do Intercepto	1	2,98E-09	2,98E-09	0,000708	0,978896
Resíduos	44	0,000185	4,21E-06		
Desvio de Linearidade	2	2,3E-05	1,15E-05	2,984182	0,061402
Erro Puro	42	0,000162	3,86E-06		

• Cálculo da potência relativa

O modelo para cálculo de potência é uma atualização do modelo ajustado [28](#) desconsiderando a variável Preparação. Assim, baseado nos mesmos dados [24](#) 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.

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

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

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

$$(X^T X)^{-1} = \begin{bmatrix} 0,15 & -6,25 & 0,00 \\ -6,25 & 357,14 & -89,29 \\ 0,00 & -89,29 & 178,57 \end{bmatrix},$$

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

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

$$\hat{\beta} = \begin{bmatrix} 0,053 \\ 8,225 \\ -1,456 \end{bmatrix}$$

Assim, o modelo ajustado para potência é dado por:

$$\text{Absorbância} = 0,053 + 8,225 * \text{Dose} - 1,454 * \text{Dose} * \text{Preparação} \quad (29)$$

– Teste de significância dos parâmetros:

$$* SQT = y'y - \frac{(\sum_{i=1}^{48} y_i)^2}{48} = 2,16829 - \frac{(94,8676)^2}{48} = 0,19188$$

$$* SQE = Y^T Y - \hat{\beta}^T X^T Y = 2,16829 - 2,168105 = 0,000185$$

$$* SQR_{x_1} = 0,17985$$

$$* SQR_{x_2} = 0,01185$$

$$* \hat{\sigma}^2 = QME = \frac{SQE}{n - p - 1} = \frac{0,000185}{45} = 0,000004$$

Portanto, a estatística do teste é calculada por

$$* F_1 = \frac{QMR_{x_1}}{QME} = \frac{\frac{SQR_{x_1}}{1}}{\frac{SQE}{45}} = \frac{\frac{0,17985}{1}}{\frac{0,000185}{45}} = \frac{0,17985}{0,000004} = 43741,68$$

$$* F_2 = \frac{QME_{x_2}}{QME} = \frac{\frac{SQR_{x_2}}{1}}{\frac{SQE}{45}} = \frac{\frac{0,01185}{1}}{\frac{0,000185}{45}} = \frac{0,01185}{0,000004} = 2881,24$$

Fatores	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Dose	1	0,17985	0,17985	43741,68	6,92E-69
Dose:Preparacao	1	0,011847	0,011847	2881,237	1,91E-42
Resíduos	45	0,000185	4,11E-06		

– Cálculo da potência relativa

$$\text{O cálculo da potência é dado por: } \rho = \frac{\hat{\beta}_1 + \hat{\beta}_2}{\hat{\beta}_1} = \frac{8,225 - 1,456}{8,225} = 0,823.$$

Desta forma, tem-se a potência relativa dada por: $0,823 \times 100(\%) = 82,3\%$

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

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

Resumo Descritivo por Fator								
Sample	LnDose	Mínimo	Média	Máximo	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação	Amplitude	Tamanho da Amostra
S	-0,4054651	140	162,4	187	17,271364	0,10635076	47	5
S	-0,8109302	193	203	207	6,164414	0,03036657	14	5
S	-1,2163953	235	246,6	252	6,730527	0,0272933	17	5
S	0	98	107,4	113	5,770615	0,05373012	15	5
T	-0,4054651	146	150,4	159	5,59464	0,03719841	13	5
T	-0,8109302	186	195,4	206	7,503333	0,03839986	20	5
T	-1,2163953	231	237,4	246	6,465292	0,02723375	15	5
T	0	95	104,4	115	7,231874	0,06927082	20	5

Figura 16: Análise descritiva.

Teste de Paralelismo

Teste de Falta de Ajuste					
	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
LnDose	1	101745,605	101745,605	1364,339323	8,1894E-28
Sample	1	632,025	632,025	8,475025142	0,006507434
I(LnDose^2)	1	148,225	148,225	1,987596379	0,168238233
LnDose:Sample	1	25,205	25,205	0,337981897	0,565069382
Sample:I(LnDose^2)	1	34,225	34,225	0,458933959	0,502991425
Resíduos	34	2463,09	72,44382353		
Falta de Ajuste	2	76,69	38,345	0,514180355	0,602847341
Erro Puro	32	2386,4	74,575		

Tabela da ANOVA					
Fatores	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Regressao	1	101745,605	101745,605	1404,47591	3,08111E-29
Preparacao	1	632,025	632,025	8,724346248	0,005662447
Quadrado	1	148,225	148,225	2,04606815	0,161726457
Paralelismo	1	25,205	25,205	0,347924761	0,559190136
Dif_Quadrado	1	34,225	34,225	0,472435031	0,496531236
Resíduos	34	2463,09	72,44382353		

Figura 17: Teste de paralelismo.

Modelo para Potência

Tabela da ANOVA					
Fatores	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Dose	1	0,179850031	0,179850031	43741,67534	6,92185E-69
Dose:Preparacao	1	0,011846612	0,011846612	2881,237413	1,91187E-42
Resíduos	45	0,000185024	4,11164E-06		

Figura 18: Modelo para a potência.

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

Coeficientes				
Preditor	Estimativa	Desvio Padrão	Estat.t	P-valor
Intercepto	0,052979167	0,000774348	68,41781007	3,94539E-47
Dose	8,224107143	0,038320268	214,6150742	2,16847E-69
Dose:PreparacaoAmostra	-1,454464286	0,027096521	-53,67715914	1,91187E-42
Medida Descritiva da Qualidade do Ajuste				
Desvio Padrão dos Resíduos	Graus de Liberdade	R²	R² Ajustado	
0,002027718	45	0,99903574	0,998992884	
Intervalo de confiança para os parâmetros				
	2,50%	97,50%		
(Intercept)	0,051419551	0,054538783		
Dose	8,146926161	8,301288124		
Dose:PreparacaoAmostra	-1,509039481	-1,39988909		

Figura 19: Estimativas do modelo para a potência.

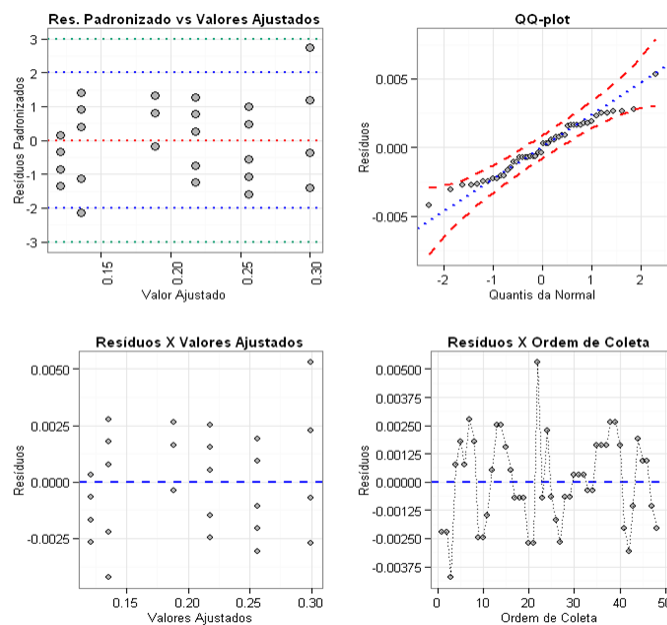


Figura 20: Gráfico 4 em 1 dos resíduos.

Teste de Normalidade		
Teste de Normalidade	Estatística	P-valor
Anderson-Darling	0,456603805	0,255153925
Shapiro-Wilk	0,974469089	0,374149716
Kolmogorov-Smirnov	0,093480284	0,367539679
Ryan-Joiner	0,986831929	0,2977

Figura 21: Testes de normalidade.

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

<i>Testes de Homocedasticidade</i>		
<i>Teste de Homocedasticidade - Breusch Pagan</i>		
<i>Estatística</i>	<i>GL</i>	<i>P-valor</i>
1,266977408	1	0,260334483

Figura 22: Teste de homoscedasticidade.

<i>Teste de Independência</i>		
<i>Teste de Independência - Durbin-Watson</i>		
<i>Estatística</i>	<i>P-valor</i>	
1,27289318	0,003445675	

Figura 23: Teste de independência.

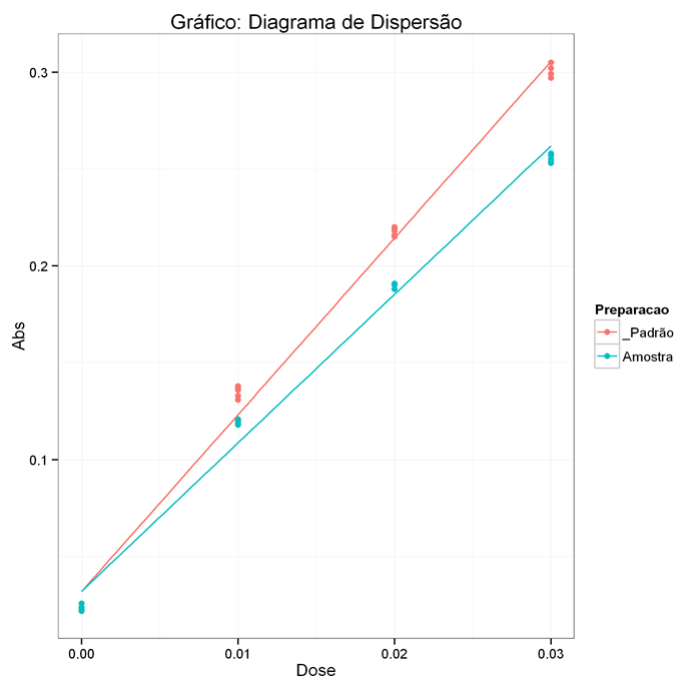


Figura 24: Gráfico de dispersão.

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

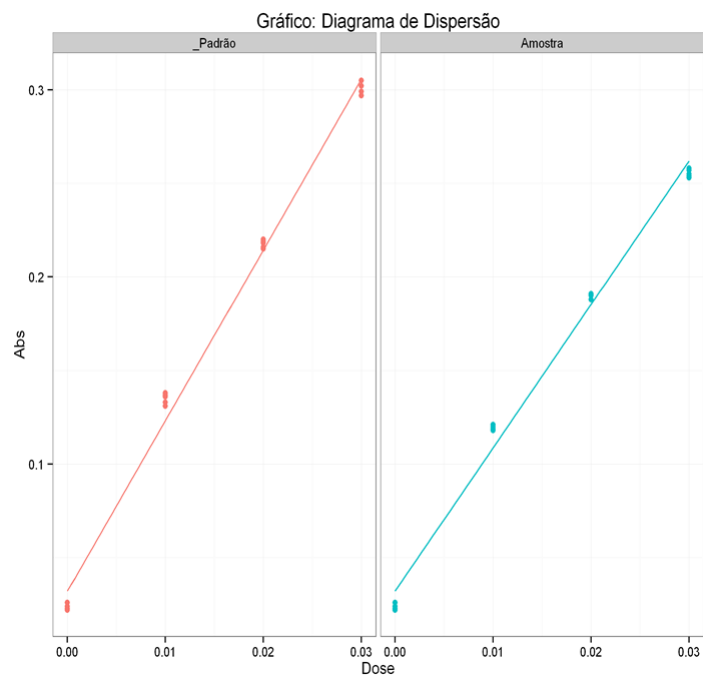


Figura 25: Gráfico de dispersão.

<i>Estimativa da Potência</i>			
	<i>Estimativa da Potência</i>		
	<i>Estimativa</i>	<i>Limite inferior</i>	<i>Limite superior</i>
Razão de betas	0,823146238	0,817943053	0,828358382
Potência relativa (%)	82,31462382	81,79430534	82,83583818

Figura 26: Estimativa da potência.

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

Referências

- [1] BRASIL ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 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] Helrich, Kenneth. "Official Methods of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Virginia USA: Association of Official Analytical Chemists." (1990).
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Russell V Lenth. Quick and easy analysis of unreplicated factorials. *Technometrics*, 31(4):469-473, 1989.
- [9] 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.
- [10] Douglas C. Montgomery and Elizabeth A. Peck (1992) - Introduction to Linear Regression Analysis, 2nd ed., John Wiley and Sons, Inc., New York.
- [11] 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.
- [12] Raymond H. Myers (1990) - Classical and Modern Regression with Applications, 2th Ed., Duxbury Press, California USA, p.488.
- [13] D. W. Hosmer and S. Lemeshow (1985) - Applied Logistic Regression, Second Edition, John Wiley and Sons, Inc., New York.
- [14] S. Weisberg (2005) - Applied Linear Regression, 3ª Edição, John Wiley and Sons, Inc., New York.
- [15] J. Durbin & G.S. Watson (1950), Testing for Serial Correlation in Least Squares Regression I. *Biometrika* 37, 409-428.
- [16] J. Durbin & G.S. Watson (1951), Testing for Serial Correlation in Least Squares Regression II. *Biometrika* 38, 159-178.
- [17] J. Durbin & G.S. Watson (1971), Testing for Serial Correlation in Least Squares Regression III. *Biometrika* 58, 1-19.
- [18] 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.

	Análise de Doseamento Biológico		Data de Emissão: 19 de maio de 2021
	Revisão nº 2.0	Objetivo: Validar as técnicas estatísticas do Action Web	
		Protocolo Estatístico	

- [19] 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.
- [20] Godfrey, L.G. (1978): 'Testing Against General Autoregressive and Moving Average Error Models when the Regressors Include Lagged Dependent Variables', Econometrica, 46, 1293-1302.
- [21] Breusch, T.S. (1979): 'Testing for Autocorrelation in Dynamic Linear Models', Australian Economic Papers, 17, 334-355.
- [22] 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