

II Workshop de Acreditação de Produtores de Materiais de Referência e de Provedores de Ensaios de Proficiência

Limites dos Sistemas Analíticos

Roberto Gonçalves Junqueira

Professor Associado

ALM/FAFAR/UFMG

Rio de Janeiro, setembro 2006

Introdução



Limites dos sistemas analíticos

- Entre as características de desempenho dos sistemas analíticos mais importantes estão aquelas relacionadas aos **limites** da capacidade de **detectar** e **quantificar** os analitos.
- Os limites são fundamentais para aplicações em:
 - ✓ pesquisa
 - desenvolvimento e seleção de métodos
 - ✓ decisões políticas
 - comércio internacional
 - saúde e segurança

Limites e inferência estatística

- A teoria dos limites dos sistemas analíticos é fundamentada em **conceitos probabilísticos** e em testes de hipótese estatísticas.

[CURRIE: IUPAC, 1995]

- Muitas vezes, certas premissas são assumidas com base na **experiência acumulada** durante o desenvolvimento e uso do método analítico.
- No entanto, a boa ciência de medição confia em hipóteses testadas.

[THOMPSON et al: IUPAC, 2002]

Hipóteses Estatísticas

Hipótese nula (H_0)

É a hipótese a ser rejeitada.

Atribui ao acaso a ocorrência do fenômeno.

Hipótese alternativa (H_1)

É a hipótese de opção quando o acaso não pode explicar a ocorrência do fenômeno.

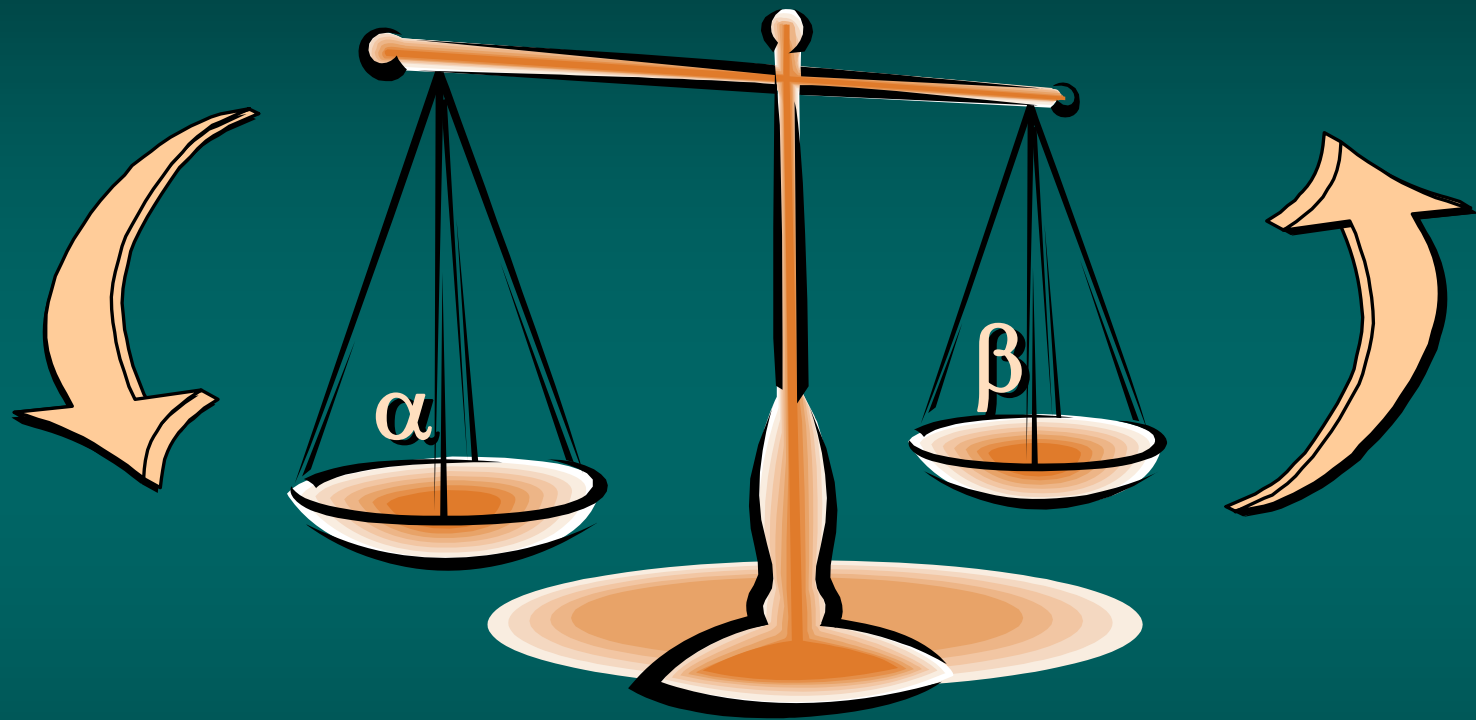
Tipos de erro nos testes de hipóteses

	Situação real	
Decisão	H_0 verdadeira	H_0 falsa
Não rejeita H_0	Decisão correta ($1 - \alpha$)	Erro tipo II β
Rejeita H_0	Erro tipo I α	Decisão correta ($1 - \beta$)

α = nível de significância do teste

$1 - \beta$ = potência do teste

Tipos de erros nos testes de hipótese



$\alpha = p(\text{Erro tipo I})$ ou $p(\text{rejeitar } H_0 \mid H_0 \text{ é verdadeira})$

$\beta = p(\text{Erro tipo II})$ ou $p(\text{não rejeitar } H_0 \mid H_0 \text{ é falsa})$

Erro Tipo I

- A probabilidade de rejeitar uma hipótese nula quando esta é verdadeira (Erro tipo I) é denominada α .

$$\alpha = p(\text{Erro tipo I}) \text{ ou } p(\text{rejeitar } H_0 | H_0 \text{ é verdadeira})$$

- Em termos práticos, é a probabilidade de uma amostra ser verdadeiramente conforme, apesar de se obter um resultado não-conforme.

Mede a taxa de resultados falsos positivos

Erro Tipo II

- A probabilidade de não rejeitar uma hipótese nula, quando esta é falsa (Erro tipo II) é denominada β .

$$\beta = p(\text{Erro tipo II}) \text{ ou } p(\text{n\~{o} rejeitar } H_0 | H_0 \text{ \textit{é} falsa})$$

- Em termos práticos, é a probabilidade de uma amostra ser verdadeiramente não-conforme, apesar de se obter um resultado conforme.

Mede a taxa de resultados falsos negativos

Limite de detecção

LOD?



Limite de detecção

- O limite de detecção é a menor quantidade de analito na amostra teste que pode ser verdadeiramente **distinguida de zero**.
- Apesar da aparente simplicidade deste conceito, a determinação do limite de detecção é uma **questão complexa**:
 - ✓ existem muitos conceitos diferentes
 - ✓ sua estimativa está sujeita à grande variação
 - ✓ pouco apropriado para inferência estatística

Limite de detecção

- É a menor quantidade do analito que pode ser medida com certeza estatística razoável.

[AOAC – PVMC, 1998]

- É a menor concentração do analito em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada sob as condições estabelecidas do teste.

[NATA, 1997]

- Valor medido, obtido por um dado procedimento de medição, para o qual a probabilidade de declarar falsamente a ausência de um componente em um material é β , sendo α a probabilidade de declarar falsamente a sua presença.

[VIM, 2008]

Limite de detecção

- O limite de detecção do equipamento (LDE) é definido como a concentração do analito que produz um sinal de **três a cinco vezes** a razão sinal/ruído do equipamento.

[INMETRO, 2003]

- O limite de detecção do método (LDM) é a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero.

[INMETRO, 2003]

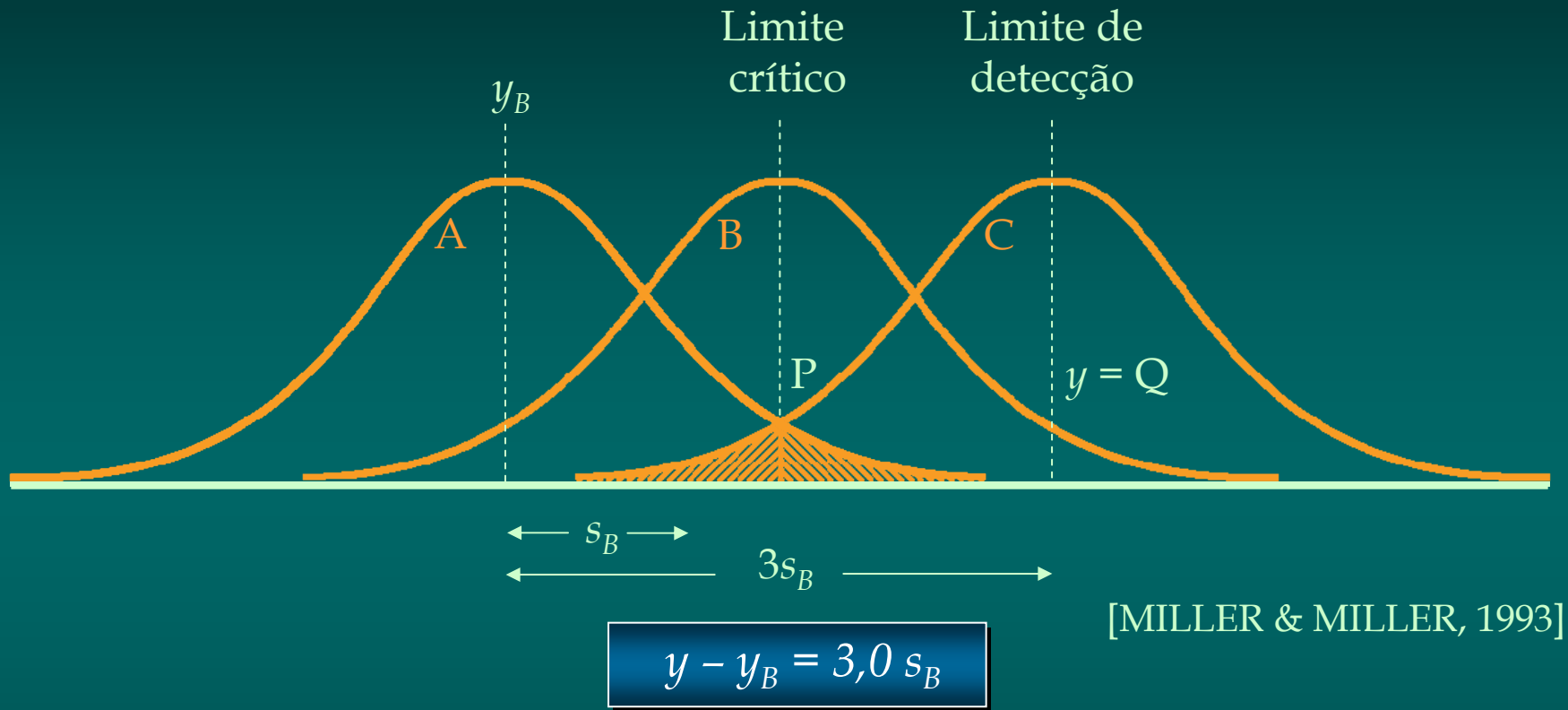
Limite de detecção

- O limite de detecção, **expresso em termos de uma concentração x_L** , é derivado do menor sinal que pode ser avaliado com certeza razoável:

$$x_L = x_b + k s_b$$

sendo x_b a média de amostras brancas, s_b o seu desvio padrão e **k um fator numérico** escolhido de acordo com o nível de confiança exigido, geralmente igual a 3.

Representação Gráfica do Limite de Detecção



A: Distribuição normal das medidas do branco; B: distribuição normal das medidas com média $y = P$ (limite crítico); C: distribuição normal das medidas com média $y = Q$ (limite de detecção). Quando $Q - y_B = 3,28 s_B$, a probabilidade de ocorrência de erro α (falsos positivos) e de erro β (falsos negativos) será de 5%. Para $Q - y_B = 3,0 s_B$ essa probabilidade é 6,7%.

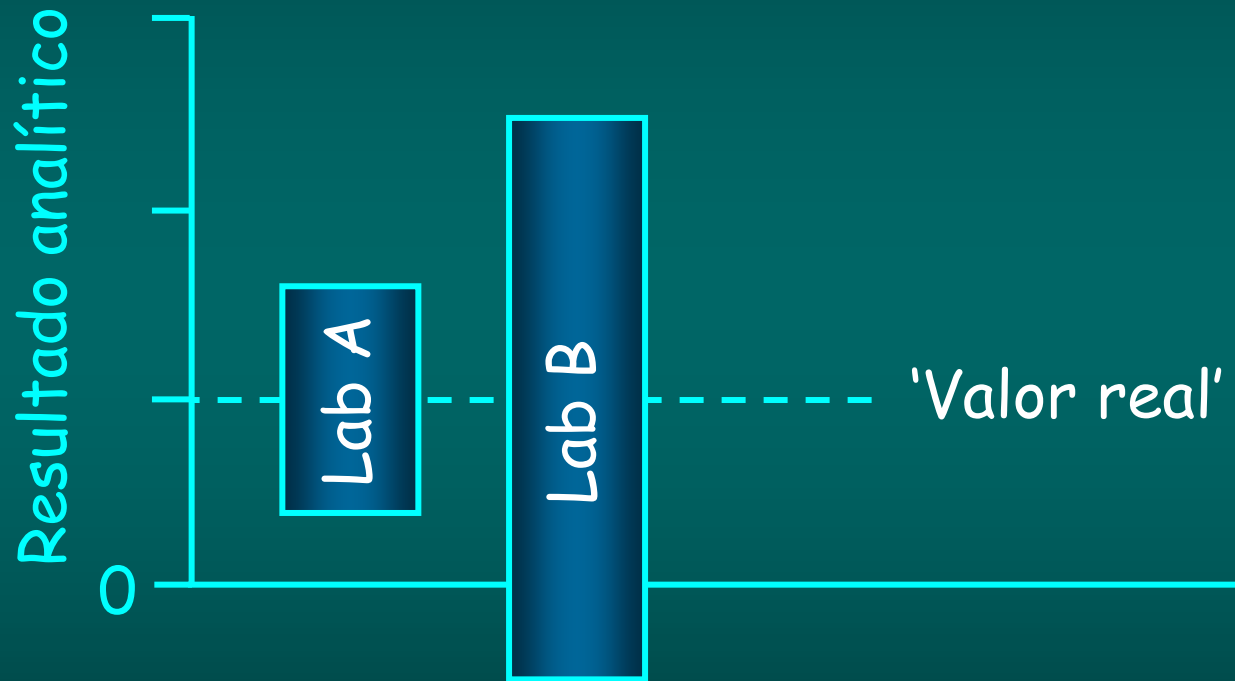
$$3,28 = 2(1,64) = 2z_{0,950}$$

$$3,00 = 2(1,50) = 2z_{0,933}$$

Resultados abaixo do limite de detecção

- Na ausência de consenso, os analistas expressam seus resultados abaixo do limite de detecção de diferentes maneiras:
 - ✓ não detectado (n.d.)
 - ✓ menor que o limite de detecção ($< c_L$)
 - ✓ um valor igual a zero
 - ✓ uma fração arbitrária de c_L (p. ex. $c_L / 2$)
 - ✓ o valor encontrado com a indicação de sua incerteza

O problema da expressão 'não detectado'



O problema da expressão 'menor que o limite de detecção'

- O resultado não pode ser incorporado em uma avaliação estatística simples, como no cálculo de uma média.
- Ao serem omitidos dos cálculos, estes resultados vão influenciar de maneira tendenciosa as estatísticas descritivas.
- Não auxiliam nas situações confirmatórias como a do problema dos laboratórios A e B.

$$C_{L,A} < C < C_{L,B}$$

O problema da expressão em função de 'um valor arbitrário'

- Adotar um valor arbitrário qualquer c_R , em que

$$0 \leq c_R < c_L$$

é solução melhor para substituir 'o menor que'.

- Mas não é perfeita, pois não se tem idéia qual lado da faixa é o correto.
- Isto pode ter pouca importância, se os valores 'menores que' estão em minoria, mas se estão em maioria, a escolha pode acabar sendo enganosa.

O valor encontrado com sua incerteza: a melhor opção

- Informar o valor encontrado, acompanhado de sua incerteza, é claramente o melhor método para informar os resultados.
- Todas os demais métodos de expressão dos resultados podem ser deduzidos se os resultados são apresentados em função do valor encontrado, acompanhado de sua incerteza.

Limite de detecção: como determinar?

- Pode ser estimado pela média das leituras de amostras brancas ($n \geq 20$) mais 3 desvios padrão, expresso em concentração do analito.

[AOAC – PVMC, 1998]

- Para a validação de um método analítico, o limite de detecção pode ser estimado como “Branco + $3s$ ” ou “ $0 + 3s$ ”, considerando a análise de sete ou mais amostras de branco e de brancos com adição, respectivamente.

[INMETRO, 2003]

Limite de detecção: como determinar?

- A estimativa da precisão (s_0) deve estar baseada em pelo menos 6 determinações independentes, em uma matriz típica sem o analito ou com baixo teor, **sem censurar** a ocorrência de zero ou de **resultados negativos**, estimando-se o limite de detecção como sendo igual a $3s_0$.

[THOMPSON et al: IUPAC, 2002]

Limite de detecção: como determinar?

Pure Appl. Chem., Vol. 74, No. 5, pp. 835–855, 2002.

© 2002 IUPAC

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY

ANALYTICAL, APPLIED, CLINICAL, INORGANIC, AND
PHYSICAL CHEMISTRY DIVISIONS

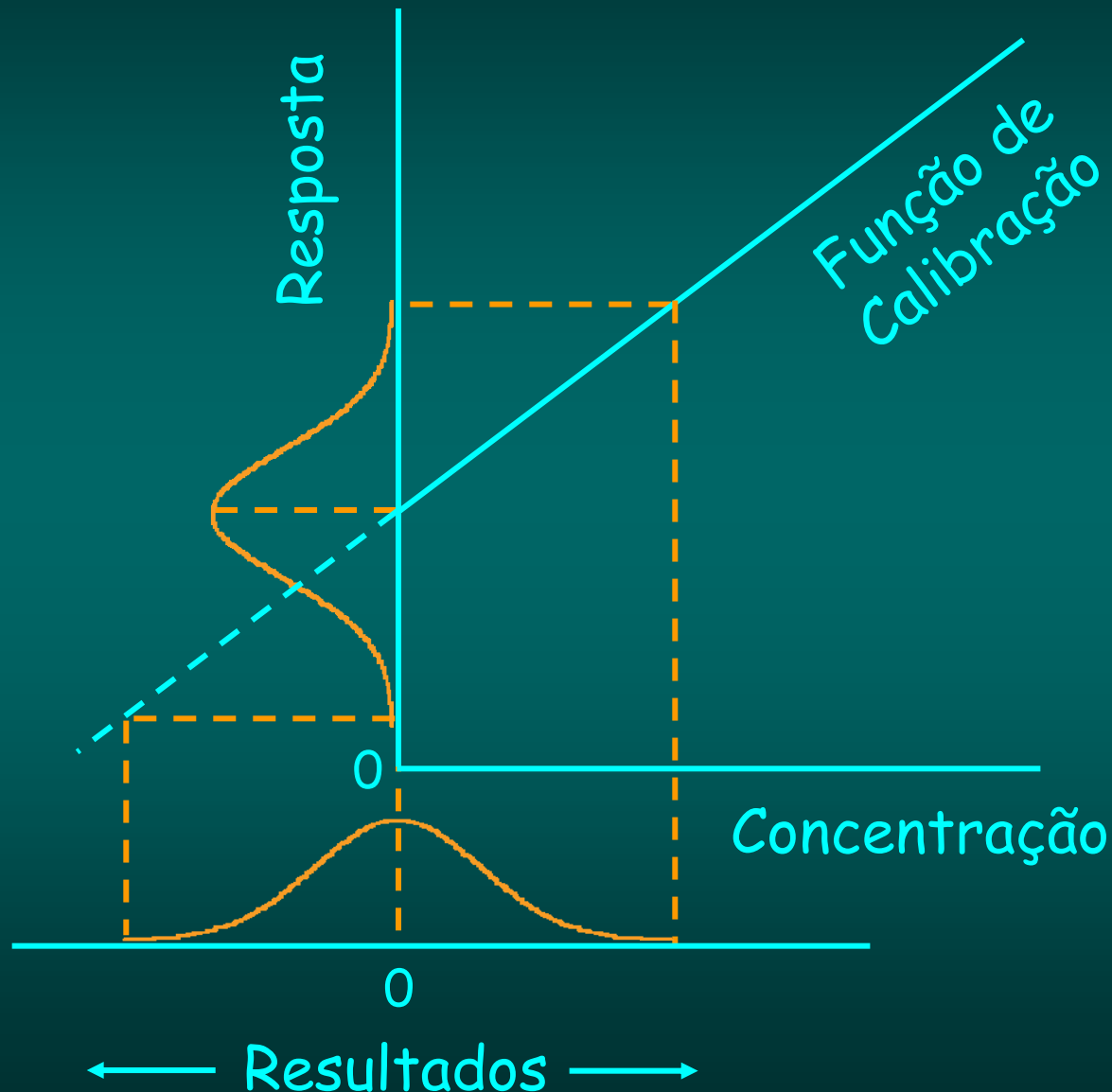
INTERDIVISIONAL WORKING PARTY FOR HARMONIZATION OF
QUALITY ASSURANCE SCHEMES FOR ANALYTICAL LABORATORIES*

HARMONIZED GUIDELINES FOR SINGLE- LABORATORY VALIDATION OF METHODS OF ANALYSIS

(IUPAC Technical Report)

It is accordingly recommended that for method validation, the precision estimate used (S_0) should be based on at least 6 independent complete determinations of analyte concentration in a typical matrix blank or low-level material, with no censoring of zero or negative results, and the approximate detection limit calculated as $3S_0$. Note that with the recommended minimum number of degrees of freedom, this value is quite uncertain, and may easily be in error by a factor of 2. Where more rigorous estimates

Medida do "zero de concentração"



Efeito da censura de resultados negativos

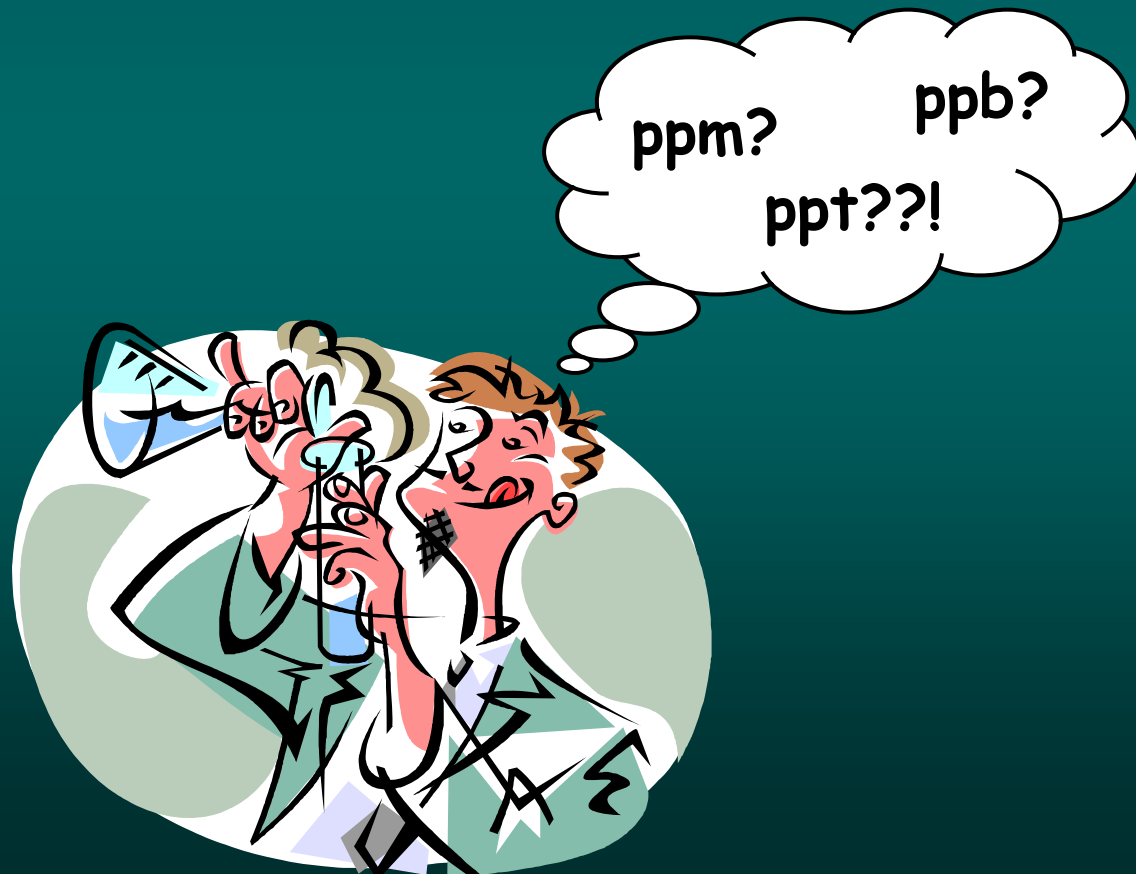
- Se os resultados negativos são censurados e convertidos em zero:
 - ✓ a média dos resultados terá uma tendência positiva (deslocada para a direita);
 - ✓ a variância dos resultados estará sendo reduzida artificialmente;
- Como consequência destes dois efeitos:
 - ✓ a probabilidade do analito ser detectado quando, na realidade, não está presente será aumentada (aumento do erro α).

Convivendo com resultados negativos

- Valores de concentração realmente são apenas positivos ou zero.
- Mas deve ser notado que resultados analíticos não são concentrações, mas estimativas, sujeitas a erro, das concentrações reais.

[RCS/AMC Technical Brief, 2001]

Limite de quantificação



Limite de quantificação

- É útil declarar uma concentração abaixo da qual o método analítico não pode operar com uma precisão aceitável.
- Às vezes esta precisão é arbitrariamente definida como sendo igual a 10% do desvio padrão relativo (s_{Rel}).
- Outras vezes considera-se este limite, também arbitrariamente, como um múltiplo fixo (tipicamente 2) do limite de detecção.

Limite de quantificação

- A quantidade igual ou maior que o ponto de concentração mais baixo na curva de calibração.

[AOAC – PVMC, 1998]

- A concentração mais baixa de um analito que pode ser determinada com precisão aceitável (repetitividade) e exatidão, nas condições declaradas do teste

[NATA, 1997]

- É a característica de desempenho que define a habilidade de um processo de medida química quantificar um analito adequadamente.

[CURRIE: IUPAC, 1995]

Limite de quantificação

- É a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e exatidão (*trueness*).

[INMETRO, 2003]

- Limites de quantificação são definidos em termos de um valor específico de desvio padrão relativo.

[CURRIE: IUPAC, 1995]

Limite de quantificação: exatidão

- São normalmente aceitos os seguintes valores de exatidão para métodos quantitativos, em relação a um material de referência certificado (ou quando estes não forem disponíveis, pela adição de padrão em amostras brancas):

Fração de massa*	Intervalo (%)
$c \leq 1,0 \times 10^{-9}$	50 a 120
$1,0 \times 10^{-9} < c < 1,0 \times 10^{-8}$	70 a 110
$c \geq 1,0 \times 10^{-8}$	80 a 110

* adimensional: para $1 \mu\text{g}/\text{kg} = 1 \text{ ppb}$ tem-se $c = 10^{-9}$

Limite de quantificação: precisão

- O desvio padrão obtido em condições de reprodutibilidade (s_R), não deve exceder ao valor calculado pelas equações de Horwitz (1982) ou de Thompson (2000). Em condições de repetitividade considera-se um valor de $1/2$ a $2/3$ do s_R .

Fração de massa*	σ_T ou σ_H **
$c < 1,2 \times 10^{-7}$	$\sigma_T = 0,22c$
$1,2 \times 10^{-7} \leq c \leq 0,138$	$\sigma_H = 0,02c^{0,8495}$
$c > 0,138$	$\sigma_T = 0,01c^{0,5}$

*para 1 ppm, $c = 10^{-6}$; ** σ_R de Thompson (σ_T) ou de Horwitz (σ_H).

Limite de quantificação: dicotomia artificial

- Existe um grau razoável de segurança para operar acima do limite de quantificação.
- Mas há uma dicotomia bastante artificial na escala de concentração:
 - ✓ medidas abaixo deste limite não são destituídas de conteúdo de informação e
 - ✓ podem ser bem ajustadas ao propósito de uso.
- É preferível tentar expressar a incerteza da medição como uma função da concentração.

Referências



- AOAC. *Peer-verified methods program. Manual on policies and procedures.* AOAC International, 1998.
- Commission Decision 2002/657/EC. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*, L 221/8, 2002.
- Currie, L.A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. *Pure Appl. Chem.*, v. 67, p. 1699-1723, 1995.
 - Daniel, W.W. *Biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences.* 8 ed. New York: Wiley, 934 p. 2006.
- EURACHEM. *The fitness for purpose of analytical methods.* A laboratory guide to method validation and related topics. 1998.

- Horwitz, W. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. *Anal. Chem.*, v. 54, p. 67A-76A, 1982.
- INMETRO. *Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*. 2003.
- ISO 11843. *Capability of detection*. Part 1: Terms and definitions. Part 2: Methodology in the linear calibration case. 1997.
- Kennedy, G. *Validation: theoretical aspects and concepts*. School for Advanced Residue Analysis in Food. National Veterinary School of Nantes (ENVN) – France, 2004.
- Miller, J.C.; Miller, J.N. *Statistics for analytical chemistry*. 3. Ed. Ellis Horwood, London, 233 p. 1993.
- NATA. *Format and content of test methods and procedures for validation and verification of chemical test methods*. 1997.

- RCS/AMC Technical Brief. *What should be done with results below the detection limit?* Mentioning the unmentionable. 2001.
- Souza, S.V.C.; Junqueira, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Analytica Chimica Acta*, v. 552, p. 25–35, 2005.
- Thompson, M. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. *Analyst*, v. 125, p. 385-386, 2000.
- Thompson, M.; Ellison, S.L.R.; Wood, R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. *Pure & Appl. Chem.*, v. 74, p. 835-855, 2002.
- Van Loco, J.; Beernaert H. *Proceedings of European Food Chemistry*. XII. Strategies for Safe Food, p. 91-94. 2003.

Muito obrigado!