Introdução à validação de métodos

09 de maio de 2006

Renata Martins Horta Borges

Coordenação Geral de Credenciamento – CGCRE / Inmetro
Divisão de Credenciamento de Laboratórios - Dicla

Organização Mundial do Comércio (OMC)

Mudanças nas relações comerciais entre países

Proteção tarifária

Novas formas de protecionismo
Barreiras técnicas

Ativos estratégicos
- informação
- conhecimento técnico

Rodada de Tóquio (1973-1979)
Acordo sobre Barreiras Técnicas

NBR ISO/IEC 17.025
"Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaios e calibrações"

Laboratórios Acreditados

Pessoal gerencial e técnico com autoridade e recursos necessários para desempenhar suas tarefas

Sistema da Qualidade

Controle do processo de medição

Principal objetivo

Padrão internacional e único para atestar a competência dos laboratórios para realizarem ensaios e/ou calibrações, incluindo amostragem e facilitar a interpretação e a aplicação dos requisitos, evitando opiniões divergentes e conflitantes.

Avaliação da Conformidade

Exame **sistemático** do grau de atendimento por parte de um produto, processo ou serviço a requisitos especificados, ou seja, a garantia da **qualidade do produto** vem se consolidando devido às variadas mudanças nas relações comerciais entre países.

- ganhos de produtividade,
- redução de variedade,
- qualidade dos produtos e serviços,
- redução de custos e
- eliminação de desperdícios.

Como instrumento de controle da confiabilidade metrológica, destacam-se os seguintes requisitos:

- existência de um sistema de gestão implantado no laboratório, que deve operar em consonância aos preceitos da norma NBR ISO/IEC 17025;
- implantação dos preceitos de validação de metodologia analítica;
- emissão de relatórios de ensaios analíticos cujas respectivas incertezas de medição devem ser declaradas em absoluta consonância às práticas e procedimentos internacionalmente adotados;
- capacitação profissional do pessoal técnico envolvido e
- garantia da rastreabilidade das medições ao Sistema Internacional de Unidades (SI).

Alguns requisitos da ISO/IEC 17.025:2005

- Requisito 4.4 Análise crítica de pedidos propostas e contratos (ISO 17025:2005)
  - Para que propósito o resultado será usado?
  - Incluindo aspectos legais do trabalho

- Requisito 4.6 Aquisição de serviços e suprimentos (ISO 17025:2005)

- Requisito 5.4.1 – 5.4.5 (ISO 17025:2005)
  - Métodos devem ser validados

- Requisito 5.4.6 Estimativa da incerteza de medição (ISO 17025:2005)
  - Incerteza deve ser estimada

- Requisito 5.4.7 Controle de dados (ISO 17025:2005)
  - Os cálculos e transferências devem ser submetidos a verificações

- Requisito 5. 6 Rastreabilidade de medição (ISO 17025:2005)

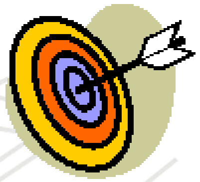
  - Os resultados devem ser rastreáveis a referências internacionais (por exemplo, SI)

- Requisito 5.9 Garantia da qualidade dos resultados (ISO 17025:2005)

  - Cada resultado deve ser proveniente de um método validado seguido da estimativa da incerteza de medição;

  - Todos os aspectos, incluindo matriz, devem estar sob controle

- A confiabilidade metrológica requer procedimentos, rotinas e métodos apropriados; o processo que envolve um programa de confiabilidade metrológica deve ser contínuo, sem interrupção, requerendo tanto um planejamento prévio quanto uma avaliação constante dos resultados obtidos. Em laboratórios de análises químicas, a confiabilidade metrológica é a garantia da qualidade visando credibilidade técnica das medidas obtidas.



O controle de qualidade interno requer que:

- características como faixa de concentração, sensibilidade, seletividade, sejam adequadas ao método que está sendo validado;
- os equipamentos do laboratório e acessórios técnicos sejam compatíveis com o método analítico;
- o laboratório tenha condições adequadas para a manutenção dos instrumentos analíticos;
- a cadeia de suprimento de reagentes, solventes, gases, bem como material de referência certificado e misturas, sejam controlados;
- o pessoal do laboratório seja suficientemente treinado e qualificado para operações analíticas.

Seletividade ou especificidade – refere-se à sua capacidade de resposta a um determinado composto de interesse associado a uma matriz com várias substâncias químicas detectáveis ou não. Como existem poucos métodos que respondem a um único analito, o termo seletividade é usualmente o mais empregado.

Limite de detecção – refere-se à menor concentração de um analito em uma amostra, que pode ser detectada por um procedimento analítico ao qual se associa um nível de confiança especificado, mas não necessariamente quantificado.

Linearidade – é expressa pela sua habilidade em gerar resultados que sejam diretamente proporcionais às concentrações do analito em amostras, correspondente à uma determinada faixa de concentração.

Exatidão – refere-se ao grau de concordância entre o resultado de uma medição e um valor verdadeiro do mensurando. Exatidão em procedimentos analíticos refere-se à concordância entre o valor real (valor de referência) da concentração de um analito em uma amostra e o estimado pelo processo analítico. Uma baixa exatidão resulta de erros sistemáticos que contribuem para desvios ou tendências (*bias*) nos resultados

Repetitividade – refere-se ao grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade.

Reprodutibilidade – refere-se ao grau de concordância entre os resultados de medições de um mesmo mensurando, efetuadas sob condições variadas de medição.

Robustez – é a medida da sua capacidade de permanecer inalterado frente a pequenas, mas deliberadas, variações dos parâmetros associados ao método, demonstrando sua confiabilidade durante seu uso na rotina de trabalho.

Análise Descritiva

O objetivo da inferência estatística é tirar conclusões ou tomar decisões a respeito de uma população baseada em uma amostra selecionada da população. A inferência estatística utiliza valores calculados a partir de observações na amostra. Os parâmetros básicos que caracterizam uma população (universo) de amostras ou medidas são a média (μ), e o desvio padrão (σ). A menos que a população inteira seja analisada, μ e σ não podem ser conhecidos, mas são estimados de uma amostra aleatoriamente selecionada representativa do todo.

Após a coleta dos dados de uma determinada medida, necessário é que se analisem estes dados, em termos de não-conformidades, distribuição, etc. Dá-se a este tratamento estatístico dos dados o nome de análise descritiva dos dados. Nesta primeira análise busca-se identificar graficamente ou através de testes estatísticos, as observações (valores) discrepantes com relação à amostra como um todo.

Medidas de Tendência Central (média aritmética)

É a mais comum das medidas de tendência central. É calculada somando-se as n observações originais e dividindo-se por n.

$$\overline{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n} X_i$$

Medidas de Dispersão

Amplitude (R)

É o valor que representa o afastamento entre o maior e o menor valor de um conjunto de observações.

Variância (s^2)

A variância de um conjunto de dados é, por definição, a média dos quadrados das diferenças, dos valores em relação à sua média, isto é,

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n} (X_i - \overline{X})^2}{n-1} = \frac{SQT}{n-1}$$

Desvio padrão (s)

É definido como a raiz quadrada positiva da variância.

Identificação de valores outliers

Gráfico de Box

É utilizado, para se identificar valores outlier ou extremos, em uma determinada distribuição. O gráfico de Box é construído da seguinte forma:

1 - Calcula-se a mediana, o quartil inferior (Q1) e o quartil superior (Q3);

2 - Subtrai-se o quartil superior do quartil inferior = (L)

3 - Os valores que estiverem no intervalo de Q3+1,5L e Q3+3L e no intervalo Q1-1,5L e Q1-3L, serão considerados outliers podendo, portanto ser aceitos na população com alguma suspeita;

4 - Os valores que forem maiores que Q3+3L e menores que Q1-3L devem ser considerados suspeitos de pertencer à população, devendo ser investigada a origem da dispersão. Estes pontos são chamados de extremos.

Teste de Grubbs

Este teste também é utilizado para se tomar decisões sobre valores outliers.

O procedimento é o seguinte:

1 - Ordenar os valores em ordem crescente, isto é:

$x_1 < x_2 < x_3 < \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots < x_{n-1} < x_n$

2 - Supor a hipótese de que o menor valor, x_1, ou se o maior valor, x_n, são suspeitos como valores outliers.

3 - Estime (calcule) o desvio padrão de todos os valores.

4 - Calcule T da seguinte forma:

$$T = \frac{\overline{X} - X_1}{s} \quad \text{ou} \quad T = \frac{X_n - \overline{X}}{s}$$

5 - Selecione o risco desejado de falsa rejeição.

6 - Compare os valores calculados com os valores tabelados. Se T for maior que o valor tabelado, a rejeição pode ser feita com o risco associado.

Teste de Dixon

Este teste tem por objetivo identificar valores afastados da amostra. Tem a vantagem que não é necessário o conhecimento da estimativa do desvio padrão. Para operacionalizar a realização do teste deve-se seguir o seguintes passos:

1 - Ordenar os valores em ordem crescente, isto é:

$x_1 < x_2 < x_3 < \ldots\ldots\ldots\ldots < x_{n-1} < x_n$

2 - Supor a hipótese de que o menor valor, x1, ou se o maior valor, xn, são suspeitos como valores outliers.

3 - Selecionar o risco desejado de falsa rejeição.

4 - Calcular as seguintes equações, de acordo com o tamanho da amostra:

n	Razão	se x_n é suspeito	se x_1 é suspeito
$3 \leq n \leq 7$	τ_{10}	$(x_n - x_{n-1}) / (x_n - x_1)$	$(x_2 - x_1) / (x_n - x_1)$
$8 \leq n \leq 10$	τ_{11}	$(x_n - x_{n-1}) / (x_n - x_2)$	$(x_n - x_1) / (x_{n-1} - x_1)$
$11 \leq n \leq 13$	τ_{21}	$(x_n - x_{n-2}) / (x_n - x_2)$	$(x_3 - x_1) / (x_{n-1} - x_1)$
$14 \leq n \leq 25$	τ_{22}	$(x_n - x_{n-2}) / (x_n - x_3)$	$(x_3 - x_1) / (x_{n-2} - x_1)$

5 - Comparar as razões calculadas com os valores da tabela.

Caso o valor encontrado seja maior, então a suposição de outlier existe.

Teste de Cochran

O teste descrito por Cochran pode ser usado quando se deseja decidir se uma estimativa de variância é excessivamente grande ou não, em comparação com um grupo. Por exemplo, se a variância reportada por um laboratório é excessivamente grande em comparação com outros membros do grupo, então devemos proceder ao teste de Cochran. Para se realizar o teste :

1 – Calcula-se as variâncias que serão comparadas;

2 – Soma-se todas as variâncias;

3 - Calcula-se a razão entre a variância suspeita e o somatório de todas as variâncias.

Se o valor calculado da razão for maior que o da tabela, a variância em questão é considerada como sendo não homogênea.

Intervalo de Confiança

Um intervalo estimado de um parâmetro é o intervalo entre duas estatísticas que inclui o valor verdadeiro do parâmetro, com alguma probabilidade. O intervalo de confiança da média é um dos mais comuns cálculos estatísticos. Ele representa o intervalo, com uma determinada probabilidade, onde a média verdadeira de uma população está contida. O intervalo de confiança da média dependerá do número de observações, do desvio padrão e do nível de confiança desejado.

O intervalo de confiança é calculado usando a expressão:

$$IC = \frac{t \times s}{\sqrt{n}}$$

onde:

t - é o valor da distribuição de Student, ao nível de confiança desejado (normalmente se utiliza um nível de confiança de 95%) e graus de liberdade n-1.

n - é tamanho da amostra

s - é o desvio padrão amostral

Repetitividade

“Grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando efetuadas sob as mesmas condições de medição” - VIM (Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia - 1995 -INMETRO).

Para se conhecer a repetitividade de um processo, onde se queira considerar todas as possíveis variabilidades do mesmo, deve-se planejar um experimento com esse fim, de tal forma que se obtenha resultados realizados no menor intervalo de tempo permitido pelo processo de medição.

Reprodutibilidade

“ Grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, efetuadas sob condições variadas de medição” - VIM (Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia - 1995 -INMETRO).

Para se conhecer a reprodutibilidade de um processo, ao nível de 95 % de confiança, onde se queira considerar todas as possíveis variabilidades do mesmo, deve-se planejar um experimento com esse fim, de tal forma que se obtenha resultados que possam ser considerados como em reprodutibilidade, isto é, quando se muda um fator de variabilidade, operador, dia, máquina, etc., ou quando o tempo de realização entre estas observações for suficientemente grande, quando comparado com o tempo mínimo possível de realizar uma duplicata.

Para um único critério de classificação (ONE-WAY ANOVA)

- Objetivo:

Comparar os efeitos de **a** tratamentos (ou níveis de um fator) alocados aleatoriamente às unidades experimentais (experimento completamente aleatorizado)

Matriz de observações para n réplicas de um experimento:

Tratamento	Observações	Total
1 2 . . . a	$Y_{11} Y_{12} Y_{13} \quad Y_{1n}$ $Y_{21} Y_{22} Y_{23} \quad Y_{2n}$ $Y_{a1} Y_{a2} Y_{a3} \quad Y_{an}$	$Y_{1.}$ $Y_{2.}$ $Y_{a.}$
Total		$Y_{..}$

Notação:

$Y_{i.} = \Sigma_j Y_{ij}$ (total das observações sob o tratamento i)

$\overline{Y}_{i.} = Y_{i.}/n$ (média das observações sob o tratamento i)

$Y_{..} = \Sigma_i \Sigma_j Y_{ij}$ (total global das observações)

$N = n \times a$ (número total das observações)

$\overline{Y}_{..} = Y_{..}/N$ (média global das observações)

Procedimento para teste:

Análise de variância - partição total nas componentes:

Efeito do fator;

Erro aleatório.

Soma dos quadrados (corrigida) total ou variação total:

SQT = $\sum_i \sum_j \left(Y_{ij}-\bar{Y}_{..}\right)^2$ (Temos axn operações de subtração)

Partição da variação total:

$$\sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{n}\left[(y_{ij}-\bar{y}_{i.})+(\bar{y}_{i.}-\bar{y}_{..})\right]^2 = n\sum_{i=1}^{a}(\bar{y}_{i.}-\bar{y}_{..})^2 + \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{n}(y_{ij}-\bar{y}_{i.})^2 + 2\sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{n}(y_{ij}-\bar{y}_{i.})(\bar{y}_{I.}-\bar{y}_{..}) \quad ^{(1)}$$

(1) A última parcela da equação anterior se anula, então:

$$= {}^{(2)}\, n\sum_i\left(\bar{Y}_{i.}-\bar{Y}_{..}\right)^2 + \sum_i\sum_j\left(Y_{ij}-\bar{Y}_{i.}\right)^2 = \text{SQF} + \text{SQE}$$

(2) Temos a parcelas de subtração, por isso é necessário multiplicar por n.

SQF - soma dos quadrados devida ao fator ou tratamento;

SQE - soma dos quadrados devida ao erro.

Equação básica do modelo one-way anova:

SQT = SQF + SQE

Quadrados médios e número de graus de liberdade (GL):

Para o fator : **QMF = SQF/(a-1)** GL = (a-1)

Para o erro : **QME = SQE/(N-a)** GL = (N-a)

Análise estatística:

Sob as condições do modelo, a estatística

$$\mathbf{F_0 = QMF/QME}$$

Tem distribuição F com (a-1) GL no numerador e (N-a)GL no denominador.

Se $F_0 > F_{\alpha;a-1,N-a}$, a hipótese H_0 de igualdade dos efeitos deve ser rejeitada para o nível de significância α .

Tabela ANOVA (**AN**alysis **O**f **VA**riance)

Fonte de variação	Graus de Liberdade	Somas dos Quadrados	Quadrados médios	F_0
Fator	a-1	SQF	QMF	QMF/QME
Erro	N-a	SQE	QME	
Total	N-1	SQT		

Fórmulas para cálculo:

$$SQT = \sum_i \sum_j \left(Y_{ij} - \bar{Y}_{..}\right)^2 = \sum_i \sum_j Y_{ij}^2 - Y_{..}^2 / N$$

$$SQF = n\Sigma\left(\bar{Y}_{i.} - \bar{Y}_{..}\right)^2 = \left(1/n\right)\Sigma\, Y_{i.}^2 - Y_{..}^2 / N$$

SQE = SQT-SQF

Avaliação da repetitividade e da reprodutibilidade

Análise intermediária:

Dia	Réplica 1	Réplica 2
1	31,2	31,7
2	30,9	30,9
3	30,7	30,9
4	31,1	31,5
5	31,3	31,6
6	31,4	31,6
7	31,4	31,4

$$s_{entre}^2 = \left(MQ_{entre} - MQ_{dentro}\right)/\,n$$

$$s_r^2 = MQ_{dentro}$$

$$s_R^2 = \left(s_r^2 + s_{entre}^2\right)$$

CONTROLE DO PROCESSO DE MEDIÇÃO (Carta de Controle de Shewhart)

É a ferramenta visual e estatística para se controlar um processo de medição.

A carta de controle é construída baseada em dados históricos ou dados de um experimento. Normalmente, em um laboratório de química analítica, utiliza-se as cartas construídas com dados de um experimento, após analisar os fatores de variabilidades e concluir pela homogeneidade estatística dos mesmos.

Basicamente pode-se construir quatro tipos de carta: carta de médias, carta de observações individuais, carta de amplitude de observações e carta de amplitude móvel.

Acompanhamento do Processo

No procedimento operacional do método de ensaio deve constar a periodicidade de observações para acompanhamento do processo e também quais as condições estatísticas em que se fará a intervenção no processo ou sua checagem. Pode-se considerar critérios para detecção de causas especiais os seguintes:

1 - qualquer ponto fora dos limites de controle;

2 - dois pontos sucessivos fora dos limites de dois desvios;

3 - quatro pontos sucessivos fora dos limites de um desvio;

4 - alguma tendência sistemática.

Após qualquer intervenção no processo, o mesmo deve passar por uma validação estatística.

Material de referência certificado

Quando nos deparamos com uma amostra de referência certificada, com rastreabilidade, onde o valor informado no certificado é resultado de testes com confiabilidade, e queremos verificar se o nosso processo de medição está apto, em termos de exatidão. Inicialmente devemos realizar algumas observações (no mínimo seis), verificamos se as mesmos se encontram distribuídos conforme a distribuição normal e então analisaremos conforme abaixo:

Trabalharemos com a hipótese nula de igualdade das médias e hipótese alternativa de diferença das médias

$H0 : \mu 1 = \mu 0$

$H1 : \mu 1 \neq \mu 0$

A estatística teste adequada é calculada da seguinte forma:

Onde:

$$t_0 = \frac{\overline{X} - \mu_0}{s/\sqrt{n}}$$

Para que a hipótese nula não seja rejeitada é necessário que o módulo do valor da estatística teste encontrado seja menor que o valor tabelado na distribuição de Student, para os graus de liberdade adequados, isto é, GL = n -1.

$\overline{X}$ - média

μ_0 - o valor do MRC

s - desvio padrão amostral

n - tamanho da amostra

Comparação de médias

Podem ser resultados obtidos por equipamentos diferentes, por técnicas diferentes, por operadores diferentes, etc. Inicialmente devemos verificar se os valores estão distribuídos normalmente. Verificado este aspecto dos dados, realiza-se um teste de hipótese chamado de Comparação de Médias com Variâncias Desconhecidas, onde algumas hipóteses alternativas (H1) podem ser consideradas, pois a hipótese principal ou como é chamada, hipótese nula (H0), é a igualdade das médias.
Hipóteses alternativas:
1 - a média da primeira amostra é maior do que a média da segunda amostra;
2 - a média da primeira amostra é menor que a média da segunda amostra.
Trabalharemos apenas com a hipótese alternativa de que as médias são diferentes:
H0 : $\mu 1 = \mu 2$
H1 : $\mu 1 \neq \mu 2$
A estatística teste apropriada é calculada da seguinte forma:

$$t_0 = \frac{\overline{X}_1 - \overline{X}_2}{s_p \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Onde :

$$s_p = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

Modelos fatoriais

Definições básicas

Experimentos fatoriais permitem estudar os efeitos de dois ou mais fatores simultaneamente. Um experimento fatorial é um experimento no qual, em cada réplica são efetuadas todas as combinações dos níveis dos fatores. Uma interação significativa entre os fatores pode mascarar o efeito do fator principal.

Experimento fatorial com dois fatores fixos

Fator A com "a" níveis;

Fator B com "b" níveis;

Número "n" de réplicas

Matriz de observações

	Fator B			
Fator A	1	......	b	Total
1	$y_{111}y_{112}\ldots y_{11n}$	......	$y_{1b1}y_{1b2}\ldots y_{1bn}$	$y_{1..}$
.	$y_{a11}y_{a12}\ldots y_{a1n}$	......	$y_{ab1}y_{ab2}\ldots y_{abn}$	ya..
.				
.				
a				
Total	$y_{.1.}$		$y_{.b.}$	$y_{...}$

Notação:

$y_{i..} = \Sigma_j \Sigma_k y_{ijk}$ $\quad \bar{y}_{i..} = y_{i..} / bn \quad ; i = 1,2,...,a$

$y_{.j.} = \Sigma_i \Sigma_k y_{ijk}$ $\quad \bar{y}_{.j.} = y_{.j.} / an \quad ; j = 1,2,...,b$

$y_{ij.} = \Sigma_k y_{ijk}$ $\quad \bar{y}_{ij.} = y_{ij.} / n \quad ; \begin{cases} i = 1,2,\ldots,a \\ j = 1,2,\ldots,b \end{cases}$

$y_{...} = \Sigma_i \Sigma_j \Sigma_k y_{ijk}$ $\quad \bar{y}_{...} = y_{...} / abn$

Análise estatística

Partição da soma de quadrados e graus de liberdade:

$SQT = \Sigma_i \Sigma_j \Sigma_k (y_{ijk} - \bar{y}_{...})^2$ (**a**x**b**x**n** parcelas)

$$SQT = \Sigma_i \Sigma_j \Sigma_k \left[\left(\bar{y}_{i..} - \bar{y}_{...} \right) + \left(\bar{y}_{.j.} - \bar{y}_{...} \right) + \left(\bar{y}_{ij.} - \bar{y}_{i..} - \bar{y}_{.j.} + \bar{y}_{...} \right) + \left(\bar{y}_{ijk} - \bar{y}_{ij.} \right) \right]^2$$

$$= bn\Sigma_i \left(\bar{y}_{i..} - \bar{y}_{...} \right)^2 + an\Sigma_j \left(\bar{y}_{.j.} - \bar{y}_{...} \right)^2 + n\Sigma_i \Sigma_j \left(\bar{y}_{ij.} - \bar{y}_{i..} - \bar{y}_{.j.} + \bar{y}_{...} \right)^2 \Sigma_i \Sigma_j \Sigma_k \left(y_{ijk} - \bar{y}_{ij.} \right)^2$$

SQT = SQA + SQB + SQAB + SQE

GL $\rightarrow$ abn-1 = (a-1) + (b-1) + (a-1)(b-1) + ab(n-1)

Os quocientes entre os quadrados médios de cada fator e da interação e o quadrado médio do erro refletem as influências dos fatores respectivos e da interação.

FV	GL	SQ	QM	F_0
Fator A	a-1	SQA	QMA	QMA/QME
Fator B	b-1	SQB	QMB	QMB/QME
Interação	(a-1)(b-1)	SQAB	QMAB	QMAB/QME
Erro	ab(n-1)	Diferença	QME	
Total	abn-1	SQT		

Facilitadores de cálculo:

C = $y_{...}^2 / abn$

SQT = $\Sigma_i \Sigma_j \Sigma_k \, y_{ijk}^2 - C$

SQA = $\frac{1}{bn} \Sigma_i \, y_{i..}^2 - C$

SQB = $\frac{1}{an} \Sigma_j \, y_{.j.}^2 - C$

SQAB = SQ(subtotal) - SQA - SQB → SQ(subtotal) = $\frac{1}{n} \Sigma_i \Sigma_j \, y_{ij.}^2 - C$

SQE = SQT - SQA - SQB - SQAB = SQT - SQ(subtotal)

Experimentos Hierárquicos ou Aninhados

Em alguns experimentos multifatoriais, os níveis de um fator (B, por exemplo) não são os mesmos para os níveis do outro fator (A, por exemplo). Um tal experimento é denominado hierárquico ou aninhado, com níveis do fator B aninhados nos níveis do fator A.

Ilustração para experimento hierárquico em dois estágios:

Fornecedores (A)	1				2			
Lotes (B)	1	2	3	4	1	2	3	4
Observações	y_{111} y_{112} y_{113}	y_{121} y_{122} y_{123}	y_{131} y_{132} y_{133}	y_{141} y_{142} y_{143}	y_{211} y_{212} y_{213}	y_{221} y_{222} y_{223}	y_{231} y_{232} y_{233}	y_{241} y_{242} y_{243}

- O índice j(i) indica que o nível j do fator B está aninhado ao nível i do fator A.
- A notação $\varepsilon_{(ij)k}$ é para explicitar que as réplicas estão aninhadas dentro das combinações dos níveis de A e de B.
- Uma vez que cada nível de B não aparece com cada nível de A, não pode haver interação entre A e B.
- O modelo é balanceado porque existe um mesmo número de níveis do fator B para cada nível do fator A e um mesmo número de réplicas para cada combinação dos níveis dos fatores A e B.

Partição da soma dos quadrados:

$$SQT = \Sigma_i\Sigma_j\Sigma_k\,(y_{ijk} - \bar{y}_{...})^2 = \Sigma_i\Sigma_j\Sigma_k\,(y_{ijk} - \bar{y}_{i..} + \bar{y}_{i..} + \bar{y}_{ij.} - \bar{y}_{ij.} - \bar{y}_{...})^2$$

$$SQT = \Sigma_i\Sigma_j\Sigma_k\,[(\bar{y}_{i..} - \bar{y}_{...}) + (\bar{y}_{ij.} - \bar{y}_{i..}) + (y_{ijk} - \bar{y}_{ij.})]^2$$

$$SQT = bn\,\Sigma_i\,(\bar{y}_{i..} - \bar{y}_{...})^2 + n\,\Sigma_i\,\Sigma_j\,(\bar{y}_{ij.} - \bar{y}_{i..})^2 + \Sigma_i\Sigma_j\Sigma_k\,(y_{ijk} - \bar{y}_{ij.})^2$$

$$SQT = SQA + SQB(A) + SQE$$

SQB(A) = soma dos quadrados devido ao fator B, sob os níveis de A.

Facilitador de cálculo:

$$C = \frac{y^2_{...}}{abn}$$

$$SQT = \Sigma_i\Sigma_j\Sigma_k\,y^2_{ijk} - C$$

$$SQA = \frac{1}{bn}\Sigma_i\,y^2_{i..} - C$$

$$SQB(A) = SQB + SQAB = \frac{1}{n}\Sigma_i\Sigma_j\,y^2_{ij.} - \frac{1}{bn}\Sigma_i\,y^2_{i..}$$

$$SQE = SQT - SQA - SQB(A)$$

Graus de liberdade (GL):

Fator não aninhado : a - 1

Fator aninhado : a(b - 1)

Erro: ab(n - 1)

Total: abn - 1

Estatística F

Quando os dois fatores são fixos:

Fator não aninhado : QMA/QME

Fator aninhado : QMB(A)/QME

Quando os dois fatores são aleatórios:

Fator não aninhado : QMA/QMB(A)

Fator aninhado : QMB(A)/QME

Quando os fatores são mistos:

Fator não aninhado fixo : QMA/QMB(A)

Fator aninhado aleatório : QMB(A)/QME

Exemplo:

Um laboratório suspeita que as medidas de teor de sacarina em adoçante estão sendo comprometidas pelo Ácido utilizado na extração. A fim de solucionar o problema, o laboratório toma quatro lotes de dois fabricantes do ácido e realiza um experimento hierárquico aninhado colocando os lotes aninhados aos fornecedores, como demonstrado abaixo:

Fornecedores (A)	Fornecedor 1				Fornecedor 2			
Lotes (B)	1	2	3	4	1	2	3	4
Observações	3,3 3,4 3,6	2,9 3,6 3,0	3,1 2,9 3,1	3,8 3,1 3,3	3,3 2,9 3,5	3,8 3,6 3,7	3,0 2,9 3,5	2,9 3,6 3,2
$y_{ij}.$	10,3	9,5	9,1	10,2	9,7	11,1	9,4	9,7
$y_{i}..$	39,1				39,9			

$$\frac{1}{n} \qquad \frac{1}{bn}$$

C = = 6241/24 = 260,04

SQT = $\Sigma_i\Sigma_j\Sigma_k\ y^2_{ijk}$ - C = ($3{,}3^2 + 3{,}4^2 + 3{,}6^2 + 2{,}9^2$ + ...+$3{,}6^2 + 3{,}2^2$) - 260,04

= 262,26 - 260,04 = 2,22

SQA = $\Sigma_i\ y^2_{i..}$ - C = 3120,82/12 - 260,0417 = 0,0267

SQB(A) = SQB + SQAB = $\Sigma_i\Sigma_j\ y^2_{ij.}$ - $\Sigma_i\ y^2_{i..}$ = 260,98 - 260,0783 = 0,91

SQE = SQT - SQA - SQB(A) = 2,22 - 0,0267 - 0,9117 = 1,28

Considerando-se que os dois fatores sejam fixos:
Tabela ANOVA

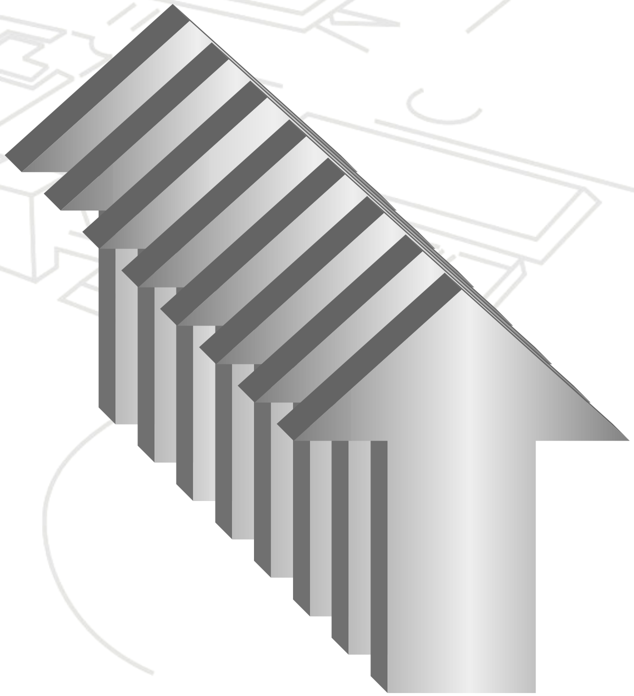
FV	GL	SQ	QM	F
Fornecedores	(a-1) = 1	0,0267	0,0267	0,33
Lotes (fornec)	a(b-1) = 6	0,91	0,1517	1,89
Erro	ab(n-1) = 16	1,28	0,08	
Total	abn-1 = 23			

Faixa de Análise

- Dentro da faixa de trabalho pode existir uma faixa de resposta linear e dentro desta, a resposta do sinal terá uma relação linear com o analito ou valor da propriedade. A extensão dessa faixa pode ser estabelecida durante a avaliação da faixa de trabalho.

- A faixa linear de trabalho de um método de ensaio é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com a exatidão e linearidade exigidas, sob as condições especificadas para o ensaio.

- A faixa linear é definida como a faixa de concentrações na qual a sensibilidade pode ser considerada constante e é normalmente expressa nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico.



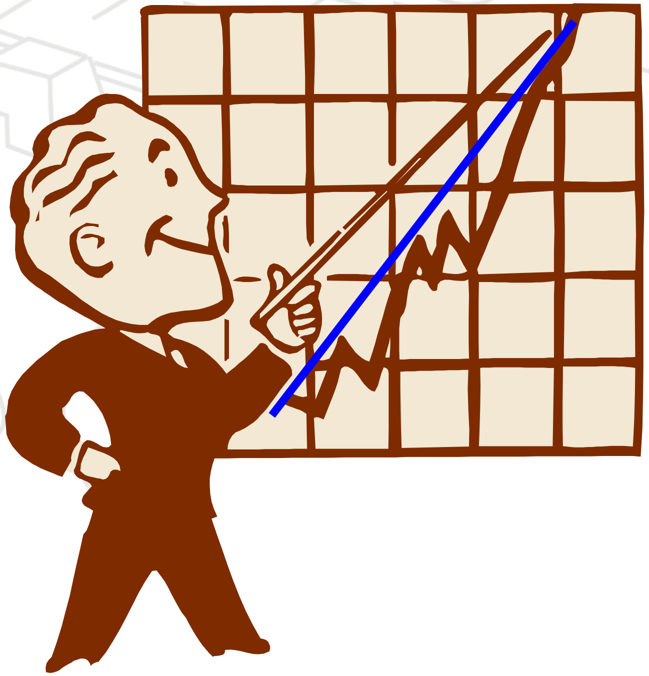
Linearidade

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X$$

$$\beta_1 = \frac{\Sigma XY - (\Sigma X)(\Sigma Y)/n}{\Sigma X^2 - (\Sigma X)^2/n}$$

$$\beta_0 = \overline{Y} - \beta_1 \overline{X}$$

- Deve-se estabelecer um coeficiente para verificar se o modelo utilizado está correto, observando a linearidade do método empregado.



$$QC = 100 * \sqrt{\frac{\sum \left(\frac{y_i - \hat{y}_i}{\hat{y}_i}\right)^2}{n-1}}$$

Linearidade

Fonte de Variação	SQ	gl	MQ	F
Regressão	$SQ_R = \sum_i^m \sum_j^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	p-1	$MQ_R = \frac{SQ_R}{p-1}$	$\frac{MQ_R}{MQ_r}$
Resíduo	$SQ_r = \sum_i^m \sum_j^n (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	n-p	$MQ_r = \frac{SQ_r}{n-p}$	
Falta de ajuste	$SQ_{fa} = \sum_i^m \sum_j^n (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	m-p	$MQ_{fa} = \frac{SQ_{fa}}{m-p}$	$\frac{MQ_{fa}}{MQ_{erro}}$
Erro puro	$SQ_{erro} = \sum_i^m \sum_j^n (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	n-m	$MQ_{erro} = \frac{SQ_{erro}}{n-m}$	
Total	$SQ_T = \sum_i^m \sum_j^n (y_{ij} - \bar{y})^2$	n-1	$MQ_T = \frac{SQ_T}{n-1}$	

% de variação explicada: $\frac{SQ_R}{SQ_T} * 100$

% máximo de variação explicada: $\frac{(SQ_T - SQ_{erro})}{SQ_T} * 100$

$$
\begin{tikzcd}
 & SQ_{\text{total}} \arrow[dl] \arrow[dr] & & \\
SQ_{\text{regressão}} & & SQ_{\text{resíduo}} \arrow[dl] \arrow[dr] & \\
 & SQ_{\text{erro puro}} & & SQ_{\text{falta de ajuste}}
\end{tikzcd}
$$

$$\Downarrow$$

$$\boxed{F = MQ_{\text{falta de ajuste}}/MQ_{\text{erro puro}}}$$

Procedimento para análise estatística e avaliação dos laboratórios

A1. Determinação do valor de consenso

Os dados serão tratados de acordo com os procedimentos descritos na ISO 5725 partes 1 e 2. Primeiramente, através do recebimento dos resultados dos laboratórios participantes, os dados serão computados, calculando-se em seguida a média total (Y), o desvio-padrão relativo à repetitividade (s_r), o devio-padrão entre laboratórios (s_l) e o desvio-padrão relativo à reprodutibilidade.

O valor de consenso é apresentado na Equação 1.

$$Y = \frac{\sum_{i=1}^{p} n_i . y_i}{\sum_{i=1}^{p} n_i} \qquad \text{Eq. (01)}$$

onde n_i representa o número de resultados reportados pelo laboratório *i*, y_i representa a média de resultados do laboratório *i* e *p* o número total de laboratórios participantes.

O desvio-padrão relativo à repetitividade está apresentado na Equação 2.

$$s_r^2 = \frac{\sum_{i=1}^{p}(n_i - 1).s_i^2}{\sum_{i=1}^{p}(n_i - 1)} \qquad \text{Eq. (02)}$$

onde s_i é o desvio-padrão relativo à repetitividade dos resultados do laboratório *i*.

O desvio-padrão entre laboratórios é calculado de acordo com a Equação 3.

$$s_l^2 = \frac{s_d^2 - s_l^2}{\eta} \qquad \text{Eq. (03)}$$

onde

$$s_d^2 = \frac{1}{p-1}.\sum_{i=1}^{p} n_i.(y_i - Y)^2 \qquad \text{Eq. (04)}$$

$$\eta = \frac{1}{p-1} \cdot \left[\sum_{i=1}^{p} n_i - \frac{\sum_{i=1}^{p} n_i^2}{\sum_{i=1}^{p} n_i} \right] \qquad \text{Eq. (05)}$$

O desvio-padrão relativo à reprodutibilidade é calculado seguindo a Equação 6.

$$s_R^2 = s_l^2 + s_r^2 \qquad \text{Eq. (06)}$$

Além disso, a análise dos dados envolverá o cálculo da mediada (y_{med}), a mediana das diferenças absolutas (MedDA) e a média das diferenças absolutas (MDA).

As diferenças absolutas são calculadas através da Equação 7.

$$d_i = |y_i - y_{med}| \qquad \text{Eq. (07)}$$

O procedimento para checagem de valores "outliers" segue a ISO 5725-2. Cabe salientar que o valor de consenso será recalculado após a retirada de valores "outliers".

A 2. Avaliação dos resultados dos laboratórios

Para a qualificação dos resultados dos laboratórios, o z-score será calculado, representando uma medida da distância relativa do laboratório em relação ao valor de referência.

O z-score é definido na Equação 8.

$$z_i = \frac{y_i - y_{ref}}{y_{ref}.RSD} \qquad \text{Eq. (08)}$$

onde y_{ref} representa o valor de referência, y_i o resultado do laboratório *i*.

A interpretação do z-score é apresentada a seguir:

$|z| \leq 2$ Resultado Satisfatório

$2 < |z| < 3$ Resultado Questionável

$|z| \geq 3$ Resultado Insatisfatório

Determinação de valor de consenso

$$Y = \frac{\sum_{i=1}^{p} n_i . y_i}{\sum_{i=1}^{p} n_i}$$

Variância relativa à repetitividade

$$s_r^2 = \frac{\sum_{i=1}^{p} (n_i - 1) . s_i^2}{\sum_{i=1}^{p} (n_i - 1)}$$

Variância entre laboratórios

$$s_l^2 = \frac{s_d^2 - s_l^2}{\eta}$$

Variância relativa à reprodutibilidade

$$s_R^2 = s_l^2 + s_r^2$$

ISO 5725

2. Checagem de valores "outliers" seguindo a ISO 5725-2

3. Avaliação de desempenho

$$z_i = \frac{y_i - y_{ref}}{y_{ref}.CV}$$

onde y_{ref} representa o valor de referência, y_i o resultado do laboratório i. O coeficiente de variação aplicado no ensaio de proficiência pode ser previamente estabelecido pelo coordenador.

A interpretação do z-score é apresentada a seguir:

$z < 2$	Resultado Satisfatório
$2 < z < 3$	Resultado Questionável
$z > 3$	Resultado Insatisfatório

Estudo de caso – etano em amostra de gás natural

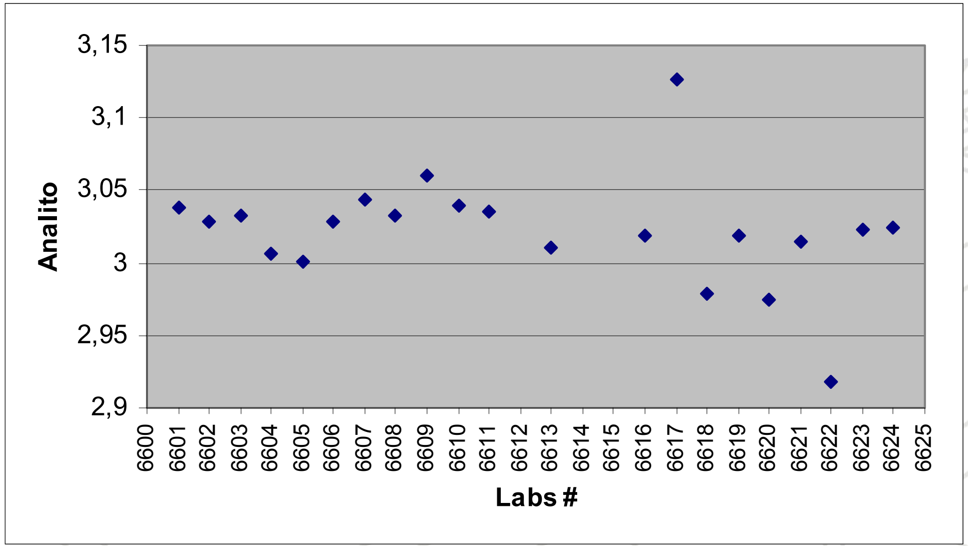
1. Estudo de homogeneidade do material a ser enviado aos participantes

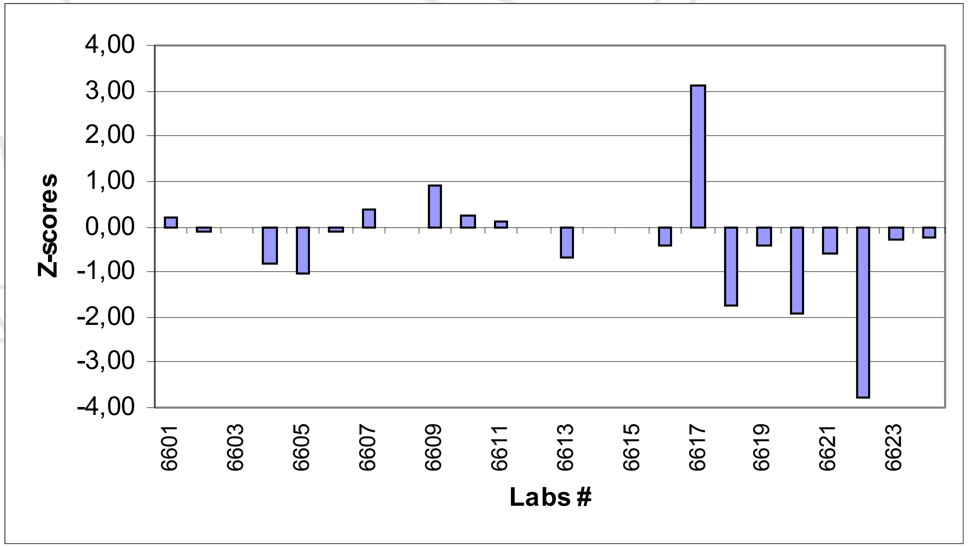
Área	valor 1	valor 2	valor 3	valor 4	valor 5	Média	s	n
SC0443	1636551	1637095	1636370	1635628	1636501	1636429	526,476	5
SC1345	1636026	1636485	1636111	1635884	1636139	1636129	222,370	5
SC0451	1635950	1635860	1636182	1635806	1636153	1635990	170,139	5
SC0139	1635721	1635639	1635750	1635609	1635499	1635644	99,297	5
SC1617	1636115	1636138	1636643	1636243	1636045	1636237	237,918	5
SC1599	1636451	1637057	1637055	1637229	1636807	1636920	302,161	5
SC1291	1636891	1637296	1637706	1637797	1638198	1637578	500,059	5

Média total =	1636418	%
sr =	330	0,020
sbb =	628	0,038
sR =	709	0,043
p =	7	
Mediana =	1636237	
MAD =	428	0,026
AAD =	478	0,029

Desempenho dos laboratórios participantes

Cód. dos Labs.	média	desvpad	n	Diferença (%)	z-score
6601	3,038	0,0040	3	0,014	0,20
6602	3,029	0,0002	2	0,005	-0,10
6603	3,032	0,0080	3	0,008	0,00
6604	3,007	0,0015	3	0,017	-0,82
6605	3,001	0,0012	2	0,023	-1,02
6606	3,029	0,0009	6	0,005	-0,10
6607	3,043	0,0040	3	0,019	0,36
6608	3,032	0,0013	3	0,008	0,00
6609	3,060	0,0007	10	0,036	0,92
6610	3,040	0,0008	5	0,016	0,26
6611	3,035	0,0018	6	0,011	0,10
6612					
6613	3,011	0,0012	3	0,013	-0,69
6614					
6615					
6616	3,019	0,0010	3	0,005	-0,43
6617	3,127		1	0,103	3,13
6618	2,979	0,0260	8	0,045	-1,75
6619	3,019	0,0160	3	0,005	-0,43
6620	2,974	0,0130	5	0,050	-1,91
6621	3,014	0,0006	3	0,010	-0,59
6622	2,918	0,0014	2	0,106	-3,76
6623	3,023	0,0060	3	0,001	-0,30
6624	3,024	0,0050	5	0,000	-0,26


Analito
3,15
3,1
3,05
3
2,95
2,9
6600 6601 6602 6603 6604 6605 6606 6607 6608 6609 6610 6611 6612 6613 6614 6615 6616 6617 6618 6619 6620 6621 6622 6623 6624 6625
Labs #


Z-scores
4,00
3,00
2,00
1,00
0,00
-1,00
-2,00
-3,00
-4,00
6601 6603 6605 6607 6609 6611 6613 6615 6617 6619 6621 6623
Labs #

Obrigada !

www.inmetro.gov.br

dicla@inmetro.gov.br

rmborges@inmetro.gov.br