

Avaliação de limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$) a partir de curvas analíticas em análises de águas para substâncias com teores permitidos: uma planilha eletrônica para a interpretação de resultados em Laboratórios de Saúde Pública

Estimating the decision limit ($CC\alpha$) and the capability of detection ($CC\beta$) from analytical curves on water analysis for substances with permitted limits: an electronic spreadsheet for results interpretation in Public Health Laboratories

RIALA6/1600

Sérgio DOVIDAUSKAS^{1*}, Isaura Akemi OKADA¹, Marina Miyuki OKADA¹, Rita de Cássia BRIGANTI¹, Camila Cardoso de OLIVEIRA²

Endereço para correspondência: ¹Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas, Centro de Laboratórios Regional de Ribeirão Preto, Instituto Adolfo Lutz, R. Minas 877, CEP 14085-410, Ribeirão Preto, SP. E-mail: sergio2794@terra.com.br

²Núcleo de Análise e Tratamento de Dados, Centro de Materiais de Referência, Instituto Adolfo Lutz

Recebido: 11.03.2014 - Aceito para publicação: 30.06.2014

RESUMO

Neste trabalho são apresentadas planilhas eletrônicas construídas em software *Microsoft Excel*[®] que possibilitam avaliar as estimativas de limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$) nas regiões do limite de detecção e do Valor Máximo Permitido (VMP). As estimativas são realizadas a partir de curvas analíticas lineares e homoscedásticas construídas em procedimentos de calibração segundo as normas ISO e recomendações IUPAC. Após a validação por processamento manual dos dados, as planilhas eletrônicas foram utilizadas nas determinações de nitrito em águas envasadas (VMP = 0,02 mg/L) e de fluoreto em águas de abastecimento público (intervalo de conformidade = 0,6 a 0,8 mg/L). Na análise de fluoreto, em que existe um valor mínimo requerido (0,6 mg/L) e um valor máximo aceitável (0,8 mg/L) para a concentração, a planilha calcula a concentração crítica em ambos os limites com uma probabilidade de erro tipo I igual a 0,05. Desta forma, as planilhas eletrônicas permitem efetuar a rápida decisão entre conforme e não conforme na interpretação dos resultados.

Palavras-chave. limite de decisão, capacidade de detecção, curvas analíticas, análise de água, planilha eletrônica, interpretação de resultados.

ABSTRACT

In this paper the electronic spreadsheets built in *Microsoft Excel*[®] software are presented, and these parameters enable to estimate the decision limit ($CC\alpha$) and the detection capability ($CC\beta$) at the detection limit and of the maximum permitted value (MVP) regions. The estimates are evaluated from linear and homoscedastic analytical curves obtained in calibration procedures based on ISO standards and IUPAC guidelines. After validating by means of manual data processing, the electronic spreadsheets were used for determining the nitrite in bottled waters (MVP = 0.02 mg/L) and the fluoride contents in public supply waters (compliance interval = 0.6 to 0.8 mg/L). For fluoride analysis there are the minimum required value (0.6 mg/L) and the maximum acceptable value (0.8 mg/L) for its concentration; therefore, the spreadsheet computes the critical concentration at both limits with a probability of a type I error equal to 0.05. On that account, the electronic spreadsheets provide the rapid decision between compliant and non-compliant data in the interpretation of results.

Keywords. decision limit, capability of detection, analytical curves, water analysis, electronic spreadsheet, interpretation of results.

INTRODUÇÃO

Os teores de substâncias relacionados aos conceitos “limite de decisão” e “capacidade de detecção” estão entre as mais importantes figuras de mérito a serem avaliadas em um processo de validação de métodos usados para a quantificação dos mais diversos analitos (nutrientes e contaminantes, por exemplo) nas mais diversas matrizes (águas, alimentos, fluidos biológicos, etc.), sendo de particular importância quando o método é utilizado na área de pesquisa, saúde, comércio internacional e segurança¹. Os dois conceitos estão intimamente relacionados, embora em algumas normas e recomendações esta relação não esteja expressa com nitidez, seja pelo uso de terminologias diferentes, seja pela simples omissão do termo “limite de decisão” ou, ainda, pelas diferentes abordagens conceituais – por exemplo, a Comissão das Comunidades Europeias (CCE) utiliza distribuições normais nas estimativas do limite de decisão (designado como $CC\alpha$ e referindo-se a um limite cujo valor, sendo igual ou acima, implica na probabilidade α de um erro tipo I) e da capacidade de detecção (designado como $CC\beta$ e referindo-se a uma quantidade mínima da substância que pode ser detectada, identificada e/ou quantificada em uma amostra com uma probabilidade β de um erro tipo II)², enquanto a International Organization for Standardization (ISO) emprega distribuições t Student para estimativas similares, designadas como x_c (valor crítico da variável de estado que, se excedido, conduz à decisão de que o sistema observado não está em seu estado básico com uma probabilidade α de um erro tipo I) e x_D (valor mínimo detectável da variável de estado, um valor que conduz à conclusão de que o sistema observado não está em seu estado básico com probabilidade $1 - \beta$, em que β é a probabilidade de um erro tipo II)³; o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia), por sua vez, define apenas o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método, designando-o como limite de detecção (LD) e utilizando distribuições t sem, contudo, especificar a probabilidade β de um erro tipo II⁴. Assim, como já bem apontado por Thompson et al⁵, estas diferenças podem conduzir a alguma confusão quando o analista enfrenta a tarefa de validar um método analítico, particularmente no quesito “capacidade de detecção”, a despeito da aparente simplicidade embutida na ideia de se estabelecer a menor quantidade ou concentração do

analito que possa ser distinguida do valor “zero” com um determinado grau de confiança.

Em adição, existem normas que utilizam o termo “capacidade de detecção” para outras situações além da considerada na região dos sinais analíticos do branco (matriz sem o analito) ou região do limite de detecção – são as situações que envolvem um limite de concentração (a concentração máxima permitida do analito na amostra) ou valor máximo permitido (VMP); tal abordagem pode ser encontrada em normas como a que citamos para a CCE² ou em documentos como o “Guia para validação de métodos analíticos e controle de qualidade interna das análises de monitoramento do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC-Animal” do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento⁶. A capacidade de detecção, neste caso, seria a referência a ser utilizada para se concluir se um dado VMP foi ultrapassado ou não, com um nível de significância estabelecido, tanto para a probabilidade α de um erro tipo I, como para a probabilidade β de um erro tipo II, à semelhança do que é feito quando se realizam estimativas na região do limite de detecção.

Discorrer sobre este assunto e discutir as várias normas, e os argumentos estatísticos nelas empregados, estão fora do escopo deste trabalho. Aqui, demonstra-se que estes dois importantes conceitos podem ser estimados em análises de rotina (após a validação do método) a partir de parâmetros da curva analítica empregada, não somente na região do limite de detecção e na região do VMP, mas também naqueles casos em que existe uma faixa aceitável de concentrações compreendida entre um valor mínimo requerido e um valor máximo aceitável. As estimativas são realizadas através do uso de planilha eletrônica, construída em software acessível (Excel®), cujos cálculos são baseados em normas ISO e recomendações IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), que permite também a avaliação rotineira da qualidade das curvas analíticas. Em um primeiro exemplo, descreve-se a determinação de nitrito em águas envasadas (VMP = 0,02 mg/L)⁷. Em um segundo exemplo, a aplicação dos dois conceitos é realizada na situação em que existe uma faixa de aceitação de concentrações (faixa de conformidade): é o caso do fluoreto em águas de abastecimento público, cuja concentração, segundo a legislação vigente no Estado de São Paulo, deve estar na faixa entre 0,6 a 0,8 mg/L, considerando-se 0,7 mg/L como o teor ideal⁸. Desta forma, o analista tem à sua disposição uma ferramenta

estatística de fácil utilização que permite a rápida decisão entre “conforme” e “não conforme” para a interpretação dos resultados obtidos para as amostras.

MATERIAL E MÉTODOS

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Materiais e reagentes – A água usada nas preparações foi previamente destilada e desionizada. Reagentes utilizados (grau analítico): nitrito de sódio, ácido fosfórico, sulfanilamida, di-hidroclorato de N-1-naftiletlenodiamina, oxalato de sódio anidro, ácido sulfúrico, permanganato de potássio, fluoreto de sódio anidro, hidróxido de sódio, ácido clorídrico, citrato de sódio di-hidratado, cloreto de sódio e ácido 1,2-ciclohexileno-dinitrilo-tetracético mono-hidratado (CDTA). As medidas de absorvância na análise de nitrito foram realizadas em espectrofotômetro, marca Hach, modelo 4000U, usando-se cubetas de quartzo com caminho ótico igual a 1 cm. Nas análises de fluoreto utilizou-se um eletrodo íon-seletivo, marca Digimed, modelo DMI-FL2, acoplado a um potenciômetro marca Orion modelo 370.

Procedimentos – Os dois métodos analíticos utilizados neste trabalho como exemplos estão descritos detalhadamente em literatura pertinente^{9,10}. Resumidamente: (i) A análise de nitrito foi realizada por espectrofotometria Visível (medida de absorvância em 543 nm), após desenvolvimento de cor com sulfanilamida e N-1-naftil-etilenodiamina (reagente de cor), com o uso de 5 soluções-padrão para a construção da curva analítica, de concentrações 0,000 a 0,040 mg/L em nitrito. Em uma análise típica, a 50 mL da amostra são adicionados 2 mL do reagente de cor; após 30 a 45 minutos da homogeneização, segue-se a leitura da absorvância. (ii) Fluoreto foi determinado por Potenciometria com eletrodo íon seletivo, utilizando 5 soluções-padrão para a construção da curva analítica, de concentrações 0,30 a 1,50 mg/L em fluoreto, e tampão TISAB III (tampão contendo citrato de sódio di-hidratado, cloreto de sódio e CDTA, em pH = 6,0 \pm 0,2). Em uma análise típica, a 50 mL da amostra são adicionados 5 mL de solução tampão, seguindo-se medida do potencial da solução mantida sob agitação. Esses dois métodos são rotineiramente utilizados nas análises de águas no Laboratório do Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratórios, Regional de Ribeirão Preto: no caso do fluoreto, as amostras de águas são coletadas pelas Vigilâncias Municipais e enviadas sob refrigeração

ao Laboratório através do Programa de Vigilância da Água para Consumo Humano do Estado de São Paulo (Proágua); no caso do nitrito, as amostras de águas envasadas são principalmente provenientes de ações da Vigilância Sanitária e de requisições particulares. Os dois métodos foram previamente validados, apresentando, como principais figuras de mérito investigadas:

- Faixa linear: nitrito, 0,0 a 1,0 mg/L; fluoreto, 0,2 a 10,0 mg/L.
- Faixa de trabalho: nitrito, 0,000 a 0,040 mg/L; fluoreto, 0,3 a 1,5 mg/L.
- Limite de detecção: nitrito, 0,0035 mg/L; fluoreto, 0,025 mg/L.
- Limite de quantificação: nitrito, 0,007 mg/L; fluoreto, 0,20 mg/L.
- Precisão (expresso como coeficiente de variação no limite de quantificação): nitrito, menor ou igual a 10 %; fluoreto, menor ou igual a 10%.
- Exatidão (expresso como recuperação): nitrito, entre 95 e 110 % para 0,020 mg/L; fluoreto, entre 95 e 105 % para 1 mg/L.

CONSTRUÇÃO DAS PLANILHAS ELETRÔNICAS

As planilhas foram construídas em software *Microsoft Excel2010*[®] (cálculos estatísticos adicionais, não incluídos nas planilhas desenvolvidas como, por exemplo, cálculos para testar se dados poderiam ser considerados oriundos de uma distribuição normal, foram realizadas no software *OriginPro 9.0*[®]).

Inicialmente ressaltamos que os cálculos efetuados pelas planilhas (descritos a seguir) foram validados através da comparação dos resultados gerados pelas planilhas com aqueles resultantes do processamento manual dos dados. As equações são baseadas nas normas ISO 11095¹¹, ISO 11843-2³ e ISO 8466-1¹², e em recomendações IUPAC¹³.

As determinações de nitrito e fluoreto apresentam curvas analíticas lineares e homoscedásticas, características previamente constatadas durante as respectivas validações. Tal fato permitiu a adaptação de planilhas construídas em estudo anterior¹⁴, nas quais a inserção das medidas experimentais apresentava como resultados: gráfico de calibração com intervalo de predição (curva com limites superior e inferior, 95 % de confiança) e gráfico de resíduos, desvio padrão residual, desvio padrão para coeficiente angular, desvio padrão para intercepto, coeficiente de determinação, valor crítico da absorvância, valor crítico da concentração, valor mínimo

detectável da concentração ou limite de detecção, limite de quantificação e os intervalos de confiança para amostras. As equações inseridas nas planilhas para a construção dos gráficos e para a estimativa destes parâmetros já foram discutidas anteriormente¹⁴ e estão indicadas no Quadro 1. As principais modificações adotadas nas adaptações foram (i) a escolha criteriosa das concentrações das soluções-padrão de modo a promover a maior precisão em torno do VMP (no caso do nitrito) ou no centro da faixa de conformidade (no caso do fluoreto), (ii) uso de logaritmos das concentrações na construção da curva analítica da determinação do fluoreto, em substituição aos valores de concentrações em mg/L, e (iii) a inserção de equações que permitissem as estimativas do limite de decisão e da capacidade de detecção em relação ao VMP do nitrito, ou dos valores críticos (similares aos calculados pelas equações 13 e 14 do Quadro 1) em relação aos extremos da faixa de conformidade do fluoreto (o valor mínimo requerido e o valor máximo aceitável). Estas modificações são discutidas a seguir.

Quanto às concentrações das soluções-padrão,

no caso do nitrito a escolha foi feita de maneira a promover a máxima precisão na região do VMP. Assim, para a sua determinação em águas envasadas (VMP = 0,02 mg/L)⁷, cuja curva analítica é linear e homoscedástica, a maior precisão encontra-se na região central da curva. As concentrações das soluções-padrão escolhidas foram 0,00 (branco); 0,01; 0,02; 0,03; e 0,04 mg/L, de modo a promover o valor médio 0,02 mg/L (o centro da curva) – esta série de soluções-padrão está de acordo com o recomendado no Guia PNCRC-Animal⁶, já citado anteriormente, que estabelece que a curva analítica deve ser obtida a partir de 5 níveis de concentração, equidistantemente distribuídos em torno do limite máximo de resíduo, LMR (0,0 – 0,5 – 1,0 – 1,5 – 2,0 vezes o LMR). No caso da determinação de fluoreto em águas de abastecimento público, a curva analítica é construída colocando-se as medidas de potencial em função do logaritmo da concentração – portanto, as concentrações deveriam ser escolhidas de modo que a média dos logaritmos correspondesse ao valor ideal estabelecido pela legislação vigente (0,7 mg/L)⁸ e a série

Quadro 1. Equações previamente inseridas nas planilhas¹⁴

$$\hat{y} = \hat{a} + \hat{b}x \quad (1) \quad \hat{b} = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (x_i - \bar{x})(\bar{y}_{ij} - \bar{y})}{J \cdot \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2} \quad (2) \quad \hat{a} = \bar{y} - \hat{b}\bar{x} \quad (3) \quad \bar{y}_{ij} = \frac{\sum_{l=1}^L y_{ijl}}{L} \quad (4) \quad \bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{l=1}^L y_{ijl}}{I \cdot J \cdot L} \quad (5) \quad \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^I x_i}{I} \quad (6)$$

$$\hat{\sigma} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (\bar{y}_{ij} - \hat{a} - \hat{b}x_i)^2}{(I \cdot J) - 2}} \quad (7) \quad s_b = \frac{\hat{\sigma}}{\sqrt{J \cdot \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} \quad (8) \quad s_{\hat{a}} = \hat{\sigma} \cdot \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I x_i^2}{I \cdot J \cdot \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} \quad (9) \quad R^2 = \frac{SSR}{SST} = \frac{\sum_{i=1}^I (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (\bar{y}_{ij} - \bar{y})^2} \quad (10)$$

$$pred_{(\hat{y})} = \hat{y} \pm t_{1-\frac{\alpha}{2}(v)} \cdot \hat{\sigma} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{(x_i - \bar{x})^2}{J \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} \quad (11) \quad pred_{(\hat{x}_i)} = \hat{x}_i \pm t_{1-\frac{\alpha}{2}(v)} \cdot \frac{\hat{\sigma}}{\hat{b}} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{(\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\hat{b}^2 \cdot J \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} \quad (12)$$

$$y_c = \hat{a} + t_{1-\alpha(v)} \cdot \hat{\sigma} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{\bar{x}^2}{J \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} \quad (13) \quad x_c = t_{1-\alpha(v)} \cdot \frac{\hat{\sigma}}{\hat{b}} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{\bar{x}^2}{J \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} \quad (14) \quad x_D = \delta \cdot \frac{\hat{\sigma}}{\hat{b}} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{\bar{x}^2}{J \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} \quad (15)$$

$$\delta_{(v;\alpha;\beta)} \approx 2 \cdot t_{1-\alpha(v)} \quad (16) \quad x_D \approx 2 \cdot t_{1-\alpha(v)} \cdot \frac{\hat{\sigma}}{\hat{b}} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{\bar{x}^2}{J \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} = 2 \cdot x_c \quad (17) \quad L_Q = 2 \cdot x_D \quad (18)$$

$$s_{(L_Q)} = \frac{\hat{\sigma}}{\hat{b}} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{(y_{L_Q} - \bar{y})^2}{\hat{b}^2 \cdot J \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} \quad (19) \quad L_Q = 2 \cdot x_D \approx 4 \cdot x_c \quad (20) \quad y_{L_Q} = \hat{a} + \hat{b}x_{L_Q} \approx \hat{a} + \hat{b} \cdot 4 \cdot x_c \quad (21) \quad CV_{(L_Q)\%} = \frac{s_{(L_Q)}}{L_Q} \cdot 100 \quad (22)$$

Onde I = n° de soluções-padrão; J = n° de replicatas de soluções-padrão; L = n° de medidas em cada solução-padrão; K = n° de replicatas para amostras.

de concentrações correspondente seria 0,175; 0,35; 0,70; 1,40; 2,80 mg/L. Contudo, a primeira solução-padrão (0,175 mg/L) apresenta sinal de potencial na região não-linear da curva analítica, conforme observado na validação do método – a região linear ocorre acima de 0,20 mg/L. Assim, na prática, a melhor combinação de soluções-padrão encontrada foi 0,30; 0,50; 0,80; 1,00; 1,50 mg/L, que conduz a uma média dos logaritmos que corresponde à concentração de 0,71 mg/L.

Quanto ao uso de logaritmos das concentrações na construção da curva analítica da determinação do fluoreto: tal procedimento é devido ao comportamento da resposta do eletrodo frente às mudanças nas concentrações das soluções as quais é exposto – de acordo com a Equação de Nernst, a resposta depende linearmente com o logaritmo da concentração, em uma função com coeficiente angular (“slope”) negativo, ou seja, a função de calibração é decrescente, com os valores de potencial diminuindo à medida que a concentração de fluoreto aumenta. O valor teórico deste “slope” para um processo monoelétrônico é -0,059 V (ou -59 mV), quando o logaritmo empregado é o de base 10 e a temperatura é mantida em 25 °C. Desta forma, para uma curva analítica construída em termos de potencial *versus* logaritmo da concentração, os resultados e os respectivos intervalos de predição (equação 12, Quadro 1) serão expressos em termos de logaritmos – não obstante, a planilha converte tanto o resultado da amostra, como os extremos do intervalo de predição, para a unidade mg/L, conforme mostrado na Figura 1.

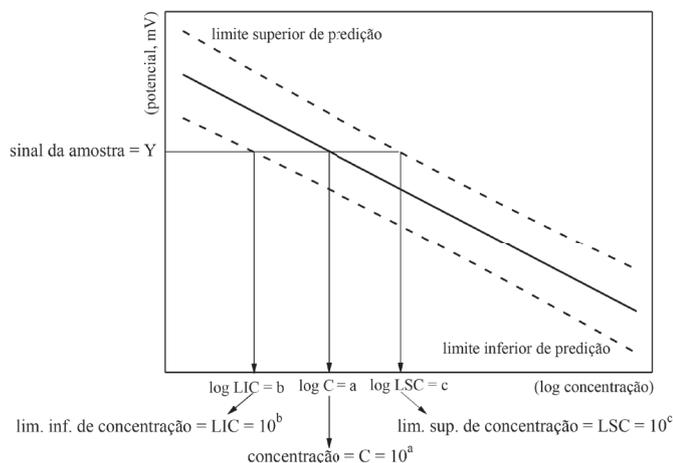


Figura 1. Visualização gráfica da conversão dos dados obtidos na forma logarítmica a partir da curva analítica, para a concentração usual (mg/L) na determinação de fluoreto

No que diz respeito à inserção de equações que permitissem as estimativas do limite de decisão e da capacidade de detecção em relação ao VMP do nitrito em águas envasadas, a estratégia utilizada é basicamente a mesma quando das respectivas estimativas na região do limite de detecção (equações 13 a 17 do Quadro 1), iniciando-se com um teste de hipóteses unilateral, formulado aqui como:

$$H_0: \mu = \text{VMP}$$

$$H_a: \mu > \text{VMP}$$

O limite de decisão e a capacidade de detecção foram simbolizados conforme a CCE e o Guia do PNCRC-Animal, tomando-se o cuidado de se acrescentar um expoente “t”, de modo a diferenciar este trabalho (que utiliza distribuições t Student), e um índice “VMP”, para indicar a região em que as estimativas são realizadas. Assim, temos:

$$\text{Limite de decisão na região do VMP} = CC\alpha_{\text{VMP}}^t$$

$$\text{Capacidade de detecção na região do VMP} = CC\beta_{\text{VMP}}^t$$

A Figura 2A ilustra, no domínio dos sinais (no caso do nitrito, absorbância), a estratégia utilizada: sendo \hat{y}_{VMP} o valor estimado pela equação de regressão (equação 1 do Quadro 1) para o VMP = 0,02 mg/L, os sinais em $CC\alpha_{\text{VMP}}^t$ ($\hat{y}_{CC\alpha_{\text{VMP}}^t}$) e $CC\beta_{\text{VMP}}^t$ ($\hat{y}_{CC\beta_{\text{VMP}}^t}$) podem ser calculados pelas equações 23 e 24, respectivamente ($\alpha = \beta = 0,05$).

$$\hat{y}_{CC\alpha_{\text{VMP}}^t} = \hat{y}_{\text{VMP}} + t_{1-\alpha(v)} \cdot \hat{\sigma} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{\bar{x}^2}{J \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} \quad (23)$$

$$\hat{y}_{CC\beta_{\text{VMP}}^t} = \hat{y}_{\text{VMP}} + 2 \cdot t_{1-\alpha(v)} \cdot \hat{\sigma} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{\bar{x}^2}{J \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} \quad (24)$$

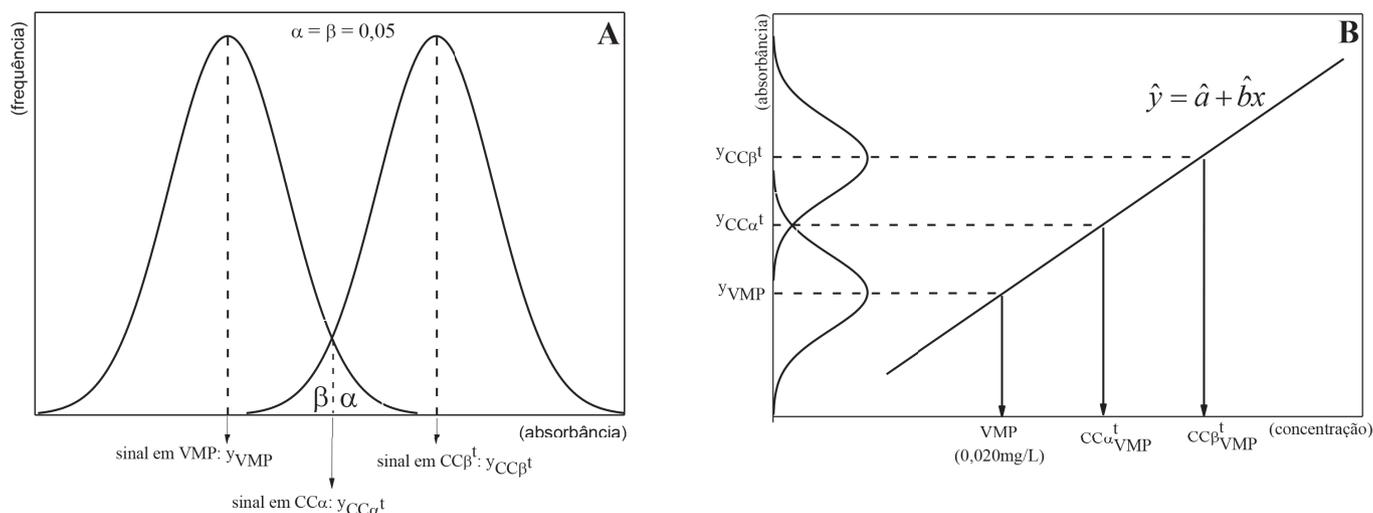


Figura 2. Visualização gráfica: (A) das distribuições amostrais dos sinais de absorbância para o VMP do nitrito (0,020 mg/L) e para a amostra que apresenta uma concentração maior que o VMP, onde α é a probabilidade de um erro tipo I e β é a probabilidade de um erro tipo II; (B) das determinações das respectivas concentrações a partir da reta de regressão da curva analítica

As concentrações $CC\alpha^t_{VMP}$ e $CC\beta^t_{VMP}$ ou seja, o limite de decisão e a capacidade de detecção correspondentes aos sinais $\hat{y}_{CC\alpha^t_{VMP}}$ e $\hat{y}_{CC\beta^t_{VMP}}$ são calculadas a partir da curva analítica (Figura 2B), através das equações 25 e 26.

$$CC\alpha^t_{VMP} = \frac{(\hat{y}_{CC\alpha^t_{VMP}} - \hat{a})}{\hat{b}} \quad (25)$$

$$CC\beta^t_{VMP} = \frac{(\hat{y}_{CC\beta^t_{VMP}} - \hat{a})}{\hat{b}} \quad (26)$$

No caso do fluoreto inicialmente considerou-se a faixa de 0,6 a 0,8 mg/L como um intervalo de conformidade com relação ao valor ideal central de 0,7 mg/L. Para a determinação dos valores críticos (y_c e x_c) em relação ao valor mínimo requerido (0,6 mg/L) e ao valor máximo aceitável (0,8 mg/L), consideraram-se distribuições normais para os sinais analíticos (potenciais em mV) destas concentrações limites. Assim, inicialmente dois testes de hipóteses podem ser formulados, um para cada situação:

para $y_{C\ 0,6\ mg/L}$

- $H_0: \mu = \text{potencial em } 0,6\ \text{mg/L}$
- $H_a: \mu > \text{potencial em } 0,6\ \text{mg/L}$

para $y_{C\ 0,8\ mg/L}$

- $H_0: \mu = \text{potencial em } 0,8\ \text{mg/L}$
- $H_a: \mu < \text{potencial em } 0,6\ \text{mg/L}$

Este raciocínio é ilustrado na Figura 3A onde pode ser observado que acima de um dado valor de potencial ($y_{C\ 0,6\ mg/L}$) a amostra será considerada não-conforme por não apresentar o teor mínimo requerido, e abaixo de um dado valor de potencial ($y_{C\ 0,8\ mg/L}$) a amostra será considerada não-conforme por apresentar excesso de fluoreto. Os cálculos de $y_{C\ 0,6\ mg/L}$ e $y_{C\ 0,8\ mg/L}$ são similares ao realizado pela equação 13 (Quadro 1), substituindo-se a estimativa do coeficiente linear \hat{a} pelas respectivas estimativas de \hat{y} em 0,6 e 0,8 mg/L, e estão indicados nas equações 27 e 28. Nas duas situações considerou-se $\alpha = 0,05$.

$$y_{c(0,6mg/L)} = \hat{y}_{(0,6mg/L)} + t_{1-\alpha(v)} \cdot \hat{\sigma} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{\bar{x}^2}{J \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} \quad (27)$$

$$y_{c(0,8mg/L)} = \hat{y}_{(0,8mg/L)} - t_{1-\alpha(v)} \cdot \hat{\sigma} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{\bar{x}^2}{J \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} \quad (28)$$

Os cálculos das respectivas concentrações críticas ($x_{C\ 0,6\ mg/L}$ e $x_{C\ 0,8\ mg/L}$) são realizados a partir da equação de regressão, utilizando-se os potenciais críticos para 0,6 e 0,8 mg/L, seguido da conversão da escala logarítmica

$$x_{c(0,6\text{mg/L})} = 10^{\frac{y_{c(0,6\text{mg/L})} - \hat{a}}{\hat{b}}} \quad (29)$$

$$x_{c(0,8\text{mg/L})} = 10^{\frac{y_{c(0,8\text{mg/L})} - \hat{a}}{\hat{b}}} \quad (30)$$

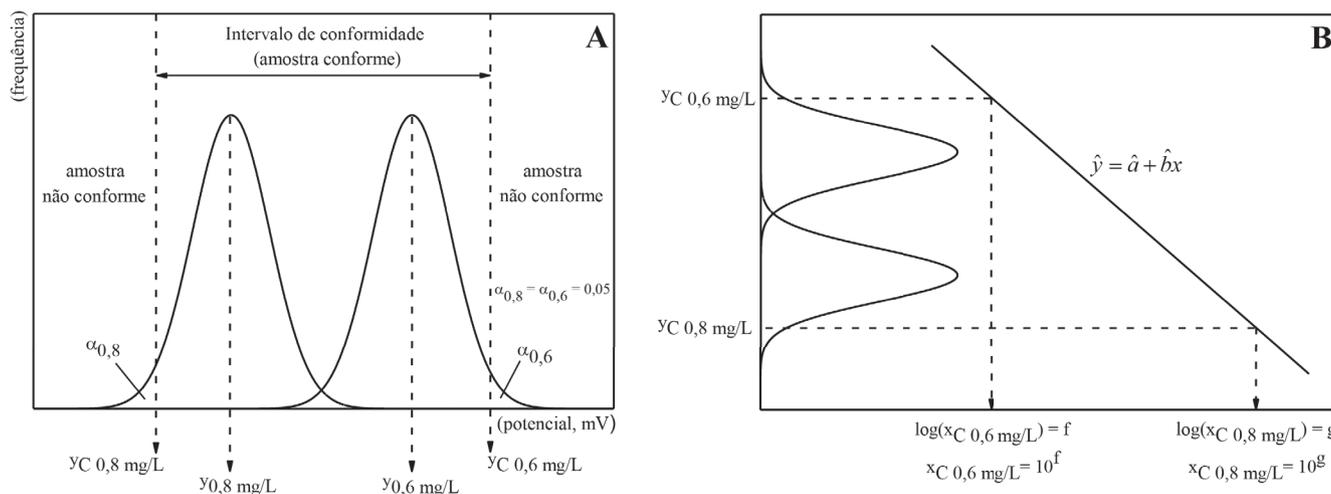


Figura 3. Visualização gráfica: (A) do modelo adotado neste trabalho para a faixa de conformidade do fluoreto; (B) das determinações dos valores críticos no domínio do logaritmo das concentrações e as posteriores conversões para concentrações usuais (mg/L)

para concentração em mg/L. O procedimento é ilustrado na Figura 3B, sendo realizado pelas equações 29 e 30.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desenvolvimento, a validação e a aplicação geral das planilhas eletrônicas foram previamente descritas¹⁴. Assim, serão discutidos aqui os resultados obtidos com as modificações introduzidas.

No caso da determinação de nitrito em águas envasadas, a Figura 4A exibe a distribuição dos valores determinados para a capacidade de detecção na região do limite de detecção (CC β_{LD}^t), calculados pela equação 17 do Quadro 1 (CC $\beta_{LD}^t = x_D$), em 31 análises. Uma vez que diferentes calibrações (curvas analíticas) produzem diferentes valores de CC β_{LD}^t , a ISO 11843:2³ estabelece que, se m calibrações são realizadas em um dado processo de medida, os respectivos m valores mínimos detectáveis podem ser usados para se determinar um valor mínimo detectável do processo de medida, desde que observadas as seguintes condições: (i) o processo de medida não seja alterado; (ii) a distribuição dos m valores mínimos detectáveis seja unimodal, sem a ocorrência de “outliers”; e (iii)

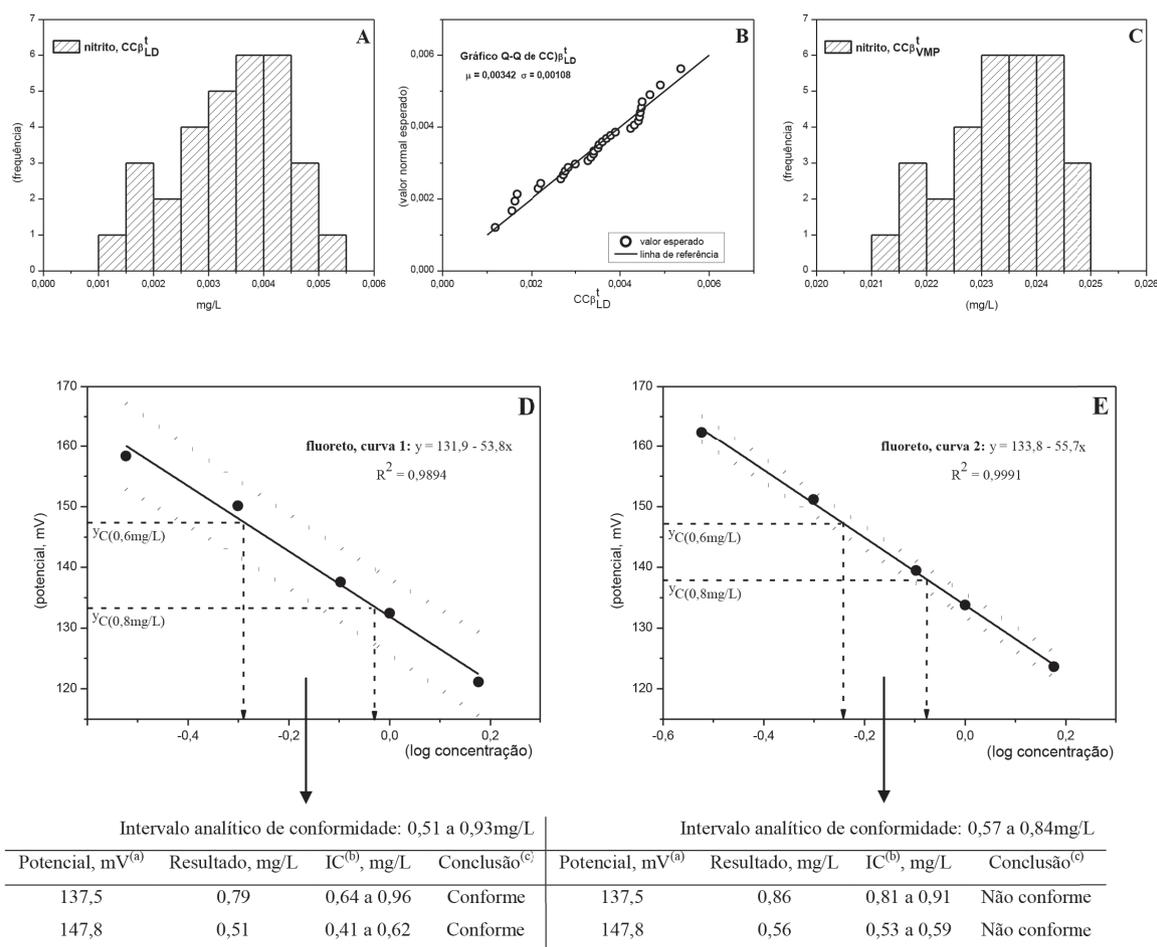
o planejamento experimental (valores de I , J , K e L) seja idêntico para cada uma das calibrações. Sob estas condições, recomenda-se que a mediana dos m valores mínimos detectáveis seja indicado como o valor mínimo detectável do processo de medida.

À primeira vista, a distribuição da Figura 4A sugere curva de densidade unimodal com uma pequena assimetria negativa. Contudo, o gráfico dos quantis normais (gráfico Q-Q, Figura 4B) indicou que a distribuição poderia ser considerada normal, e os vários testes estatísticos empregados indicaram que a hipótese de distribuição normal para os dados não poderia ser rejeitada a um nível de significância igual a 0,05: teste de Kolmogorov-Smirnov (estatística = 0,10334; $p = 0,96597$), teste de Lilliefors (estatística = 0,10334; $p = 0,2$), teste de Shapiro-Wilk (estatística = 0,96474; $p = 0,38698$), e teste de Anderson-Darling (estatística = 0,39377; $p = 0,35436$). Desta forma, visto que todas as condições expressas na ISO 11843:2 são obedecidas, pôde-se expressar o valor mínimo detectável do processo de medida como a mediana dos 31 valores de CC β_{LD}^t , ou seja, CC β_{LD}^t (mediana) = 0,0035 mg/L.

Uma vez que o cálculo da capacidade de detecção

na região do Valor Máximo Permitido ($CC\beta_{VMP}^t$) é similar ao cálculo de $CC\beta_{LD}^t$, alterando-se basicamente a estimativa \hat{y}_C que é feita a partir de \hat{y}_{VMP} ao invés de \hat{a} (vide equação 1 do Quadro 1, e equações 24 e 26 do texto), a distribuição dos valores determinados para $CC\beta_{VMP}^t$ (Figura 4C) é semelhante à anteriormente observada, sugerindo curva de densidade unimodal com pequena assimetria negativa. Também de forma semelhante ao caso anterior, a distribuição normal pôde ser considerada a partir do gráfico Q-Q e dos testes estatísticos (nível de significância = 0,05): teste de Kolmogorov-Smirnov (estatística = 0,10492; $p = 0,94559$), teste de Lilliefors (estatística = 0,10492; $p = 0,2$), teste de Shapiro-Wilk (estatística = 0,95018; $p = 0,15791$), e teste de Anderson-Darling (estatística = 0,47489; $p = 0,22397$). No entanto, de forma diferente ao realizado com os dados de $CC\beta_{LD}^t$,

os valores de $CC\beta_{VMP}^t$ não foram combinados de modo a se determinar um valor de referência, como a mediana, por exemplo – cada valor de $CC\beta_{VMP}^t$ pertence a uma curva analítica específica para uso como instrumento de decisão entre conforme e não conforme. Em outras palavras: neste trabalho, o cálculo de $CC\beta_{VMP}^t$ é uma ferramenta estatística para a tomada de decisão (conforme / não conforme) em uma análise específica, não aplicável, portanto, a um processo de medida. Não obstante, é possível associar valores mais altos de $CC\beta_{VMP}^t$ às curvas analíticas de menor precisão: à medida que os intervalos de predição se distanciam da curva de regressão, evidenciando curvas analíticas de menor precisão, os valores de $CC\beta_{VMP}^t$ se distanciam do VMP (igual a 0,020 mg/L, no caso do nitrito). Esta dependência entre precisão de curvas analíticas e valores de decisão é



(a) Simulação. (b) Intervalo de confiança 95%, amostras em duplicata. (c) Baseada na Resolução SS-250, de 15/08/1995.

Figura 4. Resultados: (A) distribuição de valores de $CC\beta_{LD}^t$ estimados em 31 análises de nitrito; (B) gráfico dos quantis normais para a distribuição da Figura 4A; (C) distribuição de valores de $CC\beta_{VMP}^t$ estimados em 31 análises de nitrito; (D) curva analítica de fluoreto com menor precisão (limites de predição em linha pontilhada); (E) curva analítica de fluoreto com maior precisão (limites de predição em linha pontilhada)

mais evidente no caso da determinação de fluoreto, que discutimos a seguir.

As Figuras 4D e 4E exibem duas curvas analíticas de precisões diferentes na determinação de fluoreto em águas de abastecimento público: enquanto os intervalos de predição em 4D estão bastante afastados da reta de regressão, os respectivos intervalos em 4E aproximam-se da reta de regressão a que se referem, indicando uma análise sendo conduzida com maior grau de precisão¹⁴. Como consequência, a capacidade de detectar amostras fora do intervalo de conformidade estabelecido pela legislação⁸ é menos precisa em 4D. De fato, podemos associar um “intervalo analítico de conformidade” à curva construída, ou seja, um intervalo em que o método sendo empregado naquela análise específica seria capaz de indicar se uma amostra está conforme ou não conforme, tendo em mente que os testes de hipóteses procuram essencialmente determinar, com um nível de significância igual a 0,05, abaixo de qual concentração a análise é capaz de rejeitar a hipótese nula ($H_0: \mu = 0,6$ mg/L) e aceitar a hipótese alternativa ($H_a: \mu < 0,6$ mg/L) no limite inferior, paralelamente à determinação da concentração acima da qual a hipótese nula é rejeitada ($H_0: \mu = 0,8$ mg/L) em favor da alternativa ($H_a: \mu > 0,8$ mg/L) no limite superior.

Como exemplos da dependência do “intervalo analítico de conformidade” com a precisão da curva analítica, podemos observar nas Figuras 4D e 4E o estreitamento do intervalo em função da maior precisão obtida na curva 2 (0,57 a 0,84 mg/L) em relação à curva 1 (0,51 a 0,93 mg/L), ambas obtidas em análises de rotina. Em uma simulação indicada na parte inferior das figuras, pode ser observado também que potenciais iguais relacionados às duas curvas podem conduzir a conclusões diferentes: as concentrações determinadas para cada um dos potenciais em cada uma das curvas não podem ser estatisticamente distinguidas (os intervalos de confiança 95% apresentam sobreposição), mas a precisão maior da curva 2 permite constatar (i) que o valor de $x_{C\ 0,6\ \text{mg/L}}$ (igual a 0,57 mg/L) não foi atingido no caso do potencial 147,8 mV, e (ii) que o valor de $x_{C\ 0,8\ \text{mg/L}}$ (igual a 0,84mg/L) foi superado no caso do potencial 137,5 mV. Em adição, pode-se constatar que os intervalos de confiança associados às concentrações calculadas para os potenciais não incluem os valores limites da legislação (0,60 e 0,80 mg/L).

CONCLUSÃO

Dando continuidade ao estudo iniciado em 2013¹⁴, este trabalho demonstrou que as planilhas eletrônicas, inicialmente desenvolvidas para aplicações gerais, podem ser adaptadas para situações específicas no intuito de contemplar as legislações pertinentes a cada analito em particular. Mostrou-se a aplicabilidade no caso do nitrito em águas envasadas; porém, esta planilha pode ser facilmente adaptada para situações como a delineada no Guia PNCRC-Animal⁶: para substâncias proibidas, a probabilidade de um erro tipo I deve ser alterada para 0,01, mantendo-se igual a 0,05 a probabilidade de um erro tipo 2 no cálculo de $CC\alpha_{LD}^t$ ($\hat{y}_{CC\alpha_{LD}^t}$) e de $CC\beta_{LD}^t$ ($\hat{y}_{CC\beta_{LD}^t}$), respectivamente; para substâncias permitidas, os cálculos são similares aos mostrados aqui, ressaltando-se apenas que o Guia PNCRC-Animal utiliza distribuições normais e faz uso do Limite Máximo de Resíduo (LMR) nos cálculos dos respectivos $CC\alpha$ e $CC\beta$ (LMR é a concentração máxima admissível do resíduo em uma matriz cujo valor é estabelecido pela Coordenação de Controle de Resíduos e Contaminantes).

A planilha desenvolvida para o fluoreto, por sua vez, pode ser adaptada para situações similares, em que se apresenta um intervalo de conformidade ao qual se poderia associar um “intervalo analítico de conformidade”. Tal é o caso, por exemplo, dos produtos farmacêuticos que, em geral, devem conter de 90 a 110 % do princípio ativo declarado no rótulo¹⁵. Desta forma, planilhas podem ser adaptadas para substâncias cujas determinações façam uso de curvas analíticas como, por exemplo, dipirona, acetilcisteína, captopril, paracetamol e sinvastatina^{16, 17}.

REFERÊNCIAS

1. Currie LA. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. *Pure Appl Chem*.1995;67(10):1699-1723.
2. Commission E. Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off J Eur Comm*. 2002;L221:8-36.
3. International Organization for Standardization - ISO. Capability of detection. 1997:ISO 11843-1,2.
4. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO. DOQ-CGCRE-8: Orientação sobre validação de métodos analíticos - Revisão 04. 2011; 19 p. Disponível em: [http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf].

5. Thompson M, Ellison S, Wood R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl Chem*.2002;74(5):835-55.
6. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 24, de 14 de julho de 2009. Define os requisitos e critérios específicos para funcionamento dos Laboratórios de Análises de Resíduos e Contaminantes em Alimentos Integrantes da Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 22 jul. 2009. Seção 1, p. 7-15.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 274, de 22 de setembro de 2005. Aprova o "Regulamento técnico para águas envasadas e gelo". *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 23 set. 2005. Seção 1, p. 376-377.
8. Secretaria de Estado da Saúde - SES/SP. Resolução SS-250, de 15 de agosto de 1995. Define teores de concentração do íon fluoreto nas águas para consumo humano, fornecidas por sistemas públicos de abastecimento. *Diário Oficial do Estado*. São Paulo, SP, 16 ago. 1995. Poder Executivo, Seção 1, p.11.
9. American Public Health Association - APHA, American Water Works Association - AWWA, Water Environment Federation - WEF. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 19th ed. Eaton Ad, Clesceri Ls, Greenberg Ae, editors. Washington DC: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation; 1995.
10. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). *Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. 4a. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2005. 1018 p p.
11. International Organization for Standardization - ISO. *Linear calibration using reference materials*. International Organization for Standardization. 1996:ISO 11095.
12. International Organization for Standardization - ISO. *Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics*. International Organization for Standardization. 1990:ISO 8466-1.
13. Danzer K, Currie LA. *Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part 1. Fundamentals and single component calibration*. *Pure Appl Chem*.1998;70(4):993-1014.
14. Dovidauskas S, Okada IA, Sakuma AM, Duran MC, Oliveira CC. Emprego de planilhas eletrônicas, baseado nas normas ISO e recomendações IUPAC, em curvas analíticas da análise de água. *Rev Inst Adolfo Lutz*.2013;72(1):13-24.
15. Brasil. Ministério da Saúde. *Formulário Nacional da Farmacopéia Brasileira*. Revisão 02. 2a. ed. Brasília: ANVISA; 2012. 224 p.
16. Polonini HC, Santos FC, Vaz UP, Brandão MAF, Raposo NRB, Ferreira AO. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação do teor de sinvastatina em cápsulas magistrais. *Quím Nova*.2011;34(3):516-9.
17. Schmidt Jr E, Melchert WR, Rocha FRP. Sistemas de análise em fluxo polivalente para a determinação espectrofotométrica de fármacos. *Quím Nova*.2011;34(7):1205-10.