

Avaliação do desempenho de métodos analíticos de pesquisa de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal: Limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$)

Freitas, Andreia^(a) Barbosa, Jorge^(b) e Ramos, Fernando^{(c)}*

a) Mestre em Química Analítica

Técnica Superior

INIAV - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P., Laboratório de análise de resíduos, Rua General Morais Sarmento, 1500-311 Lisboa, Portugal

(b) Doutor em Farmácia – Especialidade de Bromatologia e Hidrologia

Director da Unidade Estratégica de Investigação e Serviços de Tecnologia e Segurança Alimentar

INIAV - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.

Av. da República, Quinta do Marquês, 2784-505 Oeiras, Portugal

(c) Doutor em Farmácia – Especialidade de Bromatologia e Hidrologia

Professor Associado da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Centro de Estudos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Azinhaga de Santa Comba 3000-549 Coimbra, Portugal

Autor correspondente:

Fernando Ramos Centro de Estudos Farmacêuticos – Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra

Azinhaga de Santa Comba – 3000-549 Coimbra - Portugal – Telef. +351 239 488 492 – e-mail: framos@ff.uc.pt

Resumo

A definição de vários conceitos necessários à avaliação do desempenho dos métodos analíticos usados na pesquisa de resíduos de medicamentos em alimentos, nomeadamente $CC\alpha$ (limite de decisão) e $CC\beta$ (capacidade de detecção), bem como a sua forma de cálculo e respectiva interpretação dos resultados obtidos são detalhadamente descritos.

A revisão que se apresenta pretende contribuir para melhorar a aplicação da Decisão N^o 2002/617/CE no espaço da língua portuguesa, no campo da segurança alimentar e do comércio internacional de alimentos de origem animal.

Palavras-chave: $CC\alpha$; $CC\beta$; Resíduos de Medicamentos; Segurança Alimentar

Abstract

The definition of the various concepts needed to assess analytical methods performance used in the evaluation of drug residues in foods, namely $CC\alpha$ (decision limit) and $CC\beta$ (detection capability), as well as its calculating and the interpretation of obtained results are described in detail.

The present overview aims to improve the implementation of Decision No. 2002/617/EC in the Portuguese speaker countries in the food safety field, as well as at the international trade of food of animal origin.

Key-words: $CC\alpha$; $CC\beta$; Drug Residues; Food Safety

Introdução

A legislação actual da União Europeia (UE) sobre controlo de resíduos de medicamentos de uso veterinário em alimentos de origem animal não obriga à utilização de métodos normalizados. Porém, não se julgue que qualquer País pode usar as metodologias que bem entender porque, a todos os métodos analíticos que sejam utilizados na análise de amostras colhidas no âmbito dos planos oficiais de controlo de resíduos de medicamentos veterinários, é exigido que demonstrem características de desempenho e que cumpram os limites e critérios que se encontram descritos, sob a forma de linhas orientadoras, na Decisão da Comissão 2002/657/CE¹.

Desta forma, permite-se uma rápida adaptação de métodos analíticos já existentes aos mais recentes desenvolvimentos tecnológicos, bem como se oferece a possibilidade da rápida utilização de métodos recém-desenvolvidos como resposta a problemas emergentes. Uma vantagem muito significativa deste tipo de comportamento é o elevado grau de flexibilidade possível, que constitui uma enorme mais-valia no sistema de avaliação de risco em vigor na UE, com o consequente aumento de protecção dos consumidores. A referida Decisão^[1] introduziu, por outro lado, novos termos relativos ao desempenho analítico, nomeadamente limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de deteção ($CC\beta$), incluindo também as redefinições para os métodos de triagem e de confirmação, tendo sido abandonando o conceito de método de referência para este tipo de análise.

Assim, este trabalho procura fazer uma revisão dos conceitos associados aos limites analíticos acima referidos e apresentar as aproximações estatísticas aliadas ao seu cálculo. Por outro lado, procura, também, explicitar os conceitos relativos aos procedimentos analíticos de triagem e de confirmação, bem como discutir a influência dos limites $CC\alpha$ e $CC\beta$ na interpretação dos resultados obtidos por aqueles métodos no controlo oficial da presença de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal para consumo humano.

Definições

Um método de triagem é utilizado para detectar a presença de uma substância numa amostra a um nível requerido. Estes métodos têm capacidade para processar um elevado número de amostras num curto espaço de tempo e que possibilitem eger as amostras potencialmente não conformes. Estes métodos devem evitar a obtenção de falsos resultados conformes (falsos negativos)¹.

Um método de confirmação é aquele que fornece indicações completas ou complementares para a identificação inequívoca de uma substância¹. Consequentemente os métodos cromatográficos sem deteção espectrométrica não são adequados como métodos de confirmação. No caso dos medicamentos veterinários em que se encontra definido o LMR (limite máximo de resíduo)^{2,3}, a especificidade do método de confirmação pode ser obtida pela combinação de procedimentos analíticos.

O limite de decisão ($CC\alpha$), ou concentração crítica com erro α , e a capacidade de deteção ($CC\beta$), ou concentração crítica com erro β , são dois parâmetros estatísticos importantes e característicos do desempenho dos métodos analíticos para a pesquisa de resíduos de medicamentos em alimentos. Estas concentrações críticas definem a capacidade de um método detectar e quantificar a presença dos compostos pesquisados tendo em conta a variabilidade do método e os erros estatísticos associados a resultados incorrectos¹.

O $CC\alpha$ (limite de decisão) é a concentração a partir da qual uma amostra pode ser declarada não conforme com uma probabilidade de erro igual a α (erro de 1% para substâncias não permitidas e de 5% para substâncias com LMR)¹. No caso das substâncias com LMR, o $CC\alpha$ é a concentração a partir da qual, com uma certeza de 95% ($1-\alpha$), a substância está presente em concentração superior ao seu LMR. A esta concentração está também associado um erro β , que é sempre de 50%, estando este relacionado com a dispersão de resultados e à probabilidade de ocorrência de falsos negativos.

O $CC\beta$ (capacidade de detecção) de um método é o limite a partir do qual o analito pode ser detectado, identificado e/ou quantificado com uma probabilidade de erro β (erro de 5% para todas as substâncias permitidas ou não)¹. No caso das substâncias com LMR, é a concentração a que o método é capaz de detetar concentrações no limite permitido com certeza estatístico de $1-\beta$.

Considera-se que uma amostra tem resultado não conforme (resultado positivo) sempre que coniver o analito pesquisado, no caso de se tratar de uma substância interdita, ou que, no caso de medicamentos permitidos para utilização em animais produtores de alimentos, o contenha em concentração superior ao respectivo LMR estabelecido no Regulamento da Comissão nº 37/2010⁴.

De acordo com o disposto na Decisão 2002/657/CE^[1] para métodos de triagem, quer qualitativos, quer quantitativos, apenas é necessária a determinação do $CC\beta$, isto é, a capacidade de detecção do

método. Nos métodos de confirmação ambos os limites analíticos, $CC\alpha$ e $CC\beta$, são exigidos.

Em resumo, o erro α indica sempre a probabilidade de existência de falsos positivos enquanto o erro β dá indicação da possibilidade de falsos negativos. Na prática o $CC\alpha$ é mais importante em métodos de confirmação pois determina a concentração partir da qual se considera uma amostra não conforme. O $CC\beta$ é mais importante em métodos de triagem pois indica a capacidade de detecção de determinado composto com uma certeza de 95%.

A representação estatística da dispersão de resultados em compostos cuja presença é proibida pode ser observada na Figura 1. Já na figura 2 representa-se a situação para as substâncias em que o LMR se encontra estabelecido, sendo de realçar que o desvio padrão da reprodutibilidade interlaboratorial é representado por σ em ambas as figuras.

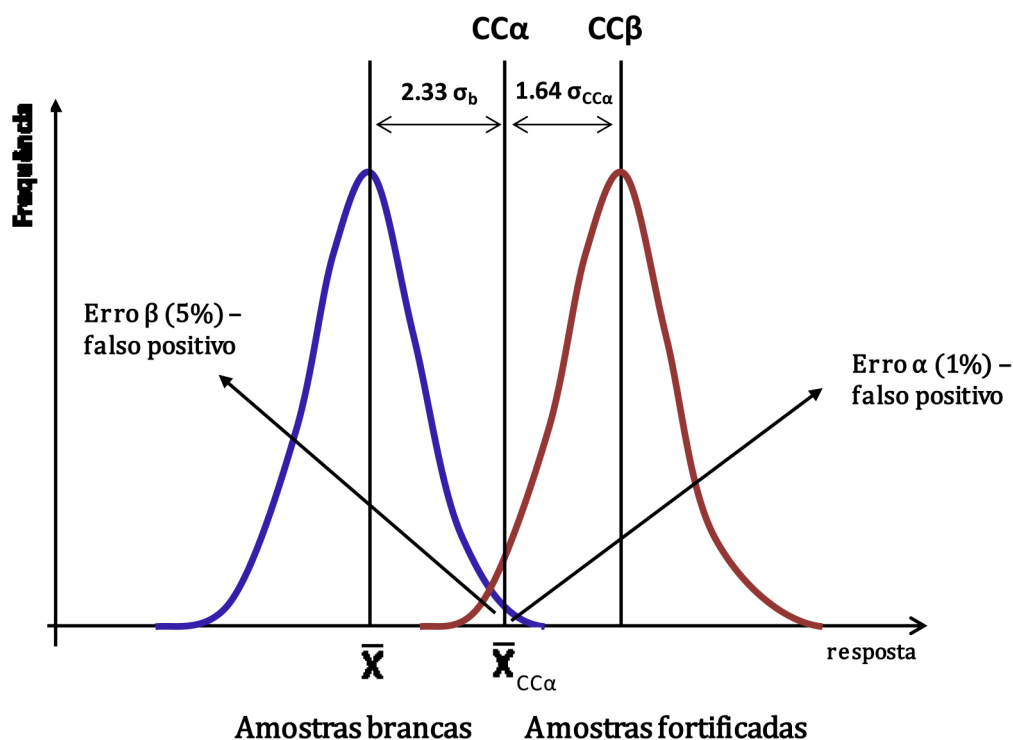


Figura1 – Representação estatística do limite de decisão e capacidade de detecção para substâncias de utilização proibida ou sem LMR estabelecido.

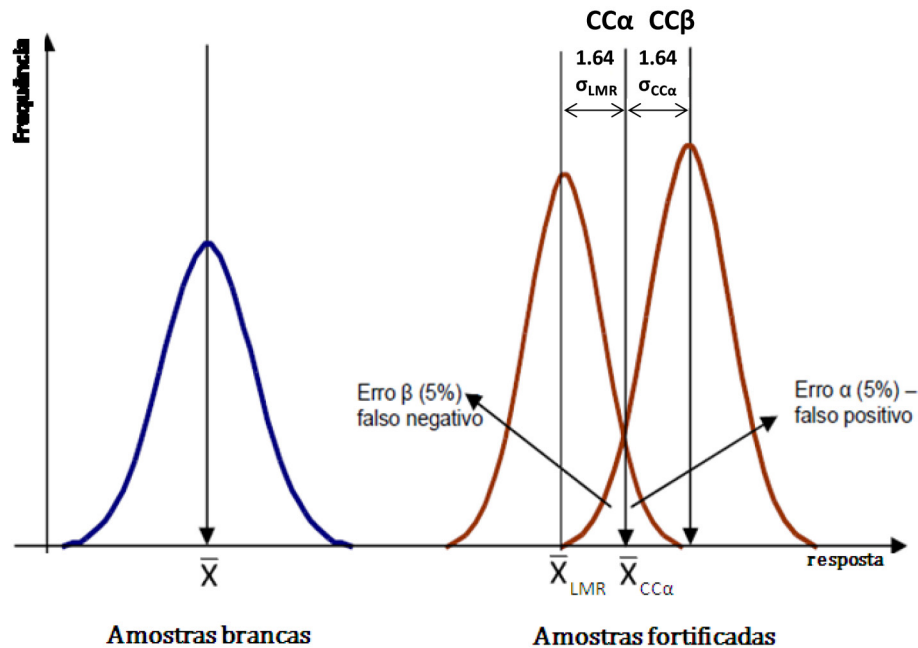


Figura 2 – Representação estatística do limite de decisão e capacidade de detecção para substâncias com LMR estabelecido.

Cálculo de $CC\alpha$ e $CC\beta$

Uma das aproximações para determinar os limites analíticos $CC\alpha$ e $CC\beta$, de acordo com a Decisão 2002/657/CE¹, consiste em realizar um estudo da variabilidade da resposta analítica pela razão sinal/ruído (S/R) de amostras brancas representativas das amostras laboratoriais de rotina. Assim, para medicamentos veterinários proibidos em animais destinados à produção de alimentos, ou sem LMR estabelecido, o $CC\alpha$ corresponde a 3 vezes a média do S/R de 20 amostras brancas.

$$CC\alpha = 3 \times S/R_{20 \text{ amostras brancas}}$$

(equação 1)

Efetuada este cálculo, o $CC\beta$ é obtido após fortificação de 20 amostras brancas ao nível do $CC\alpha$ determinado.

$$CC\beta = CC\alpha + 1,64 \times SD_{20 \text{ amostras fortificadas no } CC\alpha}$$

(equação 2)

Na equação 2, $SD_{20 \text{ amostras fortificadas no } CC\alpha}$ é o desvio padrão da reprodutibilidade interlaboratorial de 20 amostras fortificadas ao nível do $CC\alpha$. Para substâncias com LMR estabelecido as determinações são feitas tendo por base o LMR, conforme é apresentado nas equações 3 e 4.

$$CC\alpha = C_{LMR} + 1,64 \times SD_{20 \text{ amostras fortificadas no LMR}}$$

(equação 3)

$$CC\beta = CC\alpha + 1,64 \times SD_{20 \text{ amostras fortificadas no } CC\alpha}$$

(equação 4)

O procedimento para o cálculo das concentrações críticas de acordo com o apresentado na ISO 11843⁵ baseia-se nas seguintes premissas: a função de calibração é linear e assume uma distribuição normal, o desvio padrão residual é constante e independente da concentração.

O modelo de calibração linear é dado pela equação 5:

$$Y_{ij} = a + bx_i + \varepsilon_{ij} \quad i = 1,2,3, \dots, I; j = 1,2,3, \dots, J$$

(equação 5)

Onde: Y_{ij} corresponde ao sinal/resposta obtida para a concentração i e réplica j , a é a ordenada na origem, b o declive da curva, x_i a concentração i , e ε_{ij} o erro associado à preparação e resultado da amostra (assume-se que é independente e próximo de zero).

O cálculo de $CC\alpha$ e $CC\beta$, para compostos interditos ou cujo LMR não está estabelecido, é feito pela aplicação das equações 6 e 7:

$$CC\alpha = \frac{Y_{CC\alpha} - a}{b} = t_{(\alpha, IJ-2)} \cdot \frac{\sigma}{b} \cdot \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}}$$

(equação 6)

$$CC\beta = \delta_{(\alpha, \beta, IJ-2)} \cdot \frac{\sigma}{b} \cdot \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}}$$

(equação 7)

Em que $t_{(\alpha, IJ-2)}$ é o parâmetro t da distribuição t -student com erro associado α e graus de liberdade igual a $IJ - 2$, \bar{x} , a média de concentrações, σ o desvio padrão residual da regressão linear, K o número de réplicas da concentração real, e $\delta_{(\alpha, \beta, IJ-2)}$ corresponde a uma função estatística ao qual está associado o erro α e β e que é aproximadamente igual a $2t_{(\alpha, IJ-2)}$.

Para os casos em que existe um LMR estabelecido os cálculos matemáticos são os seguintes (equações 8 e 9):

$$CC\alpha = C_{LMR} + t_{(\alpha, IJ-2)} \cdot \frac{\sigma}{b} \cdot \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{x_{LMR} + \bar{x}^2}{\sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}}$$

(equação 8)

$$CC\beta = C_{LMR} + \delta_{(\alpha, \beta, IJ-2)} \cdot \frac{\sigma}{b} \cdot \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{x_{LMR} + \bar{x}^2}{\sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}}$$

(equação 9)

Aparte dos parâmetros anteriormente definidos, C_{LMR} é a concentração ao nível do LMR e x_{LMR} refere-se ao resultado obtido na amostra quando fortificada ao nível do LMR.

O estabelecimento dos limites $CC\alpha$ e $CC\beta$, de acordo com o estabelecido na Decisão 2002/657/CE¹, deve sempre ser precedido pela confirmação prática dos valores obtidos pelos cálculos indicados^{6,7}.

Interpretação dos resultados

Tendo em conta as definições e aproximações estatísticas anteriormente apresentadas, a interpretação dos resultados pode seguir o esquema apresentado na Figura 3.

Nos métodos de triagem, onde apenas é necessária a determinação do respetivo $CC\beta$, as amostras que contenham resíduos com concentrações superiores a esta concentração, devem ser sujeitas a métodos de confirmação, de modo a verificar a conformidade das mesmas.

Definidos os limites analíticos característicos dos métodos de confirmação pode dizer-se que estes devem ser capazes de detectar/identificar os analitos em 50% dos casos ao nível do $CC\alpha$ e em 95% dos casos o nível do $CC\beta$.

Assim, e de forma prática, as amostras que demonstrem conter algum dos analitos pesquisados numa concentração igual ou superior ao $CC\alpha$ estabelecido para o método de confirmação, são consideradas amostras não-conformes, desde que seja possível concluir pela identificação do resíduo em causa pela aplicação dos respetivos critérios de identificação espectrométrica⁸. Caso contrário a amostra é considerada conforme (negativa) com um grau de confiança de $1-\alpha$.

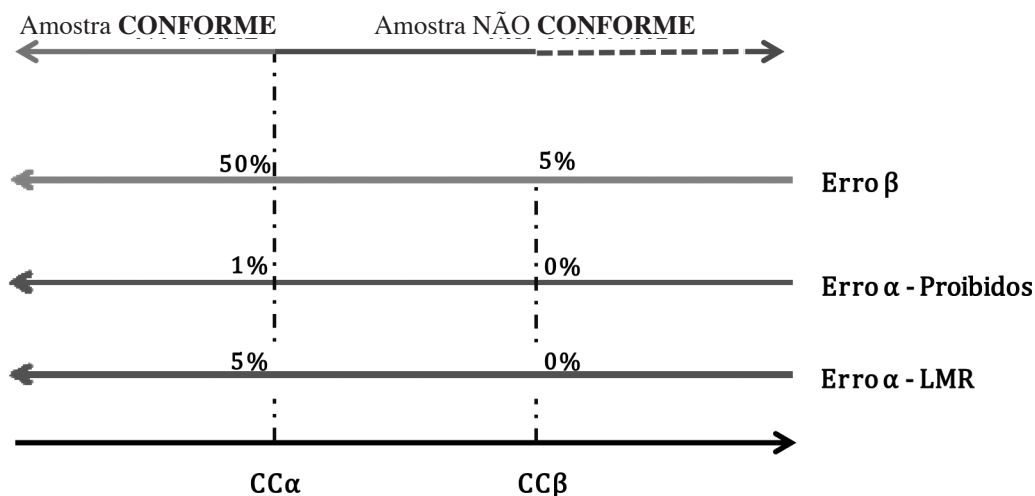


Figura 3 – Representação da declaração de conformidade/não conformidade das amostras

Conclusões

O processo de validação, de acordo com o disposto na 2002/657/EC¹, contempla as flutuações experimentais (dia, operador, equipamentos, matriz) estando estas, também, reflectidas nas concentrações críticas $CC\alpha$ e $CC\beta$ determinadas na validação. Consequentemente, estes parâmetros reflectem de modo realista a variabilidade dos métodos.

O conhecimento de $CC\alpha$ e $CC\beta$, que caracterizam os métodos utilizados na rotina laboratorial para a pesquisa de medicamentos veterinários proibidos ou com LMR definido em alimentos de origem animal, permite ter a percepção do nível de confiança associado ao resultado analítico.

Nesse sentido, a sucinta revisão apresentada sobre $CC\alpha$ e $CC\beta$, a sua forma de cálculo e, sobretudo, como se interpretam os resultados obtidos no controlo oficial da presença de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal para consumo humano, não deixará de contribuir para uma melhor compreensão dos conceitos referidos e da sua aplicação na prática do dia-a-dia, à luz dos regulamentos da União Europeia.

Referências Bibliográficas

1. Decisão da Comissão (EEC) N° 2002/657/CE de 12 de Agosto de 2002, Off J Eur Union. 2002; L221: 8-36.
2. Directiva 2001/82/EC de 6 de Novembro de 2001, revista e actualizada pela Directiva 2004/28/EC de 31 de Março de 2004, Off J Eur Union. 2004; L311: 1-66.
3. Decreto-Lei n.º 314/2009 de 28 de Outubro de 2009, Diário da República, 2009, 1.ª série, 209, 8106-8215.
4. Regulamento da Comissão (EU) N° 37/2010 de 22 de Dezembro de 2009, Off J Eur Union. 2010; L15: 1-72.
5. International Standard Organization: ISO 11843, Capability of detection – Part 2: Methodology in the linear calibration case. 2000. ISBN: 978-0-580-60989-3.
6. Verdon, E., Hurtaud-Pessel, D., Sanders, P., Accred Qual Assur. 2006; 11: 58-62.
7. van Loco, J., Jànosi, A., Impens, S., Fraselle, S., Cornet, V., Degroodt, J. M., Anal Chim Acta. 2007; 586: 8-12.
8. Antignac, J.P., le Bizec, B., Monteau, F., André, F., Anal Chim Acta. 2003; 483: 325-334.