CALIBRAÇÃO: UMA REVISÃO PARA QUÍMICOS ANALÍTICOS

Maria Fernanda Pimentel
Fundação Instituto Tecnológico do Estado de Pernambuco - ITEP - Av. Prof. Luís Freire, 700 - Cidade Universitária - 50740-540 Recife - PE
Benício de Barros Neto
Departamento de Química Fundamental - UFPE - Av. Prof. Luís Freire, s/n - Cidade Universitária - 50670-901 Recife -PE

Recebido em 28/6/95; aceito em 28/9/95

CALIBRATION: A REVIEW FOR ANALYTICAL CHEMISTS. This paper presents a fairly complete revision of several aspects of the calibration procedure that are of practical interest to analytical chemists. After a discussion of least squares fitting, expressions are given for calculating calibration parameters and their confidence intervals, and for estimating the concentration of an unkown. The crucial question of model validation and interpretation is addressed, and then a numerical example, based on real spectrophotometric data, is solved in detail. Finally, practical advice on experimental design is given for three different analytical problems.

Keywords: calibration; linear regression; experimental design.

1. INTRODUÇÃO

A concentração de uma amostra não é uma grandeza física observável. Num processo analítico qualquer a concentração sempre é obtida de forma indireta, a partir de medidas de outras grandezas como absorção ou emissão de luz, condutividade, e até mesmo pesos ou volumes, como nos métodos da química analítica clássica. Isto significa que para chegar ao valor da concentração, cuja determinação é o objetivo final da análise, o químico analítico precisa antes encontrar uma função que relacione as medidas efetivamente realizadas com a concentração procurada. Em outras palavras, em qualquer análise é necessário fazer uma **calibração**.

O processo de calibração normalmente consiste em duas etapas. Na primeira, a etapa **descritiva**, medidas feitas numa série de padrões analíticos de concentrações conhecidas são usadas para construir um modelo que relacione a grandeza medida com a concentração da espécie de interesse. Na segunda etapa, conhecida como **preditiva**, usa-se esse modelo para prever concentrações de novas amostras, a partir dos sinais analíticos medidos para elas.

A calibração evidentemente é uma parte fundamental do processo analítico. Ela afeta a aplicabilidade, a exatidão, a precisão, a duração e o custo global de uma análise. Existe uma vasta literatura tratando dos vários aspectos desse importante procedimento[1], mas sua assimilação pelos profissionais da química em geral é bastante limitada.

O objetivo deste artigo de revisão é reunir num só texto, para divulgação na comunidade química, os procedimentos matemáticos e estatísticos indispensáveis a uma abordagem correta do processo de calibração. Essa informação, embora possa ser encontrada na literatura, acha-se dispersa em várias publicações, muitas das quais num jargão pouco familiar aos químicos. Aqui procurou-se reduzir esse jargão e empregar exemplos retirados da química analítica. Os aspectos mais importantes da calibração são discutidos, tanto do ponto de vista teórico quanto do ponto de vista prático, e procedimentos de rotina para obter curvas precisas e bem ajustadas são sugeridos. Por razões didáticas apenas modelos univariados são considerados, mas a extensão para modelos multivariados não apresenta dificuldade.

2. CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

Quando se deseja construir uma curva de calibração costuma-se fazer a suposição, aliás perfeitamente razoável, de que a curva deve passar "o mais perto possível" dos pontos experimentais. O modo mais empregado de obter corretamente essa máxima proximidade é o **método dos mínimos quadrados**, que fornece resultados não tendenciosos e com variância mínima, dentro de certas suposições de natureza estatística[1c,1i].

Uma relação linear entre uma variável aleatória y e uma variável não aleatória x é descrita pelo modelo

$$y = \beta_0 + \beta_1 x + \varepsilon \quad (1)$$

onde β_0 e β_1 são os parâmetros do modelo e ε é o erro aleatório associado à determinação de y. Na química analítica, y normalmente é o sinal ou a resposta dada por algum instrumento e x é a concentração da espécie química que se quer determinar. Para cada sinal y_i observado num padrão analítico de concentração x_i o modelo linear fornece uma estimativa $(y_e)_i$, dada pela equação

$$(y_e)_i = b_0 + b_1 x_i \quad (2)$$

onde b_0 e b_1 são as estimativas dos parâmetros β_0 e β_1, obtidas na etapa descritiva da calibração. As diferenças entre os valores observados e os valores estimados são os resíduos e_i:

$$ei = y_i - (y_e)_i = y_i - b_0 - b_1 x_i \quad (3)$$

No método dos mínimos quadrados os valores de b_0 e b_1 são estimados minimizando-se a soma quadrática dos resíduos, dada por

$$SQ_r = \Sigma (e_i)^2 = \Sigma [y_i - (y_e)_i]^2 = \Sigma (y_i - b_0 - b_1 x_i)^2 \quad (4)$$

O somatório deve ser feito sobre todos os valores experimentais, ou seja, de $i = 1$ até $i = n$, onde n é o número total de medidas. Os índices foram omitidos do símbolo do somatório para simplificar a notação.

Para minimizar a soma quadrática residual deriva-se a Eq. (4) em relação a b_0 e b_1 e iguala-se as derivadas a zero. Isto

leva, depois de alguns rearranjos, às seguintes expressões para o cálculo de b_0 e b_1:

$$b_0 = (\Sigma y_i - b_1 \Sigma x_i) / n \quad (5)$$

$$b1 = (n\Sigma y_i x_i - \Sigma x_i \Sigma y_i) / [n\Sigma(x_i)^2 - (\Sigma x_i)^2] \quad (6)$$

O tratamento estatístico dos resultados obtidos com o método dos mínimos quadrados exige que sejam válidas (pelo menos aproximadamente) algumas suposições sobre a natureza dos erros associados às medidas. Na presença de violações grosseiras dessas suposições, amostras diferentes extraídas do mesmo sistema podem levar a equações bastante diferentes, isto é, a modelos sem estabilidade[1c]. Especificamente, é preciso admitir que:

- Os únicos erros nas medidas são devidos a flutuações na variável dependente y (o sinal analítico). Se por acaso a variável independente, x (a concentração), também estiver sujeita a erros, estes devem ser desprezíveis quando comparados com os erros em y.
- Os erros ε_i são variáveis aleatórias com média zero e variância constante σ^2.
- Os erros ε_i não são correlacionados.

Para a realização de testes estatísticos e a construção de intervalos de confiança, é necessário acrescentar mais uma suposição referente à forma da distribuição populacional dos erros:

- Os erros ε_i seguem uma distribuição normal.

A primeira hipótese normalmente é satisfeita, se os padrões de calibração forem preparados com todo o cuidado. Uma falta de controle nessa etapa do processo analítico, porém, causará um erro adicional a ε_i que se propagará até a calibração preditiva, afetando a confiabilidade das estimativas[1c,1i,1n,2].

A segunda suposição é comumente violada em algumas técnicas analíticas onde a faixa de trabalho é extensa, como ICP-AES. Nesses casos a variância do sinal não é constante ao longo de toda a faixa de calibração, e sim proporcional à intensidade do sinal analítico[3-6]. Isto significa que o método dos mínimos quadrados ordinários não deve ser empregado, pois embora as estimativas dos parâmetros continuem não sendo tendenciosas, não mais terão variância mínima[5]. Pode-se então adotar três procedimentos alternativos:

- Restringir a faixa de calibração a um trecho onde a variância seja constante;
- Realizar uma transformação estabilizadora da variância e então aplicar o método dos mínimos quadrados ordinários[1i,3,7,8];
- Usar o método dos mínimos quadrados ponderados[8-12].

A ocorrência de variância constante nos erros aleatórios, exigida pela segunda suposição, é conhecida como homoscedasticidade. Os testes estatísticos comumente usados para verificar se a hipótese de homoscedasticidade é satisfeita são o teste F e o teste de Bartlett[1b,1l-13]. Para aplicar esses testes é preciso realizar determinações repetidas num mesmo conjunto de amostras ou padrões. É imprescindível que essas repetições sejam **autênticas**, isto é, cada medida deve ser o resultado da repetição de todo o processo analítico, desde a preparação da amostra até a leitura do sinal. Não basta simplesmente reintroduzir a amostra no aparelho.

Para que a terceira suposição (a que trata das correlações entre os erros) não seja violada é necessário preparar os padrões analíticos separadamente. Além disto, os padrões devem ser preparados de maneira semelhante em cada nível de concentração, para que não ocorra uma variação sistemática em determinado nível provocada pela técnica de preparação, o que comprometeria a hipótese de variância constante ao longo de toda a faixa de interesse. Por exemplo, deve-se tentar efetuar um mesmo número de diluições da solução estoque para cada nível de concentração. Se algum padrão for preparado a partir de um número maior de diluições haverá o risco de a variância em y ser aumentada neste ponto pelo erro introduzido pelas diluições adicionais. Finalmente, como norma geral da boa experimentação, deve-se procurar medir a resposta analítica dos padrões em ordem aleatória, a fim de evitar a associação de possíveis desvios sistemáticos a determinadas concentrações[1a,1z].

3. ERROS PADRÃO E INTERVALOS DE CONFIANÇA PARA OS PARÂMETROS DO MODELO

Tendo-se usado o método dos mínimos quadrados para estimar os parâmetros do modelo proposto, pode-se estimar os erros padrão associados a esses parâmetros através das expressões[1c]

$$s(b_0) = s\,[\Sigma(x_i)^2 / n\Sigma(x_i - x_m)^2]^{1/2} \quad (7)$$

e

$$s(b_1) = s / [\Sigma(x_i - x_m)^2]^{1/2} \quad (8)$$

onde x_m é a média de todas as concentrações x_i usadas no ajuste do modelo e s é uma estimativa do desvio (ou erro) padrão das respostas y_i determinadas repetidamente na mesma concentração x_i. Quando o modelo é correto, uma estimativa não tendenciosa do erro padrão s é obtida a partir da soma quadrática residual dada pela Eq. (4):

$$s = (SQ_r / v)^{1/2} = (MQ_r)^{1/2} \quad (9)$$

onde v é o número de graus de liberdade associado à estimativa s, dado pela diferença entre o número total de medidas realizadas, n, e o número de parâmetros que estão sendo estimados. Neste exemplo, como apenas dois parâmetros são estimados, $v = (n-2)$. A notação MQ_r vem de *média quadrática residual*, o nome que se dá ao valor calculado pela Eq. (9) numa análise de variância.

Admitindo que os erros se distribuam normalmente (quarta suposição), podemos agora usar a distribuição de Student para construir intervalos de confiança em torno das estimativas de β_0 e β_1:

$$\beta_0 = b_0 \pm t\, s(b_0) \quad (10)$$

e

$$\beta_1 = b_1 \pm t\, s(b_1) \quad (11)$$

onde t é o ponto da distribuição de Student correspondente ao nível de confiança desejado, com v graus de liberdade.

4. ERROS PADRÃO E INTERVALOS DE CONFIANÇA PARA A RESPOSTA ANALÍTICA

Considere-se uma determinação realizada numa nova amostra de concentração x_0, num sistema analítico para o qual já tenha sido feita a calibração descritiva. Pode-se usar a curva de calibração para estimar a resposta nesse ponto, y_0, através da Eq. (2). A presença de erros aleatórios fará com que essa estimativa seja afetada por uma certa incerteza, que pode ser quantificada através da expressão[1c,1t,14]

$$s_0 = s\,\{1 + (1/n) + [(x_0 - x_m)^2 / \Sigma(x_i - x_m)^2]\}^{1/2} \quad (12)$$

onde s_0 representa o erro padrão da estimativa y_0.

Imagine-se agora que, ao invés de uma única determinação, seja feita uma série de q determinações repetidas (autenticamente) na mesma amostra de concentração x_0. A resposta média obtida, $(y_0)_q$, será um resultado mais preciso, porque os erros aleatórios tenderão a se cancelar no cálculo da média. O erro padrão da estimativa dessa resposta média a partir da curva de calibração terá portanto um valor menor, dado pela expressão

$$(s_0)_q = s\,\{(1/q) + (1/n) + [(x_0 - x_m)^2 / \Sigma(x_i - x_m)^2]\}^{1/2} \quad (13)$$

que é idêntica à equação anterior, exceto pela substituição da parcela 1 pela parcela $1/q$. Admitindo-se a validade das quatro suposições básicas, pode-se mais uma vez usar a distribuição de Student para obter intervalos de confiança em torno das respostas estimadas. Esses intervalos, cuja largura é determinada pelo produto do erro padrão pelo valor de t apropriado, como nas Eqs. (10) e (11), podem ser usados para avaliar a confiabilidade dos novos resultados.

A variação dos intervalos de confiança ao longo da reta ajustada define uma faixa limitada por duas curvas hiperbólicas. De acordo com a Eq. (13) a largura dessa faixa depende, através do termo $(x_0 - x_m)^2$, da localização de x_0 em relação à média das concentrações empregadas no ajuste do modelo. Essa dependência implica que a largura do intervalo de confiança é mínima em $x_0 = x_m$ e aumenta à medida que x_0 distancia-se de x_m, em ambas as direções. Este é um dos motivos pelos quais é preciso ter cuidado ao se fazer extrapolações além da faixa de calibração. Pode-se ver, ainda na Eq. (13), que a largura do intervalo também é influenciada pelo somatório $\Sigma(x_i - x_m)^2$, que é determinado pelo planejamento experimental empregado na construção da curva, isto é, pelos valores das concentrações utilizados na etapa descritiva. Este assunto, que merece toda a atenção, será discutido adiante, na Seção 10.

5. REGRESSÃO INVERSA

A reta de regressão, com seus intervalos de confiança, representa uma síntese gráfica do conhecimento que se tem da relação entre as concentrações das amostras e os sinais analíticos correspondentes. A partir dela, como se viu, pode-se fazer previsões do valor do sinal esperado para um certo valor da concentração. O que mais interessa ao químico analítico, no entanto, é o oposto: usar a curva de calibração para prever o valor da *concentração* a partir de uma resposta analítica medida, além, é claro, de ter uma estimativa do erro associado a essa previsão. Esse procedimento, chamado de **regressão inversa,** está representado na figura 1.

É simples calcular a estimativa da concentração correspondente a um certo sinal y_0. Basta resolver a Eq. (2) (no caso de um modelo linear) para x :

$$(x_e)_0 = (y_0 - b_0) / b_1 \qquad (14)$$

Chegar a uma expressão que nos dê os intervalos de confiança exige um pouco mais de manipulações algébricas e resulta,

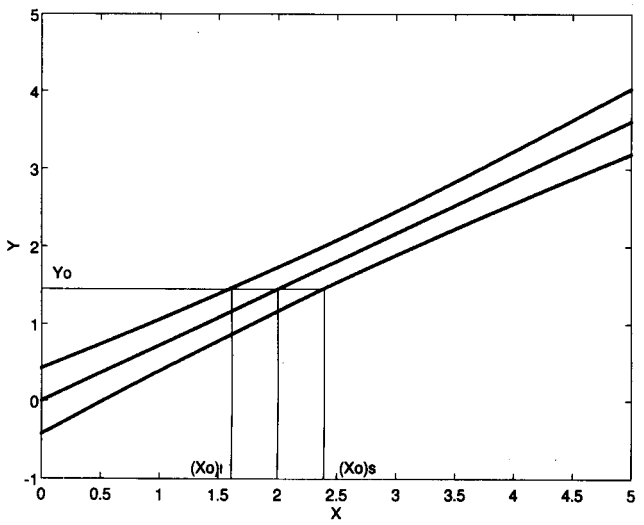

Figura 1. Regressão inversa. As linhas curvas são as hipérboles que definem os intervalos de confiança em torno da reta de regressão. O intervalo de confiança para a concentração estimada a partir de um sinal observado y_0 *vai de* $(x_0)_i$ *a* $(x_0)_s$.

para uma média de q determinações feitas na mesma amostra, no intervalo aproximado

$$x_0 = (x_e)_0 \pm \{ts / b_1\}\{(1/q) + (1/n) + [(x_e)_0 - x_m)^2 / \Sigma(x_i - x_m)^2]\}^{1/2} \qquad (15)$$

Esta expressão é válida quando o coeficiente angular b_1 é estatisticamente significativo e bem determinado, que é a situação em que normalmente se usa a regressão inversa[1b,1c,14]. Todos os parâmetros que afetam a largura dos intervalos de confiança para a média de q novas observações de y [Eq. (13)] também influenciam estes intervalos de confiança. É preciso salientar, porém, que a presença de um só desvio padrão s nesta expressão baseia-se na suposição de que os erros aleatórios na amostra de concentração desconhecida são os mesmos erros associados aos padrões usados para traçar a curva de calibração. Por isso, caso se deseje empregar a Eq. (15), é importante que os padrões e as amostras sejam preparados e analisados da mesma maneira, de forma que todas as possíveis fontes de erro envolvidas na determinação das amostras estejam presentes também na preparação e na análise dos padrões durante a calibração descritiva.

6. VALIDAÇÃO DO MODELO

Só faz sentido calcular as estimativas e seus intervalos de confiança se o modelo empregado estiver correto, isto é, se ele se mostrar capaz de descrever satisfatoriamente o comportamento dos valores experimentais. A validade do modelo e a significância estatística da curva ajustada podem ser testadas por meio da **Análise da Variância**, cujos elementos estão reunidos no quadro I. As expressões mostradas nesse quadro se aplicam ao ajuste, por mínimos quadrados, de um modelo geral com p parâmetros[1z]. A única restrição é que o modelo deve ser linear nos parâmetros, isto é, os parâmetros só podem figurar na equação do modelo como coeficientes de um polinômio. No quadro I está sendo admitida a possibilidade de que haja determinações repetidas do sinal analítico num mesmo nível da concentração. Cada resposta individual é portanto identificada com dois índices: i, que indica o nível da concentração, e j, que distingue as repetições feitas em cada nível.

O ponto de partida da análise da variância é a decomposição da soma quadrática dos desvios de todas as observações em relação à média, SQ_t, em duas parcelas, SQ_{reg} e SQ_r:

$$SQ_t = SQ_{reg} + SQ_r \qquad (16)$$

O termo SQ_r nada mais é que a soma quadrática dos resíduos deixados pelo modelo, como se pode constatar comparando-se a

Quadro I. Tabela de análise da variância para o ajuste de um modelo pelo método dos mínimos quadrados. n_i = número de repetições no nível i; m = número de níveis distintos da variável x; $n = \Sigma n_i$ = número total de medidas; p = número de parâmetros do modelo. O índice i indica o nível da variável x; o índice j refere-se às medidas repetidas da variável y em um dado nível de x. O segundo somatório das expressões para SQ_r, SQ_{ep} e SQ_t vai de $j = 1$ até $j = n_i$. Os outros somatórios vão de $i = 1$ até $i = m$. y_m é a média de todos os valores de y; y_{im} é a média das determinações repetidas no nível i.

Fonte	Soma Quadrática	G. L.	Média Quadrática
Modelo	$SQ_{reg} = \Sigma n_i[(y_e)_i - y_m]^2$	$p-1$	$MQ_{reg} = SQ_{reg} /(p-1)$
Residual	$SQ_r= \Sigma \Sigma [y_{ij} - (y_e)_i]^2$	$n-p$	$MQ_r = SQ_r /(n-p)$
Falta de Ajuste	$SQ_{faj} = \Sigma n_i [(y_e)_i - y_{im}]^2$	$m-p$	$MQ_{faj} = SQ_{faj} /(m-p)$
Erro Puro	$SQ_{ep} = \Sigma \Sigma (y_{ij} -y_{im})^2$	$n-m$	$MQ_{ep} = SQ_{ep} /(n-m)$
Total	$SQ_t = \Sigma \Sigma (y_{ij} -y_m)^2$	$n-1$	

Eq. (4) com a expressão dada no quadro 1. O termo SQ_{reg} é calculado a partir dos valores estimados pelo modelo, e representa a parcela da variação das observações em torno da média global que o modelo consegue reproduzir. O índice *reg* apenas reflete o fato de que o ajuste por mínimos quadrados também é conhecido como **análise de regressão**.

Intuitivamente poder-se-ia acreditar que uma boa maneira de avaliar a qualidade do modelo seria comparar a soma quadrática explicada pelo modelo com a soma quadrática residual. Quanto maior fosse o valor de SQ_{reg} em relação ao valor de SQ_r, melhor seria o modelo. É um fato da matemática, porém, que quanto maior o número de termos de um modelo maior a variação que ele consegue explicar. Se apenas isso fosse importante, o melhor modelo seria automaticamente o que tivesse a equação mais longa. Acontece que há um outro aspecto a ser considerado: cada termo acrescentado tira do modelo um grau de liberdade, e o número de graus de liberdade sempre precisa ser levado em conta nos argumentos estatísticos. Em cada caso é preciso avaliar se o grau de liberdade retirado por um termo adicional é compensado pelo aumento na quantidade de variação que passou a ser explicada pelo modelo. A maneira de fazer isto é comparar não as somas quadráticas, e sim as médias quadráticas que são obtidas dividindo-se essas somas por seus respectivos graus de liberdade, cujas expressões são dadas na última coluna do quadro 1. Quanto maior o valor da razão MQ_{reg}/MQ_r, melhor será o modelo.

Quando há determinações repetidas no mesmo valor da concentração, nenhum modelo, por mais termos que tenha, poderá explicar toda a variação dos valores em torno da média. A razão é que a curva do modelo não pode passar por mais de um valor de y em cada valor de x. Nesses casos, então, há uma parte da variação total que não pode ser explicada, e que chamamos de soma quadrática devida ao erro puro (SQ_{ep} no Quadro 1). A soma quadrática devida ao erro puro obviamente está contida na soma quadrática residual. Na verdade, pode-se demonstrar que a soma quadrática residual é a soma de SQ_{ep} com a soma quadrática devida à falta de ajuste do modelo, SQ_{faj}:

$$SQ_r = SQ_{faj} + SQ_{ep} \tag{17}$$

Dividindo-se esses dois novos somatórios pelos seus graus de liberdade, obtêm-se duas novas médias quadráticas, MQ_{faj} e MQ_{ep}. São essas médias que permitem fazer uma avaliação estatística da qualidade do ajuste do modelo.

Teste da Falta de Ajuste

Se o modelo está bem ajustado, a média quadrática devida à falta de ajuste reflete apenas os erros aleatórios[1a,1c,1i]. Como a média quadrática devida ao erro puro também é uma estimativa dos erros aleatórios, nesse caso tanto MQ_{faj} quanto MQ_{ep} estariam estimando a mesma grandeza, a variância populacional σ^2. É de se esperar, portanto, que os seus valores numéricos não sejam significativamente diferentes. Isto pode ser testado comparando-se a razão entre as duas médias com o ponto da distribuição F correspondente aos mesmos números de graus de liberdade, no nível de confiança escolhido. Se MQ_{faj}/MQ_{ep} for maior do que $F_{vfaj,vep}$, conclui-se que há evidência de falta de ajuste, e que o modelo pode ser melhorado. A recíproca é verdadeira: se a razão entre as duas médias quadráticas for inferior ao valor de F, o ajuste do modelo pode ser considerado satisfatório. Esta é a melhor forma de se verificar se o modelo é ou não adequado. Para tornar possível a aplicação deste teste, no entanto, o planejamento experimental deve prever a realização de repetições autênticas em pelo menos um dos valores da concentração. Caso as repetições não sejam autênticas, a média quadrática devida ao erro puro subestimará σ^2 e o teste F poderá indicar uma falta de ajuste que na realidade não existe.

Teste da Significância da Regressão

Na hipótese de que $\beta_1=0$, ou seja, de que não exista relação linear entre as variáveis y e x, tanto a média quadrática devida à regressão quanto a média quadrática residual serão estimativas de σ^2, a variância populacional[1c,1i]. Em outras palavras, ambas refletirão apenas o erro aleatório. Essa hipótese pode ser avaliada, mais uma vez, por meio de um teste F. Basta comparar a razão MQ_{reg}/MQ_r com o valor apropriado de $F_{vreg,vr}$. Um valor estatisticamente significativo da razão entre as médias (isto é, maior do que o valor tabelado para F) indicará a existência de uma relação linear entre as duas variáveis. Quanto maior for a razão entre MQ_{reg}/MQ_r e o valor de F, mais significativa será a relação. Alguns autores recomendam que MQ_{reg} deve ser pelo menos cinco vezes maior que MQ_r, para que a regressão tenha utilidade prática[1c].

Análise dos resíduos

Tão importante quanto fazer os testes F é examinar cuidadosamente os resíduos deixados pelo modelo. Num modelo bem ajustado esses resíduos devem dar a impressão de ter sido produzidos por uma distribuição normal, ou melhor, não devem apresentar nenhum indício de anormalidade. A figura 2 ilustra três possiblidades. O caso (a) mostra a situação ideal, em que o modelo está bem ajustado: os resíduos estão distribuídos aleatoriamente, e não há nada que indique que sua variância não é constante. Já na figura 2(b), embora a distribuição continue aleatória, pode-se perceber claramente que os resíduos crescem com o valor da concentração, indicando a presença de heteroscedasticidade. Nesse caso, deve-se tomar uma das atitudes recomendadas na Seção 2. Finalmente, em 2(c), é evidente o aparecimento de uma estrutura não aleatória, de aspecto curvilíneo. Os resíduos são menores nas extremidades da faixa de calibração, e maiores na região intermediária. Isto significa que parte da estrutura sistemática dos dados não foi explicada pelo modelo adotado. É necessário portanto modificar o modelo, possivelmente acrescentando-lhe um termo quadrático.

7. COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO

O coeficiente de determinação, ou coeficiente de correlação múltipla, R^2, é a razão entre a soma quadrática explicada pela regressão e a soma quadrática total:

$$R^2 = SQ_{reg} / SQ_t = \Sigma\, n_i[\,(y_e)_i - y_m]^2 \,/\, \Sigma\,\Sigma\,(y_{ij} - y_m)^2 \tag{18}$$

O somatório SQ_t representa a variação total dos sinais analíticos em torno de sua própria média. O termo SQ_{reg} é a parcela dessa variação que o modelo consegue descrever. A razão entre eles, R^2, é comumente chamada de **variação percentual explicada pelo modelo**. Como a capacidade explicativa de um modelo pode ir desde zero até no máximo SQ_t, concluimos que $0 \leq R^2 \leq 1$. Quanto mais próximo de 1 estiver o valor de R^2, mais o modelo consegue descrever a variação em y. Este coeficiente é usado com muita frequência para avaliar o ajuste de um modelo, mas a sua interpretação requer uma certa cautela.

Um erro comum é interpretar a raiz quadrada do coeficiente de determinação (com o sinal apropriado) como sendo o coeficiente de correlação entre x e y, isto é,

$$r\,(x,y) = (\text{sinal de } b_1)(R^2)^{1/2} \tag{19}$$

Na verdade isto só é válido para o ajuste de uma reta. O que R realmente representa, em qualquer circunstância, é o coeficiente de correlação entre os valores observados e os valores estimados pelo modelo:

$$R = r\,(y_e\,,\,y) \tag{20}$$

Outro erro comum é usar o valor numérico de R^2, ou de sua

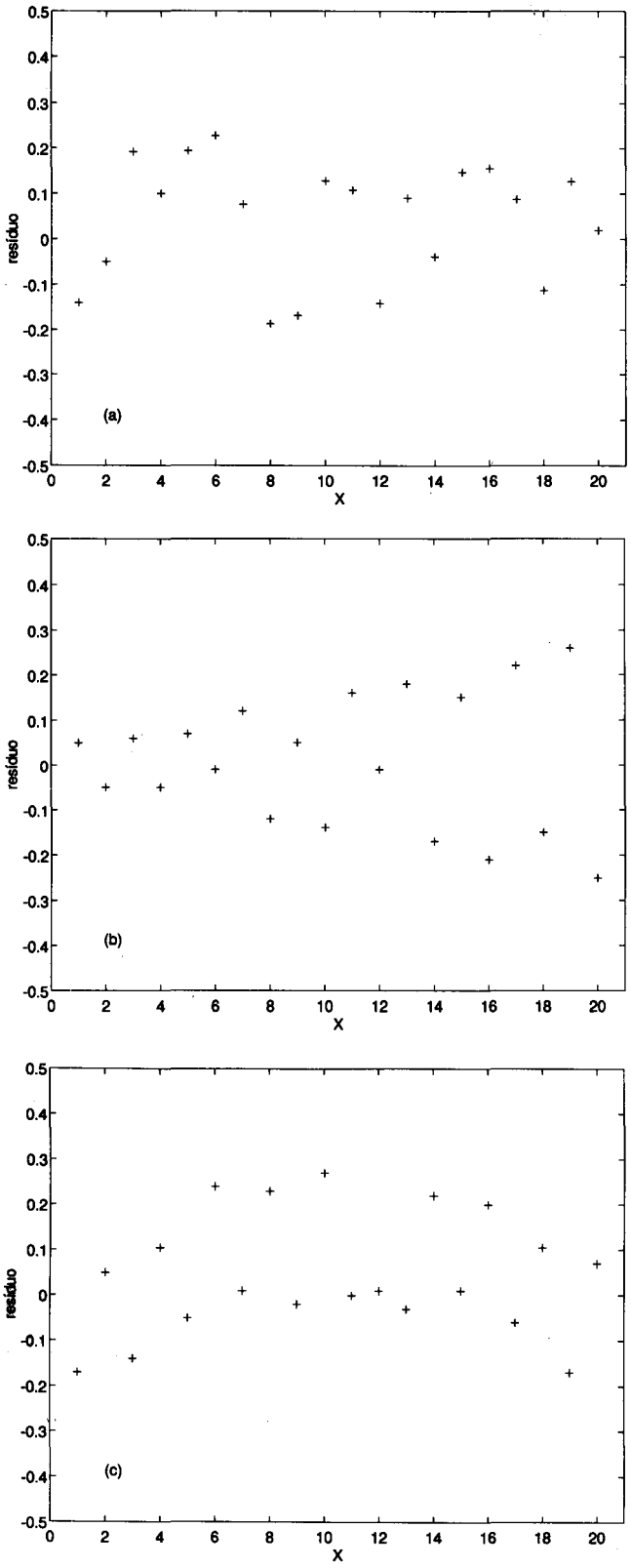

Figura 2. Gráfico dos resíduos em função da concentração. (a) Resíduos distribuídos aleatoriamente. (b) Resíduos distribuídos aleatoriamente mas de variância crescente. (c) Resíduos não aleatórios, apresentando estrutura sistemática.

raiz quadrada R, para avaliar um modelo e concluir, caso esse valor seja suficientemente alto, que o ajuste é satisfatório[1c,15,16]. Um valor de 0,99 para R (isto é, $R^2 = 0{,}98$) é obviamente muito alto, mas significa apenas que 98% da variação total em torno da média foi explicada pelo modelo. É possível que os 2% restantes estejam concentrados numa única porção da curva, e isso indicaria falta de ajuste. O modo correto de fazer a avaliação é usar o teste F para a falta de ajuste, como já se enfatizou.

É comum ainda, dado um valor de R próximo de 1, concluir-se erroneamente que o intervalo de confiança para estimativas da concentração será estreito. Na verdade o valor de R não fornece informação direta sobre a incerteza na concentração[14]. Como se pode observar na Eq. (15), a incerteza na estimativa da concentração é influenciada não só pela qualidade do ajuste e pela extensão dos erros aleatórios (s), mas também pelo número de determinações repetidas na amostra (q), pelo número de padrões usados na calibração (n e consequentemente t) e pelo planejamento experimental, isto é, pela escolha das concentrações dos padrões.

8. UM EXEMPLO NUMÉRICO

Para ilustrar os cálculos envolvidos nas diversas etapas da calibração será apresentado nesta seção um exemplo numérico, tirado de uma experiência realizada pelos autores[17]. O exemplo baseia-se numa determinação espectrofotométrica de ferro em águas naturais por absorção molecular, usando-se ortofenantrolina como agente complexante[17,18]. A curva de calibração deve relacionar a resposta do instrumento, neste caso a absorvância (variável dependente, y), com a concentração de ferro na amostra (variável independente, x). O objetivo é trabalhar apenas na faixa linear, mas não se sabe previamente até onde vai essa faixa. Isto significa que será necessário testar se há falta de ajuste para o modelo linear na faixa de trabalho. Ao invés de admitir *a priori* a Lei de Beer, que corresponde à equação $y = \beta_1 x + \varepsilon$ e é representada pela conhecida "reta passando pela origem", é preferível adotar o modelo linear geral, $y = \beta_0 + \beta_1 x + \varepsilon$. Obrigar a curva de calibração a passar pela origem é uma restrição desnecessária, que equivale a supor que o ponto ($x=0$, $y=0$) é exato e tem variância zero, o que dificilmente ocorreria na prática. O emprego do modelo geral permite avaliar a significância estatística do termo β_0, a partir da qual pode-se então decidir se ele deve ou não ser mantido na equação.

Para construir a curva de calibração foram preparados oito padrões, com concentrações de íons ferro distribuídas em cinco níveis diferentes, como mostra a tabela I. A absorvância desses padrões foi lida em um espectrofotômetro Micronal B-242, com cubetas de 4 cm. No nível de concentração 0,2mg/L foram feitas quatro determinações (repetições autênticas), para se obter uma estimativa do erro puro.

Para ajustar uma reta a estes dados usa-se as equações (5) e (6), obtendo-se as seguintes estimativas para os parâmetros β_0 e β_1:

$$b_0 = 0{,}011 \qquad b_1 = 0{,}693$$

Antes de se pensar em utilizar estes valores para fazer previsões, é preciso verificar se o modelo linear está bem ajustado

Tabela I. Resultados de uma determinação de ferro por absorção molecular na região do UV-VIS, usando ortofenantrolina como agente complexante[17].

Concentração dos Padrões em mg/L (x)	Absorvância (y)
0,2	0,1351
0,2	0,1519
0,2	0,1344
0,2	0,1457
1,0	0,7169
1,5	1,0846
2,0	1,4416
2,5	1,6849

aos dados coletados. Isto é feito através de uma análise da variância, substituindo-se os dados apropriados nas expressões do quadro I. Os resultados assim obtidos encontram-se na tabela II.

Tabela II. Análise da variância para o ajuste do modelo $y=\beta_0+\beta_1 x+\varepsilon$ aos dados da Tabela I.

Fonte	Soma Quadrática	G. L.	Média Quadrática
Modelo	SQ_{reg} =2,90629	1	MQ_{reg} = 2,90629
Residual	SQ_r= 0,00722	6	MQ_r = 0,00120
Falta de Ajuste	SQ_{faj} = 0,00700	3	MQ_{faj} = 0,00233
Erro Puro	SQ_{ep} = 0,00022	3	MQ_{ep} =0,00007
Total	SQ_t = 2,91351	7	

Como se dispõe de uma estimativa do erro puro (graças às determinações repetidas), há condições de se verificar se não há falta de ajuste, comparando-se a média quadrática de falta de ajuste com a média quadrática devida ao erro puro. O valor da razão MQ_{faj}/MQ_{ep} é 32,26; o valor da distribuição F com o mesmo número de graus de liberdade (3 e 3) é 9,28, no nível de 95% de confiança. Como o valor de MQ_{faj}/MQ_{ep} é bem maior que o valor de F tabelado, existe uma forte indicação de que o modelo linear apresenta falta de ajuste.

O motivo pode ser percebido na figura 3, que mostra o gráfico dos resíduos contra os valores da concentração. Embora o número de pontos seja pequeno, percebe-se claramente um padrão curvo, semelhante ao caso (c) da figura 2. Os resíduos inicialmente são negativos, depois passam a ser positivos na faixa central, e voltam a ficar negativos no final. Tal comportamento, como se viu, é típico de um modelo inadequado.

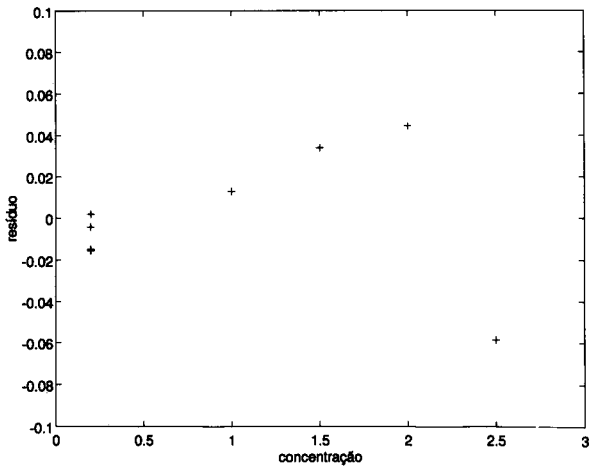

Figura 3. Gráfico dos resíduos em função da concentração, para o ajuste do modelo $y=\beta_0+\beta_1 x+\varepsilon$ *aos dados da Tabela I.*

O coeficiente de determinação para este ajuste é calculado a partir da Eq. (18):

$$R^2 = SQ_{reg} / SQ_t = 2{,}90629 / 2{,}91351 = 0{,}9975 \text{ ou } R = 0{,}9987$$

Como a soma quadrática devida ao erro puro não pode ser explicada por modelo nenhum, o valor máximo que R^2 poderia assumir é

$$R^2_{max} = (SQ_t - SQ_{pe}) / SQ_t = (2{,}91351-0{,}00022) / 2{,}91351 = 0{,}9999$$

O modelo consegue explicar portanto (0,9975/0,9999)x100 = 99,76% da variância máxima explicável, o que é obviamente um valor muito alto, aparentemente satisfatório. Uma análise feita em termos da raiz quadrada de R^2, que é o tão usado coeficiente de correlação, levaria à mesma conclusão. Apesar desses altos valores, a pequena percentagem de variação que o modelo não consegue explicar é causada por uma falta de ajuste, conforme foi comprovado através do teste F.

Como o modelo $y=\beta_0+\beta_1 x+\varepsilon$ apresenta falta de ajuste, não faz sentido, do ponto de vista estatístico, estimar os erros dos parâmetros, construir intervalos de confiança ou fazer previsões a partir da equação de regressão. Como alternativa seria possível tentar ajustar outro modelo (talvez uma parábola), capaz de reproduzir a curvatura exibida pelos resíduos. O procedimento mais comum em química analítica, no entanto, é procurar trabalhar apenas na faixa linear. Assim, vai-se ajustar novamente uma reta, mas numa faixa de concentração reduzida para 0,2 - 2,0 mg/L, isto é, retirando-se dos cálculos o último nível de concentração da tabela I, 2,5 mg/L. Com isto a equação ajustada passa a ser y_e = - 0,003 + 0,723 x. A análise da variância para esse novo ajuste é mostrada na tabela III.

Tabela III. Análise da variância para o ajuste do modelo $y=\beta_0+\beta_1 x+\varepsilon$ aos dados da Tabela I, excluindo-se o nível de 2,5 mg/L.

Fonte	Soma Quadrática	G. L.	Média Quadrática
Modelo	SQ_{reg} =1,77495	1	MQ_{reg} = 1,77495
Residual	SQ_r = 0,00024	5	MQ_r = 0,00005
Falta de Ajuste	SQ_{faj} = 0,00002	2	MQ_{faj} = 0,00001
Erro Puro	SQ_{ep} = 0,00022	3	MQ_{ep} =0,00007
Total	SQ_t = 1,77519	6	

Desta vez o valor de MQ_{faj}/MQ_{ep} é apenas 0,14, muito inferior ao valor de F com 2 e 3 graus de liberdade, que é 9,55, no nível de confiança de 95%. Não há, com o último nível deixado de fora, nenhuma indicação de falta de ajuste para o modelo linear. Isto também fica claro examinado-se o gráfico dos novos resíduos, mostrado na figura 4. Os valores agora parecem flutuar aleatoriamente, sem qualquer tendência perceptível, num padrão semelhante ao da figura 2(a). Neste novo ajuste o coeficiente de determinação, R^2, passa a ter um valor de 0,9999.

Agora que a falta de ajuste foi eliminada pode-se realizar o teste F de significância da regressão. O valor da razão MQ_{reg}/MQ_r é altíssimo: 37289. O ponto da distribuição F com 1 e 5 graus de liberdade, no nível de 95% de confiança, é apenas 6,61. Como a

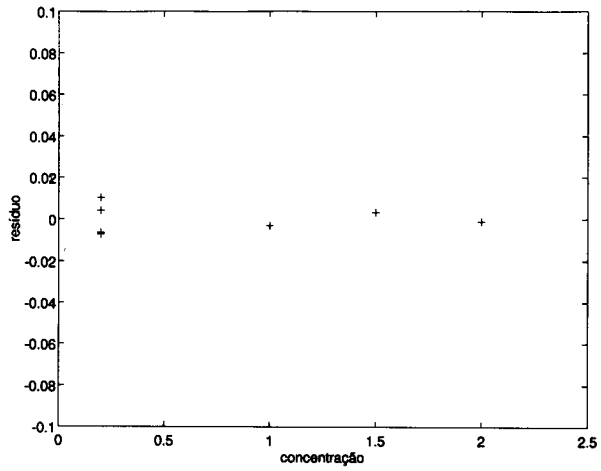

Figura 4. Gráfico dos resíduos para o ajuste do modelo $y=\beta_0+\beta_1 x+\varepsilon$ *aos dados da Tabela I, excluindo-se o nível de concentração de 2,5 mg/L.*

razão calculada é muitas vezes maior que o valor de F tabelado, pode-se concluir que a regressão é altamente significativa.

Tendo-se verificado que o modelo linear descreve adequadamente a relação entre a absorvância e a concentração na faixa 0,2 - 2,0 mg/L, pode-se utilizar as equações (7) e (8) para calcular os erros padrão associados às estimativas dos parâmetros e com eles construir intervalos de 95% de confiança para β_0 e β_1. Como não há falta de ajuste, pode-se usar o valor de $(MQ_r)^{1/2}$ como estimativa do erro padrão das respostas. Tem-se então

$$s(b_0) = 0{,}0038 \qquad \text{e} \qquad s(b_1) = 0{,}0037$$

Com estes valores e o ponto da distribuição de Student com 5 graus de liberdade, 2,57, chega-se aos intervalos de 95% de confiança para os dois parâmetros do modelo:

$$\beta_0 = -0{,}003 \pm 0{,}010$$

$$\beta_1 = 0{,}723 \pm 0{,}010$$

Agora existem condições de se utilizar a curva de calibração para fazer previsões. Considere-se uma amostra de concentração desconhecida para a qual tenham sido medidas, em duplicatas autênticas, as absorvâncias 0,7304 e 0,7430. Para obter uma estimativa da concentração da amostra basta substituir na Eq. (14) o valor médio dessas duas medidas, 0,7367:

$$(x_e)_0 = (0{,}7367 + 0{,}003) \,/\, 0{,}723 = 1{,}023 \text{ mg/L}$$

O intervalo com 95% de confiança em torno de $(x_e)_0$ é dado pela equação (15), fazendo-se q=2, já que $(x_e)_0$ foi calculado a partir da média de duas observações. O resultado é

$$x = 1{,}02 \pm 0{,}02 \text{ mg/L}$$

o que significa, com 95% de confiança, que a concentração de ferro na amostra deve estar entre 1,00 e 1,04 mg/L.

9. NOTAÇÃO MATRICIAL

Todas as equações apresentadas aqui podem ser reescritas em termos de álgebra matricial, isto é, empregando-se vetores e matrizes. Além de fornecer uma notação mais compacta e clara, o uso de matrizes tem a enorme vantagem de fazer com que as equações se tornem gerais, podendo ser aplicadas a quaisquer regressões lineares, não importa o número de termos do modelo[1c]. Como a igualdade entre duas matrizes na verdade corresponde a várias igualdades entre seus elementos, as várias equações necessárias para fazer o ajuste e a validação do modelo podem ser representadas por umas poucas equações matriciais.

Nesta seção será adotada a convenção tipográfica usual, representando-se vetores e matrizes em negrito. A transposição será indicada por um apóstrofo (').

Para o ajuste do modelo descrito pela Eq. (1), por exemplo, são necessários os seguintes vetores e matrizes, escritos na forma transposta para economizar espaço:

$$\mathbf{y}' = [y_1\, y_2 \ldots y_n] \quad \boldsymbol{\beta}' = [\beta_0\, \beta_1] \quad \mathbf{b}' = [b_0\, b_1] \quad \boldsymbol{\varepsilon}' = [\varepsilon_0\, \varepsilon_1]$$

$$\mathbf{x}_0' = [1\ x_0] \qquad \mathbf{X}' = [1\ 1 \ldots 1\ ;\ x_1\, x_2 \ldots x_n]$$

O ponto-e-vírgula na matriz $\mathbf{X}'$ indica mudança de linha. Para modelos mais complicados basta ampliar as dimensões destas matrizes de modo a acomodar os parâmetros e/ou variáveis adicionais. Cuidando-se destes detalhes, sempre se poderá representar um modelo linear qualquer por meio da expressão matricial

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \boldsymbol{\varepsilon} \tag{21}$$

Os parâmetros desse modelo são estimados por

$$\mathbf{b} = (\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}\mathbf{X}'\mathbf{y} \tag{22}$$

e com estas estimativas é possível calcular os valores $\mathbf{y}_0$ esperados para novas amostras $\mathbf{x}_0$:

$$\mathbf{y}_0 = \mathbf{x}_0'(\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}\mathbf{X}'\mathbf{y} \tag{23}$$

O intervalo de confiança em torno de uma resposta analítica y_0 é definido pela expressão

$$y_0 = (y_e)_0 \pm ts[\ (1/q) + \mathbf{x}_0'(\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}\mathbf{x}_0\ ]^{1/2} \tag{24}$$

Os intervalos de confiança das Eqs. (10), (11) e (15) passam a ser dados por

$$\boldsymbol{\beta} = \mathbf{b} \pm ts\ [(\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}]^{1/2} \tag{25}$$

e

$$x_0 = (x_e)_0 \pm [ts\ /\ b_1][\ (1/q) + \mathbf{x}_0'(\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}\mathbf{x}_0\ ]^{1/2} \tag{26}$$

10. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Um químico interessado em construir uma curva de calibração sabe que precisa medir a resposta do instrumento em um certo número de padrões analíticos de diferentes concentrações. O planejamento experimental, isto é, a escolha dos níveis de concentração para os quais a resposta será medida, deve ser feito de modo a fornecer uma curva com precisão ótima e ainda, caso seja necessário, permitir ao interessado verificar se o modelo proposto é adequado e se a variância em y pode ser considerada constante.

A precisão da curva de calibração pode ser avaliada em termos dos intervalos de confiança associados às respostas, às estimativas dos parâmetros, ou às estimativas das concentrações. Todos estes intervalos, definidos pelas equações (24)-(26), dependem do planejamento experimental, através da matriz $(\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}$. Isto sugere que um planejamento experimental ótimo, em termos de precisão, será aquele que de alguma forma minimize a matriz $(\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}$, que tem dimensões pxp, onde p é o número de parâmetros do modelo a ser ajustado. Como não existe uma medida única para determinar quão pequena é uma matriz, várias funções dos elementos da matriz $(\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}$ foram propostas como critério de otimização, resultando em diversos tipos de planejamento[19-22]. O mais usado e estudado é o **planejamento D-otimizado**, que usa como critério de otimização a minimização do determinante de $(\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}$.

Os planejamentos D-otimizados dependem do modelo adotado e não permitem verificar se ocorre falta de ajuste, porque o número de níveis recomendado com base na minimização do determinante de $(\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}$ é sempre igual ao número de parâmetros do modelo proposto[23]. Caso o modelo escolhido seja uma reta, por exemplo, o planejamento D-otimizado terá apenas dois níveis de concentração e estes níveis serão os pontos extremos da faixa de calibração. O quadro II apresenta planejamentos D-otimizados para vários modelos polinomiais. Nesse quadro admitiu-se, para

Quadro II. Planejamentos D-otimizados para modelos polinomiais. A faixa de calibração vai de -1 (o nível mais baixo) a +1 (o nível mais alto). O número de níveis distintos da concentração é igual ao número de parâmetros do modelo. Um polinômio de grau n tem n+1 parâmetros.

Grau do polinômio	PLANEJAMENTOS					Fração das medidas em cada nível
1	-1				+1	1/2
2	-1		0		+1	1/3
3	-1	-0,447		+0,447	+1	1/4
4	-1	-0,655	0	+0,655	+1	1/5
5	-1	-0,765 -0,285		+0,285 +0,765	+1	1/6

simplificar, que a faixa de calibração vai de -1 a +1. Na prática, ao invés de se minimizar o determinante de $(\mathbf{X'X})^{-1}$, o que envolveria uma etapa de inversão, parte-se da chamada matriz de informação, $(\mathbf{X'X})$, e maximiza-se o seu determinante.

Os exemplos seguintes visam fornecer uma orientação para a escolha de um planejamento experimental, baseada no que o interessado sabe ou quer saber sobre o sistema analítico de interesse. Como na maioria dos problemas de calibração em química analítica a relação entre a resposta e a concentração é linear (reta) ou no máximo quadrática (parábola) vamos mais uma vez nos deter nestes casos.

Caso 1. O interessado sabe, por experiência prévia, que a relação entre a concentração e a resposta é linear na faixa de calibração

Este é um caso típico de determinações de rotina, onde toda a metodologia já foi devidamente testada e onde já se acumulou conhecimento suficiente sobre o método que se deseja empregar e sobre suas limitações. Por exemplo, em técnicas como ICP-AES, onde a faixa linear é bastante extensa, não há risco de desvios da linearidade dentro da faixa de trabalho, uma vez que o método tenha sido adequadamente desenvolvido. Em situações assim, deve-se adotar o planejamento D-otimizado para o ajuste de uma reta. O número de padrões de calibração não deve ser inferior a quatro, sendo dois repetidos em cada extremo da faixa, como se mostra na figura 5(a), que corresponde ao primeiro planejamento do quadro II. As repetições permitem verificar se não ocorreram erros sistemáticos na preparação dos padrões, como, por exemplo, uma diluição inadequada da

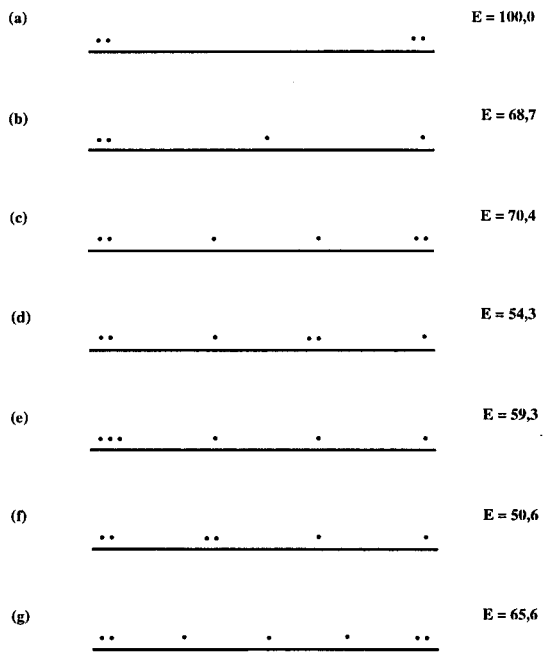

Figura 5. Alguns planejamentos experimentais para o ajuste de um modelo linear. A Fig. 5(a) mostra o planejamento D-otimizado. E *representa a eficiência de cada planejamento em relação ao planejamento D-otimizado.*

solução estoque. O primeiro nível de concentração pode ser $x_1 = 0$, isto é, a determinação do branco.

Vale a pena lembrar que as repetições devem ser autênticas. Se isso não ocorrer, não só não será possível detectar erros grosseiros, como também não haverá condições de se obter uma estimativa realista dos erros aleatórios associados à preparação dos padrões. Também se deve recordar que, para um mesmo planejamento, quanto mais repetições forem feitas mais estreitos serão os intervalos de confiança,.

Caso 2. O interessado sabe que a relação entre a concentração e a resposta tem uma grande possibilidade de ser linear mas não está absolutamente certo

Este também seria um caso típico de determinações de rotina, porém em técnicas onde a faixa linear do instrumento não é tão extensa, como fotometria de emissão em chama ou absorção atômica. Nesses métodos a faixa linear pode ser alterada com o tempo, e esse possível desvio da linearidade ocorre no extremo superior da faixa de concentrações. Em casos assim não convém adotar o planejamento D-otimizado, porque são necessários no mínimo três níveis de concentração para verificar se o modelo linear é adequado, e o planejamento D-otimizado para uma reta só tem dois. Além disto, deve-se lembrar que para se estimar a média quadrática devido ao erro puro, necessária para o teste F, é preciso repetir pelo menos uma determinação. Assim, o número mínimo recomendável de padrões também seria quatro, o que levaria, por exemplo, ao planejamento da figura 5(b). No entanto, se este planejamento for adotado, tanto a média quadrática MQ_{ep} quanto a média quadrática MQ_{faj} serão estimadas com apenas um grau de liberdade, o que é desaconselhável. Seria melhor então trabalhar com pelo menos 6 padrões, distribuídos em 4 níveis de concentração, como nos planejamentos 5(c) - 5(f). Na verdade, do ponto de vista estatístico, quanto maior o número de determinações melhor, mas em análises de rotina não automatizadas em geral não é viável, em termos de custo e tempo, construir curvas de calibração com mais de 6 padrões, a não ser em casos onde a precisão exigida justifique uma análise mais demorada e dispendiosa.

Na decisão sobre os níveis de concentração a serem adotados (além dos pontos extremos) e sobre a localização das repetições é conveniente levar em conta a eficiência do planejamento, definida por[20]

$$E = 100\ [\det(\mathbf{X'X}) \ / \ \det(\mathbf{X'X})_{otimizado}] \qquad (27)$$

onde o numerador é o determinante da matriz $(\mathbf{X'X})$ para o planejamento proposto e o denominador é o determinante correspondente no planejamento D-otimizado. A figura 5 também mostra as eficiências dos vários planejamentos apresentados. Pode-se observar que dos planejamentos 5(c) a 5(f) o que tem maior eficiência é o planejamento 5(c), o que significa que ele é mais parecido com o planejamento D-otimizado que os outros três. Isto não quer dizer, porém, que ele seja obrigatoriamente o mais adequado. Caso ocorra falta de ajuste, que é a possibilidade discutida aqui, o procedimento normal é eliminar o nível mais alto da concentração, para restringir a faixa de trabalho à região linear. No planejamento 5(c) isto levaria à exclusão de dois valores, enquanto nos outros três planejamentos somente um ponto seria desprezado, apesar de as eficiências serem menores. Com a eliminação do último nível restariam ainda 5 pontos, distribuídos em 3 níveis e portanto, sob este aspecto, os planejamentos 5(d) - 5(f) seriam preferíveis. Considerando-se agora a eficiência, pode-se concluir finalmente que seria aconselhável usar o planejamento 5(e). Um raciocínio semelhante pode facilmente ser aplicado pelo usuário a cada caso específico, de forma a levar em conta, além da eficiência teórica, suas expectativas em relação ao comportamento da curva de calibração, como neste exemplo.

Caso 3. O usuário não tem qualquer informação prévia sobre a relação entre a resposta e a concentração na faixa de trabalho

Este é o exemplo típico do desenvolvimento de metodologias analíticas. Como cada caso é um caso, não é possível fazer

recomendações muito específicas. O que se pode dizer é que o planejamento deve permitir, no mínimo, a realização do teste de falta de ajuste para os modelos linear e quadrático, com razoável significância estatística. Para que as médias quadráticas MQ_{ep} e MQ_{faj} possam ser estimadas com dois graus de liberdade, por exemplo, é necessário usar pelo menos 7 padrões, com concentrações distribuídas em 5 níveis, como no último planejamento da figura 5.

No desenvolvimento de uma metodologia analítica muitas vezes também é necessário, além de testar os modelos linear e quadrático, verificar se a variância em y é constante ao longo da faixa de calibração (suposição básica 3). Para fazer essa verificação é preciso se dispor de estimativas confiáveis do erro padrão das observações, que só podem ser obtidas a partir de repetições autênticas, feitas pelo menos nos dois pontos extremos da faixa. Assim sendo, convém aumentar o número de medidas repetidas nos níveis de concentração selecionados (incluindo obviamente os extremos). Recomenda-se realizar no mínimo 4 repetições em cada extremo.

11. RESUMO DO PROCEDIMENTO GERAL DE CALIBRAÇÃO

Nesta seção descreve-se resumidamente, na ordem em que elas ocorrem, as etapas que devem ser seguidas numa calibração, considerando-se tudo o que foi discutido neste artigo. Para que a metodologia seja a mais geral possível, vai-se admitir que haja necessidade de testar todas as hipóteses. Num caso real, no entanto, o interessado pode eliminar algumas das etapas propostas, dependendo do seu conhecimento prévio do problema. A figura 6 mostra um fluxograma do procedimento geral recomendado.

- A - O primeiro passo é planejar a coleta dos dados, de forma que se possam retirar todas as informações necessárias, e ainda obter uma curva de calibração ajustada com o máximo de precisão.
- B - Em seguida é preciso verificar se os dados satisfazem a hipótese de variância constante. Se não, empregar um dos procedimentos recomendados na Seção 2.
- C - Ajustar um modelo linear (inicialmente)
- D - Construir a tabela de análise da variância e fazer uma análise crítica dos resíduos.
- E - Se não houver evidência de falta de ajuste, e se a regressão for estatisticamente significativa, calcular os intervalos de confiança e fazer a regressão inversa. Caso contrário, voltar à etapa C e fazer um novo ajuste restringindo a faixa de trabalho, aplicando uma transformação ou usando um novo modelo.

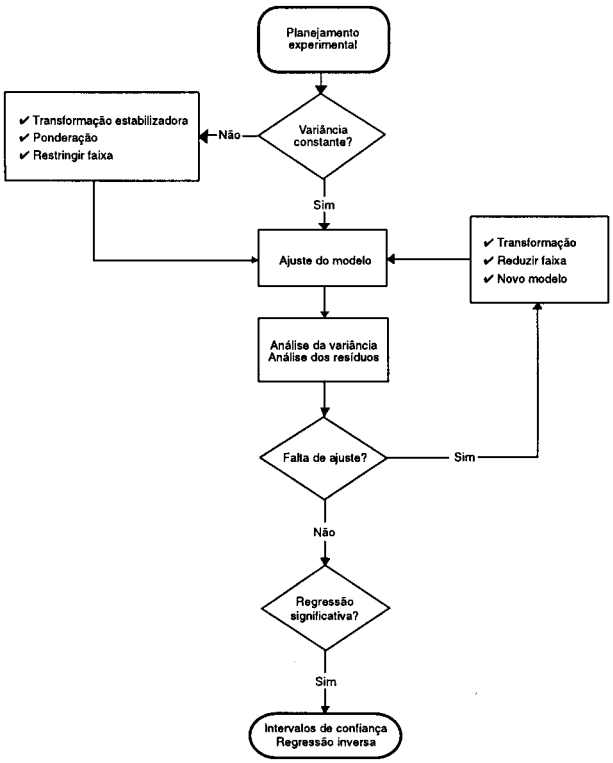

Figura 6. Um fluxograma para o procedimento geral de calibração.

12. CONCLUSÃO

Neste artigo pretendeu-se oferecer uma contribuição para difundir os conhecimentos necessários para a realização correta de todas as etapas de uma calibração, desde o planejamento dos experimentos até a previsão da concentração de uma amostra de interesse, e da estimativa da incerteza dessa previsão. Embora se baseiem em conceitos de estatística que nem sempre são incluídos na formação básica de um químico, os métodos apresentados são de aplicação relativamente simples. Além disto, todos os cálculos necessários podem ser facilmente programados num microcomputador, o que permite a obtenção rápida da resposta procurada, em procedimentos analíticos de rotina. Atualmente está na fase final de desenvolvimento, no laboratório dos autores, um programa de calibração escrito em linguagem QBASIC que deverá permitir aos usuários obter os resultados corretos sem necessidade de grandes conhecimentos de estatística.

AGRADECIMENTOS

Somos gratos aos Profs. M. C. U. de Araújo e T. C. B. Saldanha pelas sugestões. Também queremos agradecer o apoio financeiro recebido do CNPq, na forma de bolsas de pesquisa (BBN) e de pós-graduação (MFP).

REFERÊNCIAS

1. Por exemplo: (a) Box, G. E. P.; Hunter, W. G.; Hunter, J. S.; *Statistics for experimenters*, John Wiley and Sons; New York 1987. (b) Liteanu, G.; Rica, I.; *Statistical theory and methodology of trace analysis*, John Wiley and Sons; New York, 1980. (c) Draper, N. R.; Smith, H.; *Applied regression analysis*, John Wiley and Sons, 2a ed.; New York, 1981. (d) Agterdenbos, J.; *Anal. Chim. Acta* **1979**, *108*, 315. (e) Agterdenbos, J.; Maessen, F. J. M. J.; Balke, J.; *Anal. Chim. Acta* **1981**, *132*, 127. (f) Larsen, I. L.; Wagner, J. J.; *J. Chem. Ed.* **1975**, *52*, 215. (g) Ruskin, H. J.; *J. Chemometrics* **1989**, *3*, 529. (h) Hwang, J. D.; Winefordner, J. D.; *Progr. Anal. Spectrosc.* **1988**, *11*, 209. (i) Montgomery, D.; Peck, E. A.; *Introduction to linear regression analysis*, John Wiley and Sons; New York, 1982. (j) Weisberg, S.; *Applied linear regression*, John Wiley and Sons; New York, 1985. (l) Massart, D. L.; Vanderginste, B. G. M.; Deming, S. N. et al.; *Chemometrics: a textbook*, Elsevier, 2a ed.; Amsterdam, 1988. (m) Sharaf, M. A.; Illman, D. L.; Kowalski, B. R.; *Chemometrics*, John Wiley and Sons; New York, 1986. (n) Mandel, J.; *The statistical analysis of experimental data*, Dover Publications, Inc.; New York, 1984. (o) Bussab, W. O.; *Análise de variância e de regressão*, Atual editora; São Paulo, 1986. (p) Waeny, J. C. C.; *Aplicações metrológicas da regressão*, Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo; São Paulo, 1982. (q) Waeny, J. C. C.; *Recomendações sobre metodogia para aferição/calibração*, Instituto Tecnológico do Estado de São Paulo; São Paulo, 1983. (r) Waeny, J. C. C.; *Aplicações metrológicas*

da regressão II.; Instituto Tecnológico do Estado de São Paulo; São Paulo, 1983. (s) Daniel, C.; Wood, F. S.; *Fitting equations to data*, John Wiley and Sons; New York, 1980. (t) Mitchell, D. G.; Mills, W. N.; Garden, J. S.; Zdeb, M., *Anal. Chem.* **1977**, *49*, 1655. (u) Pattengill, M. D.; Sands, D. E.; *J. Chem. Ed.* **1979**, *56*, 244. (v) ASTM E 305-86. *Standard practice for establishing and controlling spectrochemical analytical curves.* (x) Mandel, J.; Linnig, F. J.; *Anal. Chem.* **1957**, *29*, 743. (z) Bruns, R. E.; Neto, B. B.; Scarminio, I. S.; *Planejamento e otimização de experimentos*, Editora da Unicamp; Campinas, 1995.

2. Mandel, J.; *J. Qual. Technol.* **1984**, *16*, 1.
3. Maessen, F. J. M. J.; Balke, J.; *Spectrochim. Acta* **1982**, *37B*, 37.
4. Bubert, H.; Klockenkamper, R.; *Fresenius Z. Anal. Chem.* **1983**, *316*, 186.
5. Schwartz, L. M.; *Anal. Chem.* **1979**, *51*, 723.
6. Watters Jr, R. L.; Carrol, R. J.; Spiegelman, C. H.; *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 1639.
7. Kurtz, D. A.; *Anal. Chim. Acta* **1983**, *150*, 105.
8. Davidian, M.; Haaland, P. D.; *Chemometrics and Intel. Lab. Syst.* **1990**, *9*, 231.
9. Garden, J. S.; Mitchell, D. G.; Mills, W. N.; *Anal. Chem.* **1980**, *52*, 2310.
10. Oppenheimer, L.; Capizzi, T. P.; Weppelman, R. M. et al.; *Anal. Chem.* **1983**, *55*, 638.
11. Wolters, R.; Van Denbroer, A. M.; Kateman, G.; *Chemometrics and Intel. Lab. Syst.* **1990**, *9*, 143.
12. Taylor, P. D. P.; Schutyser, P.; *Spectrochim. Acta* **1986**, *41B*, 1055.
13. Crow, E. L.; Davis, F. A.; Maxfield, M. W.; *Statistical manual*, Dover Publication, Inc.; New York, 1960.
14. Mermet, J.; *Spectrochim. Acta* **1994**, *49B*, 1313.
15. VanArendonk, M. D.; Skogerboe, R. K.; Grant, C. L.; *Anal. Chem.* **1981**, *53*, 2349.
16. Hancock, C.K.; *J. Chem. Ed.* 1965, *42*, 608.
17. Pimentel, M. F.; *Calibração Univariada*; Tese de Mestrado, Depto. de Química Fundamental, UFPE 1992.
18. ASTM E 394-70; *Standard test method for iron in trace quantities using the 1,10-phenanthroline method.*
19. Silvey, S. D.; *Optimal design. An introduction to the theory for parameter estimation*, Chapman and Hall; London, 1980.
20. Wolters, R.; Kateman, G.; *J. Chemometrics* **1990**, *4*, 171.
21. Ott, R. L.; Myers, R. H; *Technometrics* **1968**, *10*, 811.
22. Aarons, L.; *Analyst* **1981**, *106*, 1249.
23. St. John, R. C.; Draper, N. R.; *Technometrics* **1975**, *17*, 15.