

ESTADO DA ARTE DE FIGURAS DE MÉRITO EM CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

Patrícia Valderrama, Jez W. B. Braga e Ronei J. Poppi*

Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13084-862 Campinas - SP, Brasil

Recebido em 25/6/08; aceito em 15/12/08; publicado na web em 28/5/09

STATE OF THE ART OF FIGURES OF MERIT IN MULTIVARIATE CALIBRATION. The validation of an analytical procedure must be certified through the determination of parameters known as figures of merit. For first order data, the accuracy, precision, robustness and bias is similar to the methods of univariate calibration. Linearity, sensitivity, signal to noise ratio, adjustment, selectivity and confidence intervals need different approaches, specific for multivariate data. Selectivity and signal to noise ratio are more critical and they only can be estimated by means of the calculation of the net analyte signal. In second order calibration, some different approaches are necessary due to data structure.

Keywords: figures of merit; multivariate calibration; net analyte signal.

DADOS ANALÍTICOS

Com o avanço da instrumentação, uma quantidade cada vez maior de dados vem sendo gerada e em diversos níveis de complexidade. Isso vem requerendo e possibilitando o desenvolvimento de novos procedimentos para a análise de dados analíticos, de forma a possibilitar a determinação de propriedades de interesse dentro de sistemas relativamente complexos. A relação entre medidas instrumentais e valores da propriedade de interesse correspondentes realizados em padrões é feita através de uma série de operações matemáticas definidas como calibração.¹

Os métodos de calibração existentes podem ser divididos quanto à complexidade ou dimensionalidade dos dados, em calibração de ordem zero, primeira e segunda ordem.²⁻⁴ A Figura 1, mostra uma representação esquemática dos três tipos de dados utilizados nos três tipos de calibração citados para, por exemplo, um sistema de análise por Injeção em Fluxo (FIA) com detecção por arranjo de diodos (DAD).

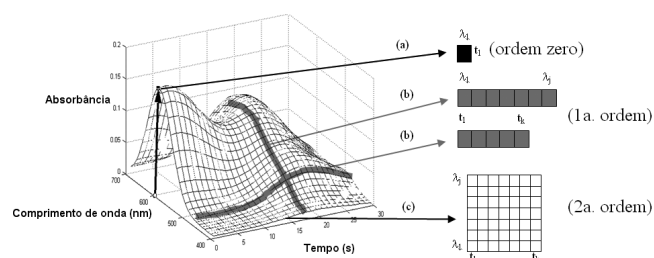


Figura 1. Representação esquemática dos diferentes tipos de dados em um sistema FIA-DAD: (a) escalar (uma única medida instrumental), (b) vetor de dados, (c) matriz de dados

Em modelos de calibração de ordem zero é usado um único valor da medida experimental por amostra (escalar), ou seja, é uma calibração univariada. Segundo o exemplo mostrado na Figura 1 ele é representado por um ponto da superfície, que corresponde à leitura da absorbância em um único comprimento de onda λ_1 em um tempo t_1 . A aplicação de calibrações univariadas requer que a grandeza que é medida diretamente no sistema, por exemplo, a absorbância de um composto, seja livre de interferentes que possam provocar desvios entre sua relação com a propriedade de interesse.

Métodos de calibração de primeira ordem fazem uso de um vetor de medidas instrumentais para cada amostra. Através do exemplo da Figura 1, é possível obter dois tipos de dados: um monitorando os comprimentos de onda λ_1 e λ_2 em um determinado tempo, outro, monitorando um comprimento de onda λ_1 nos tempos de t_1 a t_k . Esses métodos possibilitam as análises mesmo na presença de interferentes, desde que esses interferentes estejam presentes nas amostras de calibração (vantagem de primeira ordem), determinações simultâneas e análises sem resolução. Dentre os modelos de calibração multivariada de primeira ordem os mais empregados são a Regressão por Componentes Principais (PCR - *Principal Component Regression*) e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS - *Partial Least Squares*).⁵⁻⁹

As calibrações de segunda ordem são construídas para métodos que geram uma matriz de dados por amostra. Como mostrado na superfície da Figura 1, uma matriz de dimensões $j \times k$ (colunas \times linhas) é obtida para cada amostra. Para a análise de "i" amostras, têm-se um tensor de dados $\underline{\mathbf{X}}$ de dimensões $i \times j \times k$. Esses métodos têm a grande vantagem de permitirem a determinação de espécies de interesse na presença de interferentes, mesmo que estes interferentes não tenham sido incluídos nas amostras de calibração (vantagem de segunda ordem). Além disso, o perfil espectral de cada composto linearmente independente, presente na amostra, pode ser estimado com dados de segunda ordem.² Diversos modelos de calibração multivariada para dados de segunda ordem vem sendo utilizados, tais como: Análise de Fatores Paralelos (PARAFAC - *Parallel Factor Analysis*),¹⁰ Análise de Fatores Paralelos com Dependência Linear (PARALIND - *Parallel Factor Analysis with Linear Dependencies*),¹¹ Método Generalizado de Aniquilação de Posto (GRAM - *Generalized Rank Annihilation Method*),¹² Regressão por Mínimos Quadrados Parciais N-dimensional (N-PLS),¹³ Resolução de Curvas Multivariadas (MCR - *Multivariate Curve Resolution*),¹⁴ Mínimos Quadrados Bilineares (BLLS - *Bilinear Least Squares*),¹⁵ PLS desdobrado (*Unfolded PLS*) e PCR desdobrado (*Unfolded PCR*).¹⁶

Calibrações de terceira ordem requerem um cubo de dados por amostra e já foram descritas na literatura.^{2,3} Contudo, um dos fatores que ainda restringe a aplicação desse tipo de calibração é a elaborada instrumentação necessária para a aquisição dos dados. Uma vantagem deste tipo de calibração é que como se tem um cubo de dados por amostra, o perfil característico de cada ordem pode ser unicamente determinado para cada espécie na amostra. Entretanto, maiores vantagens para esse tipo de calibração ainda são desconhecidas.²

*e-mail: ronei@iqm.unicamp.br

FIGURAS DE MÉRITO

A necessidade de qualidade em medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está cada vez mais reconhecida e exigida, uma vez que dados analíticos não confiáveis ou resultados distorcidos podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros consideráveis.¹⁷ Sempre que um procedimento analítico é proposto ou desenvolvido, existe a necessidade de se averiguar se o método apresenta uma performance adequada para as condições nas quais será aplicado. Esse processo de averiguação é conhecido como validação.¹⁸ A validação de um método estabelece, por estudos sistemáticos realizados em laboratório, que o método atende ao seu propósito e às normas estabelecidas por agências reguladoras e órgãos de fiscalização nacionais e internacionais como Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA),¹⁹ Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO),²⁰ *United States Pharmacopeia* (USP),²¹ *International Conference on Harmonisation's* (ICH),^{22,23} *International Standard Organization* (ISO),²⁴ *American Society for Testing and Materials* (ASTM)²⁵ etc.

A validação de um procedimento analítico pode ser atestada através da determinação de parâmetros conhecidos como figuras de mérito. Esses parâmetros, dependendo de onde o método será aplicado, do seu propósito e ou do órgão de fiscalização a que estará sujeito podem variar, sendo as principais:^{18,22,23,25} exatidão, precisão, sensibilidade, seletividade, linearidade, razão sinal/ruído, limite de detecção, limite de quantificação, robustez, intervalos de confiança, teste para erros sistemáticos, extensão da faixa de trabalho ou faixa linear dinâmica.

A maneira pela qual essas figuras de mérito devem ser determinadas geralmente é estabelecida por órgãos de fiscalização e encontra-se descrita em normas específicas,²⁵ guias de validação^{18,22,23,26-29} e trabalhos científicos.^{1,2,17,30-38} A maioria dos guias, normas e trabalhos científicos ainda são referentes à calibração univariada. Trabalhos científicos que abordam a validação em calibração multivariada são recentes.^{31-35,39-42} Para modelos multivariados que utilizam um vetor de dados por amostra, descritos na literatura como calibração de primeira ordem,² a validação pode ser considerada relativamente complexa, porém definida. Entretanto, para modelos que empregam uma matriz de dados por amostra, conhecidos como calibração de segunda ordem, a validação é muito complexa e ainda não se encontra completamente investigada ou ainda não foi devidamente testada em condições que garantam a sua veracidade. Logo, ainda são necessários estudos mais aprofundados que investiguem e comparem esses procedimentos de validação para os modelos de calibração de segunda ordem atualmente empregados.

FIGURAS DE MÉRITO E CALIBRAÇÃO DE ORDEM ZERO

A metodologia para validação de modelos de calibração univariada parece estar consolidada. No Brasil, há duas agências que disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos baseados nesse tipo de calibração: a ANVISA (RE nº 899, de 29/05/2003)¹⁹ e o INMETRO (DOQ-CGCRE-008, de março/2003).²⁰ A IUPAC³⁹ dispôs no ano de 2006 a última proposta para validação de métodos univariados. De acordo com esses guias e com trabalhos científicos,^{1,17} a seguir são definidas as figuras de mérito para calibração univariada e as respectivas equações para a determinação de cada parâmetro são dispostas no Quadro 1.

Seletividade

É a capacidade de determinar uma espécie de interesse em misturas ou matrizes na presença de componentes que possam interferir com a sua determinação em uma amostra.^{39,43} O mesmo significado tem sido utili-

zado para o termo especificidade, o qual deve ser evitado empregando-se apenas o termo seletividade conforme a IUPAC.³⁹ Para calibração de ordem zero, a seletividade pode ser obtida de várias maneiras: comparando-se a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada desta substância (padrão), através da avaliação com detectores seletivos para o caso de métodos de separação, método de adição padrão quando não é possível obter a matriz isenta da substância de interesse, análise por outras técnicas. A IUPAC³⁹ apresenta uma equação proposta por Thompson, Ellison e Wood⁴⁴ para estimar a seletividade de um método univariado. Essa estimativa é realizada com base na razão entre a sensibilidade da propriedade de interesse e a sensibilidade dos interferentes de acordo com a Equação 1, Quadro 1.

Linearidade

Corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância de interesse, dentro de um determinado intervalo de concentrações onde o método será aplicado.^{21,23} Normalmente a linearidade pode ser inferida pela observação de parâmetros como o coeficiente de regressão "b", o intercepto "a" e o coeficiente de correlação "R". A ANVISA¹⁹ recomenda um R=0,99 e o INMETRO²⁰ um valor de R>0,90.

Sensibilidade

Expressa a fração de sinal que é acrescida quando a concentração da espécie de interesse tem seu valor elevado em uma unidade. Geralmente é feita uma regressão, pelo método de mínimos quadrados, entre os valores instrumentais em função da concentração (calibração clássica) ou admitindo a concentração como função das medidas instrumentais (calibração inversa) e a sensibilidade em ambos os casos é determinada pela inclinação (coeficiente angular) ou o inverso da inclinação da curva analítica, respectivamente.^{17,20}

Sensibilidade analítica

Indica a menor diferença de concentração que pode ser distinguida na faixa linear dinâmica do modelo univariado. Este parâmetro representa o melhor valor ou valor limite que poderia ser obtido caso se tivesse um ajuste perfeito do modelo de calibração, sendo limitado apenas pelo ruído instrumental. É definida como a razão entre a sensibilidade e o ruído instrumental, o qual é definido como o desvio padrão do branco.⁴⁵

Faixa linear dinâmica

Corresponde ao intervalo de massas ou concentrações no qual se pode construir uma curva analítica linear.¹⁷

Precisão

Expressa o grau de concordância entre os resultados de uma série de medidas realizadas para uma mesma amostra homogênea em condições determinadas. A precisão é calculada através da Equação 2, por uma estimativa do desvio padrão absoluto (s). Outra maneira de estimar a precisão é através do intervalo de confiança da média, que também atesta a incerteza da medição, por meio da Equação 3.³⁹ Finalmente, uma última maneira de se estimar a precisão é por meio da Equação 4, pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV). Em geral, a precisão pode ser obtida nos níveis de repetibilidade (mesmas condições e um curto intervalo de tempo), precisão intermediária (diferentes dias ou diferentes analistas, por exemplo) e reprodutibilidade (ensaios interlaboratoriais).^{19,20,23}

Exatidão

Expressa o grau de concordância entre o valor estimado ou medido e o valor tido como verdadeiro ou de referência.^{20,23} Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação, adição de padrão.¹⁷

Limite de detecção (LD)

Equivale à menor concentração da substância de interesse que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada.^{20,23,46} O LD pode ser calculado através do método visual,¹⁷ método da relação sinal-ruído¹⁷ ou pelo método baseado em parâmetros da curva analítica (Equação 5).^{17,45}

Limite de quantificação (LQ)

Representa a menor concentração da substância de interesse que pode ser medida com uma incerteza máxima de 10%.^{20,23} O LQ, assim como o LD, pode ser calculado através do método visual,¹⁷ da relação sinal-ruído¹⁷ ou com base em parâmetros da curva analítica (Equação 6).^{17,45}

Robustez

É uma medida da suscetibilidade do método frente a pequenas variações de determinados fatores a que o método pode estar sujeito como, por exemplo, temperatura, umidade, analista etc. O método é dito robusto quando não é afetado por essas pequenas variações.²⁰

Razão sinal/ruído

É definida pela razão do sinal analítico da propriedade de interesse e o sinal do ruído instrumental, que é estimado pela flutuação do sinal do branco.³⁹

Intervalo de confiança

Em calibração univariada é caracterizado pela incerteza nos valores de y na calibração.¹

FIGURAS DE MÉRITO E CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

Sinal analítico líquido – NAS

O conceito de sinal analítico líquido (NAS – *Net Analyte Signal*) exerce uma importante função na determinação de algumas figuras de mérito para calibrações multivariadas. Cálculos de seletividade e razão sinal/ruído requerem o cálculo do sinal analítico líquido do analito de interesse, que é a fração do sinal analítico que é ortogonal ao sinal dos demais compostos presentes na amostra.⁴⁷ Para métodos de calibração de primeira ordem obtém-se um vetor de sinal analítico líquido que pode ser representado em sua forma escalar sem perda de informação. Em métodos de calibração de segunda ordem, a contribuição individual de cada componente é armazenada em um fator do modelo, logo, o sinal analítico líquido para cada espécie linearmente independente presente na amostra é armazenado separadamente.

A maior parte dos trabalhos publicados com calibração multivariada atribui o método para o cálculo do NAS para modelos multivariados ao trabalho de Lorber, em 1986.⁴⁷ Recentemente, Brown⁴⁸ citou em um de seus trabalhos que, embora raramente citado, Morgan⁴⁹ teria discutido um conceito similar ao NAS, antes que Lorber, no ano de 1977, entretanto, o trabalho proposto por Morgan teria alguns erros.⁴⁸ O método original proposto por Lorber em 1986 foi desenvolvido para modelos de calibração direta ou baseada em mínimos quadrados clássicos (CLS - *Classical Least Squares*). Em 1997, Lorber, Faber e Kowalski⁵⁰ propuseram o cálculo para modelos multivariados de calibração inversa. Paralelo ao método proposto por esses autores, no mesmo ano foi publicado por Xu e Schechter⁵¹ uma proposta para o cálculo do NAS com base na proposta de Lorber, entretanto, o vetor NAS para cada amostra seria relacionado à concentração por regressão nas componentes principais. A proposta do método foi mais voltada para criação de um novo algoritmo capaz de definir automaticamente o número ótimo de fatores, e não propriamente uma modificação na maneira de calcular o NAS. Ainda em 1997, Wentzell, Andrews e Kowalski⁵² propuseram um método para o cálculo do NAS que implicava no conhecimento do espectro puro do analito de interesse e que, portanto, não é geralmente aplicável. Os três métodos trazem em comum o cálculo de uma matriz de projeção ortogonal e a propriedade de ortogonalidade do NAS pode ser observada pela representação geométrica da Figura 2.⁵³

Quadro 1. Equações para figuras de mérito em calibrações de ordem zero

$$\xi_{i,a} = \frac{S_a}{S_i} \quad (1) \quad s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2)$$

$$\text{Intervalo de confiança da média} = \bar{x} \pm t_{n-1} \frac{S}{\sqrt{n}} \quad (3) \quad \text{RSD (\%)} \text{ ou } \text{CV (\%)} = \frac{S}{\bar{x}} 100 \quad (4)$$

$$LD = 3,3 \frac{S}{S} \quad (5) \quad LQ = 10 \frac{S}{S} \quad (6)$$

s_a = sensibilidade da propriedade de interesse; s_i = sensibilidade de um interferente; \bar{x} = média aritmética de um pequeno número de determinações, sendo uma estimativa de μ a média da população; x_i = valor individual de uma medição; n = número de medições; t_{n-1} = valor crítico da distribuição de Student no nível desejado de confiança, com $n-1$ graus de liberdade; S = inclinação (*slope*) ou coeficiente angular da curva analítica.

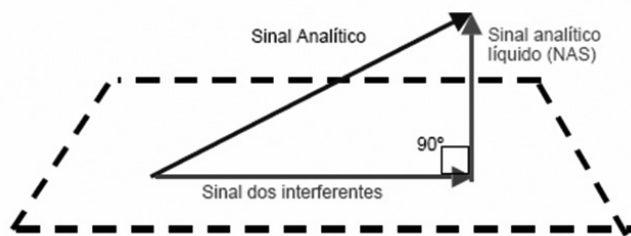


Figura 2. Representação geométrica da propriedade de ortogonalidade do NAS

O método proposto por Lorber,^{47,50} foi corrigido por Ferré, Brown e Rius⁵⁴ para possibilitar o cálculo exato do NAS para modelos de calibração construídos a partir dos métodos de regressão por PLS e PCR. As equações citadas ao longo deste tópico estão dispostas no Quadro 2.

Diversos trabalhos apresentam diferentes propostas para o cálculo do NAS, onde se pode demonstrar a sua equivalência, como discutido por Andersen e Bro.⁵⁵ Em uma das primeiras propostas sugeridas na literatura, primeiramente \mathbf{X} e \mathbf{y} são reconstruídos com “A” variáveis latentes gerando $\hat{\mathbf{X}}_A$ e $\hat{\mathbf{y}}_A$, segundo as Equações 7 e 8.⁵⁴

O próximo passo é a determinação da matriz $\hat{\mathbf{X}}_{A,K}$, que contém a informação de todas as espécies presentes na amostra, exceto a informação referente à espécie k. Essa determinação é realizada através de uma projeção ortogonal baseada na operação matricial que estabelece que para uma matriz \mathbf{X} qualquer, a matriz $\mathbf{X}\mathbf{X}^+$ (onde “+” indica a Moore-Penrose pseudo inversa da matriz) é uma matriz de projeção com as propriedades das Equações 9 e 10.⁴⁷

A partir dessas propriedades, se qualquer vetor \mathbf{z} for uma combinação linear da matriz \mathbf{X} , a multiplicação de \mathbf{z} pela matriz $\mathbf{X}\mathbf{X}^+$ fornecerá como resultado o próprio vetor \mathbf{z} . No entanto, a multiplicação de \mathbf{z} por $(\mathbf{I}-\mathbf{X}\mathbf{X}^+)$, (onde \mathbf{I} representa a matriz identidade de dimensões adequadas) resultará em um vetor de zeros. Assim, a multiplicação de um vetor pela matriz $(\mathbf{I}-\mathbf{X}\mathbf{X}^+)$ fornecerá como resultado um vetor que será ortogonal à matriz \mathbf{X} . Dessa forma, a matriz $\hat{\mathbf{X}}_{A,K}$ é obtida como na Equação 11.⁵⁶

Agora, a matriz $\hat{\mathbf{X}}_{A,K}$ está livre de qualquer contribuição da espécie k, uma vez que a projeção realizada na Equação 11 indica a parte da matriz \mathbf{X} que é ortogonal ao vetor \mathbf{y} que contém os valores do método de referência e, portanto, a matriz $\hat{\mathbf{X}}_{A,K}$ contém a parte de \mathbf{X} que não possui relação com \mathbf{y} . O vetor NAS pode, então, ser obtido com uma nova projeção que indicará a parte da matriz \mathbf{X} que é ortogonal à matriz de interferentes $\hat{\mathbf{X}}_{A,K}$ resultando, assim, na parte de \mathbf{X} que não possui relação com os interferentes, conforme a Equação 13.

Uma vez que $\hat{\mathbf{X}}_{A,K}$ é livre de interferentes, é possível substituí-lo por uma representação escalar, sem perda de informação, como mostrado na Equação 14. Com a possibilidade de calcular um valor escalar livre de interferentes, a partir de um vetor contendo contribuições de constituintes desconhecidos, é possível construir uma nova forma de calibração multivariada, em que o modelo pode ser representado em uma forma pseudo-univariada. A representação univariada de um modelo de calibração multivariada possibilita avaliar a porção do sinal que eficientemente participa do modelo.⁵⁷

De posse do cálculo do NAS para as “i” amostras de calibração, o coeficiente de regressão pode ser determinado, por mínimos quadrados, entre o vetor $\mathbf{n}\hat{\mathbf{a}}_s$ e o vetor de concentrações \mathbf{y} e como na Equação 15, e o modelo de regressão pode ser, então, representado pela Equação 16.

Quando os dados são centrados na média para a construção do modelo de calibração multivariada, o vetor $\mathbf{n}\hat{\mathbf{a}}_s$ precisa ser corrigido para evitar um erro de sinal que é introduzido pelo uso na norma

Euclidiana, antes da determinação do coeficiente de regressão b_{\max} . Esta correção pode ser feita multiplicando cada elemento do vetor $\mathbf{n}\hat{\mathbf{a}}_s$ pelo seu sinal correspondente no vetor $(\mathbf{y} - \bar{\mathbf{y}})$, onde $\bar{\mathbf{y}}$ é a média do vetor \mathbf{y} que contém os valores de referência.⁵⁸

Após todo esse desenvolvimento surgiram ainda outras proposições para o cálculo do NAS. Andersen e Bro⁵⁵ propõem o cálculo do NAS com base na projeção da matriz de *loadings*, enquanto Goicoechea e Olivieri⁵⁶ propõem o cálculo do NAS com base na projeção da matriz dos *scores*. No fundo, os métodos existentes para o cálculo do NAS são equivalentes⁵⁵ e o método proposto inicialmente por Lorber é o mais empregado em trabalhos científicos.⁵⁹

Um exemplo de aplicação foi mostrado por Poppi *et al.*,⁶⁰ que empregaram o conceito do NAS considerado por Lorber na validação de modelos PLS para determinações diretas de diclofenaco em formulações farmacêuticas utilizando espectrofotometria no ultravioleta. O cálculo do NAS para dados analíticos de primeira ordem parece estar consolidado de acordo com a definição inicial proposta por Lorber e se encontra, inclusive, na última recomendação da IUPAC³⁹ para cálculo da incerteza e estimativa de figuras de mérito em calibração multivariada publicada em 2006.

O sinal analítico líquido para dados de segunda ordem é análogo ao de dados de primeira ordem, no sentido de que buscam informação da parte do sinal que é relacionado à propriedade de interesse; o cálculo, porém, é diferente.

O primeiro método para o cálculo do NAS em dados de segunda ordem foi proposto por Ho, Christian e Davidson⁶¹ em 1980, antes mesmo que Lorber propusesse o princípio para dados de primeira ordem. Este método ficou conhecido como HCD e para sua aplicação é necessário que os dados sejam bilineares calibrados por métodos como PARAFAC e BLS. O cálculo do NAS através deste método tem como resultado a parte da matriz de dados de uma amostra que possui somente informação da propriedade de interesse.

Em 1993, Wang, Borgen, Kowalski, Gu e Turecek propõem o cálculo do NAS para dados de segunda ordem estimando o posto analítico líquido (NAR - *Net Analyte Rank*),⁶² conforme a Equação 17 e o método ficou conhecido como WBKGT.

Como o NAR_N é o posto da propriedade de interesse, o NAS, para dados bilineares modelados por PARAFAC ou BLS pode ser calculado pela Equação 18.

Através desta proposta, o NAS é a parte do sinal relativa à propriedade de interesse da amostra obtida na decomposição do tensor. Uma representação geométrica deste método pode ser observada através da Figura 3:²

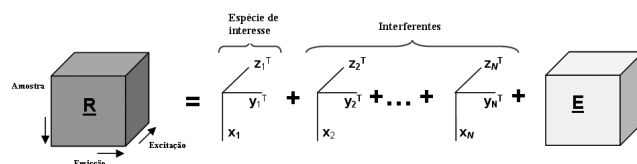


Figura 3. Decomposição de dados tridimensionais em triades

onde, $\underline{\mathbf{X}}$ é o tensor de dados e $\underline{\mathbf{E}}$ corresponde aos resíduos deixados pela decomposição do tensor $\underline{\mathbf{X}}$ em suas matrizes de *loadings* \mathbf{X} , \mathbf{Y} e \mathbf{Z} .

Um exemplo de aplicação do método WBKGT foi realizado por Trevisan e Poppi⁶³ na determinação direta de doxorubicina em plasma humano por fluorescência e calibração por PARAFAC. O cálculo do NAS segundo a metodologia WBKGT possibilitou estimar figuras de mérito como sensibilidade, seletividade e limite de detecção.

Em 1996, Bro⁶⁴ propôs uma nova metodologia, conhecida como N-PLS, para modelar dados de segunda ordem. Com N-PLS e com

metodologias de calibração de segunda ordem como, por exemplo, PLS desdobrado e PCR desdobrado, o tensor de dados é decomposto em *scores* e *loadings* mais os resíduos não modelados. Para este tipo de estrutura dos dados o método WBKGT e o método HCD não podem ser aplicados, assim, um outro método para o cálculo do NAS deve ser empregado. Messick, Kalivas e Lang⁶⁵ propõem um método, conhecido como MKL, onde o NAS é calculado a partir de um vetor de dados que é obtido do desdobramento do tensor de dados inicial. A partir de então, o cálculo pode ser obtido como no método proposto por Lorber para dados de primeira ordem.

Um exemplo de aplicação do cálculo do NAS através dos métodos HCD e MKL foi mostrado por Olivieri *et al.*,³⁸ que monitoraram naproxeno em urina humana e ibuprofeno em soro sanguíneo humano por fluorescência e calibração por BLS. O NAS, estimado através dos métodos HCD e MKL, possibilitou uma comparação no cálculo da sensibilidade que se mostrou mais condizente a partir da estimativa do NAS pelo método HCD.

Com relação aos três métodos propostos para o cálculo do NAS em dados de segunda ordem, pode-se concluir que a aplicação de um ou outro método fica restrita ao método de calibração de segunda ordem empregado. Para dados modelados por PARAFAC e BLS, o método MKL também pode ser empregado no cálculo do NAS, entretanto, devido à decomposição dos dados originais que é obtida empregando o PARAFAC e o BLS, a estimativa do NAS através do método MBKGT ou HCD torna-se muito mais consistente.

Cálculo das figuras de mérito

Figuras de mérito, como já mencionado, são parâmetros que certificam que o procedimento proposto é confiável e atende a determinadas especificações impostas pela indústria ou por algum órgão de fiscalização. A determinação de alguns desses parâmetros em modelos de calibração multivariada como, por exemplo, exatidão, precisão, robustez, ajuste e bias não apresentam maiores dificuldades e são estimados de maneira bastante similar aos métodos de

calibração univariada. Por outro lado, essa similaridade não pode ser observada para a estimativa de parâmetros como linearidade, sensibilidade, razão sinal/ruído, seletividade e intervalos de confiança ou incerteza.

A seletividade e a razão sinal/ruído somente podem ser estimadas mediante o cálculo do NAS para a propriedade de interesse a ser quantificada. Quando se trata de métodos de calibração de segunda ordem são observadas algumas diferenças com relação ao cálculo de algumas figuras de mérito para calibração de primeira ordem. Ainda não se tem um consenso na literatura de uma proposta para a determinação da seletividade para modelos multivariados. Diferenças nas estimativas também são observadas principalmente para sensibilidade, comparando as equações empregadas em diversos modelos.

Uma exceção é o modelo de Resolução Multivariada de Curvas (MCR), onde as estimativas das figuras de mérito podem ser realizadas de forma análoga à que é feita em calibração univariada. Tauler *et al.*³⁵ propuseram uma abordagem simples para determinação de figuras de mérito em resolução multivariada de curvas de segunda ordem. Neste procedimento, os perfis puros de resposta da propriedade de interesse são obtidos possibilitando o cálculo de figuras de mérito como limite de detecção, sensibilidade, precisão e exatidão, como em calibração univariada. Os autores determinam trifeniltina (TPHT) em amostras sintéticas e em água do mar utilizando fluorescência de excitação e emissão. Garrido Frenich *et al.*³⁷ validaram um método para determinação de pesticidas em águas subterrâneas. Os dados foram obtidos por HPLC-DAD e os espectros puros foram obtidos utilizando MCR. A validação da metodologia foi realizada por determinação das figuras de mérito calculadas da mesma forma que em calibração univariada.

As figuras de mérito que serão comentadas a seguir estão de acordo com normas específicas, como a ASTM,²⁵ para validação em calibração multivariada a partir de espectroscopia no infravermelho, e trabalhos científicos divulgados por meio de periódicos. As equações citadas ao longo deste tópico estão dispostas no Quadro 3.

Quadro 2. Equações para o desenvolvimento da teoria de sinal analítico líquido

$$\hat{\mathbf{X}}_A = \mathbf{T}_A \mathbf{P}_A^T + \mathbf{E} \quad (7)$$

$$\hat{\mathbf{y}}_A = \mathbf{U}_A \mathbf{q}_A + \mathbf{f} \quad (8)$$

$$\mathbf{X} = (\mathbf{X}\mathbf{X}^+) \mathbf{X} \quad (9)$$

$$\mathbf{X}^+ = \mathbf{X}^+ (\mathbf{X}\mathbf{X}^+) \quad (10)$$

$$\hat{\mathbf{X}}_{A,-k} = (\mathbf{I} - \hat{\mathbf{y}}_{A,k} \hat{\mathbf{y}}_{A,k}^+) \hat{\mathbf{X}}_A \quad (11)$$

$$\hat{\mathbf{y}}_{A,k} = \hat{\mathbf{X}}_A \hat{\mathbf{X}}_A^+ \mathbf{y}_k \quad (12)$$

$$\hat{\mathbf{x}}_{A,k}^{nas} = (\mathbf{I} - \hat{\mathbf{X}}_{A,-k}^T (\hat{\mathbf{X}}_{A,-k}^T)^+) \hat{\mathbf{x}}_A \quad (13)$$

$$n\hat{a}s_i = \|\hat{\mathbf{x}}_{A,k}^{nas}\| \quad (14)$$

$$\hat{\mathbf{b}}_{nas} = (\mathbf{n}\hat{\mathbf{a}}s^T \mathbf{n}\hat{\mathbf{a}}s)^{-1} \mathbf{n}\hat{\mathbf{a}}s^T \mathbf{y} \quad (15)$$

$$\hat{\mathbf{y}} = \hat{\mathbf{b}}_{nas} \mathbf{n}\hat{\mathbf{a}}s + \mathbf{E} \quad (16)$$

$$\text{NAR}_N = \text{rank}(\mathbf{M}) - \text{rank}(\mathbf{M}/N) \quad (17)$$

$$\text{NAS}_N = \mathbf{z}_{in} \sum_{i=1}^{\text{NAR}_N} \mathbf{x}_i \mathbf{y}_i^T \quad (18)$$

$$\mathbf{R}_{ijk} = \sum_{n=1}^N \mathbf{X}_{in} \mathbf{Y}_{jn} \mathbf{Z}_{kn} \quad (19)$$

\mathbf{T} e \mathbf{U} são os *scores*; \mathbf{P} e \mathbf{q} são os *loadings*; e \mathbf{E} e \mathbf{f} representam o erro de decomposição da matriz \mathbf{X} e do vetor \mathbf{y} , respectivamente; $\hat{\mathbf{y}}_{A,k}$ é o vetor de concentrações da espécie de interesse k estimado com A variáveis latentes segundo a Equação 12; $\hat{\mathbf{x}}_A$ é o vetor de respostas instrumentais de uma amostra estimado com A variáveis latentes; $\|\cdot\|$ representa a norma Euclidiana do vetor $\hat{\mathbf{x}}_{A,k}^{nas}$; N e M são a espécie de interesse e a mistura de espectros, respectivamente.

O rank do tensor de dados (matrizes de dados para cada amostra organizadas no formato de um cubo de dados) é definido como o número de componentes principais utilizados na decomposição do tensor; \mathbf{x}_p , \mathbf{y}_j e \mathbf{z}_{kn} são obtidos por decomposição do conjunto de calibração como na Equação 19.

Exatidão

Algumas vezes, o erro médio de estimativa da propriedade de interesse é referido como uma estimativa da exatidão e utilizado para a comparação dos resultados obtidos em trabalhos com calibração multivariada, através da raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão (RMSEP – *Root Mean Squares Error of Prediction*),⁶⁶ Equação 20. Entretanto, estes são os parâmetros globais que incorporam tanto erros sistemáticos quanto aleatórios. Na comparação de resultados entre os dois métodos distintos, a exatidão pode ser acessada por meio da comparação dos valores obtidos para a inclinação e o intercepto de uma reta ajustada entre os valores de referência e os estimados pelo modelo. Isto pode ser melhor observado através da elipse de confiança, como mostra o exemplo hipotético da Figura 4. Caso os intervalos de confiança para esses parâmetros conttenham os seus valores esperados iguais a 1 e 0, para a inclinação e o intercepto, respectivamente, os modelos podem ser considerados estatisticamente equivalentes no nível de confiança considerado, como no exemplo. Valores estimados para a inclinação e intercepto fora de seus intervalos de confiança indicam erros sistemáticos proporcionais e constantes, respectivamente.⁶⁷ Trabalhos recentes com calibração multivariada mostram essa consideração da elipse de confiança tanto para calibração de primeira ordem³⁴ quanto para a calibração de segunda ordem.^{41,42}

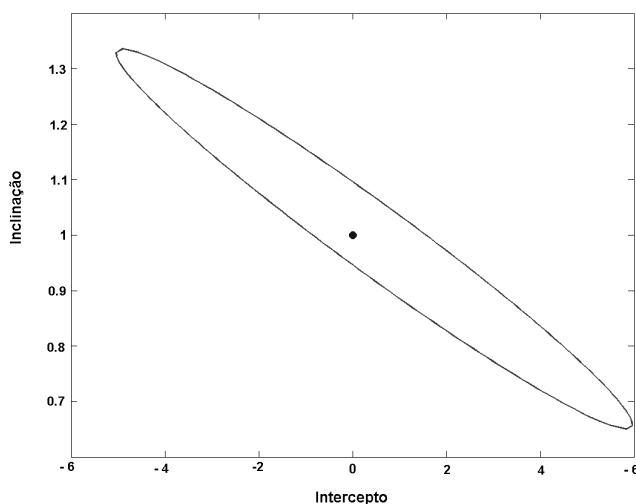


Figura 4. Elipse de confiança

Precisão

Assim como na calibração univariada, em geral é considerada em três níveis:

Repetibilidade

É a precisão do método em um curto intervalo de tempo. Segundo a norma E1655-00 da ASTM,²⁵ são necessárias um mínimo de 3 amostras em concentrações diferentes, cobrindo a faixa útil do modelo de calibração e 6 replicatas para cada nível de concentração. Segundo a ICH,²³ são necessárias apenas 3 replicatas para cada nível de concentração. O cálculo é realizado conforme Equação 21.

Precisão intermediária

A extensão em que a precisão intermediária deve ser determinada depende das circunstâncias em que o método será aplicado.

Reprodutibilidade

É acessada por meio de ensaios interlaboratoriais.

Robustez

Consiste em testar a performance do modelo de calibração multivariada frente a alguns tipos de variações e averiguar se estas são ou não significativas.¹⁸

Bias

Segundo a IUPAC,³⁰ o termo bias é atribuído a erros sistemáticos que são calculados pela diferença entre a média da população e o valor verdadeiro e são todas as componentes de erro que não são aleatórias. A norma E1655-00 da ASTM²⁵ aborda a investigação desse parâmetro através de um teste-t para as amostras de validação no nível de 95% de confiança. O bias médio para o conjunto de validação é calculado pela Equação 22. A seguir, o desvio padrão dos erros de validação (SDV – *Standard Deviation of Validation*) é estimado através da Equação 23 e, por fim, o valor de t é obtido da Equação 24. Caso o valor encontrado apresente resultado maior do que seu valor crítico para $n_v - 1$ graus de liberdade, em que n_v corresponde ao número de amostras da validação, é um indicativo de que erros sistemáticos presentes no modelo multivariado são significativos.

Sensibilidade

Corresponde à fração do sinal responsável pelo acréscimo de uma unidade de concentração à propriedade de interesse.^{47,54} É determinada através da Equação 25³⁹ e quando o NAS é determinado, o vetor de sensibilidade líquida s^{nas} para cada amostra do conjunto de calibração pode ser determinado a partir do vetor \hat{x}^{nas} , como na Equação 26, de onde o escalar pode ser obtido como na Equação 27.³¹⁻³³ Para dados de segunda ordem, quando o NAS é calculado a partir de: HCD, a sensibilidade é definida pela Equação 28;⁶⁸ WBKGT, a sensibilidade é definida pela Equação 29;^{2,62} MKL, a sensibilidade é definida pela Equação 30;⁶⁹ Olivieri *et al.*³⁸ fizeram uso das Equações 28 e 30 para estimar a sensibilidade de modelos de calibração de segunda ordem desenvolvidos a partir de BLLS e fluorescência, para determinação de naproxeno em urina humana e ibuprofeno em soro sanguíneo humano. Os resultados são comparados com os obtidos através de simulação de Monte Carlo, um método para simulação de dados baseado em testes randômicos e aleatoriedade, mostrando que para este método de calibração a sensibilidade obtida por HCD é mais condizente com valores teóricos obtidos da simulação. Trevisan e Poppi⁶³ utilizaram a Equação 29 para calcular a sensibilidade de modelos de calibração de segunda ordem por PARAFAC. Braga e Poppi^{31,32} calcularam a sensibilidade de modelos de primeira ordem para determinação da pureza polimórfica de carbamazepina por infravermelho e PLS. Valderrama, Braga e Poppi^{33,34} calcularam a sensibilidade para modelos de primeira ordem empregados na quantificação de parâmetros de controle de qualidade na indústria alcooleira por espectroscopia na região do infravermelho próximo.

Olivieri e Faber⁶⁹ propuseram uma equação geral, Equação 31, para o cálculo da sensibilidade de modelos de calibração de segunda ordem. Esta é a última proposta para o cálculo da sensibilidade de dados de segunda ordem aplicável independentemente do método utilizado para calcular o NAS e que, até o momento, parece ser a mais condizente. Valderrama e Poppi empregaram a Equação 31 para o cálculo da sensibilidade em modelos BLLS para quantificação dos enantiômeros do propranolol a partir de fluorescência molecular.⁴²

Sensibilidade analítica

Apresenta a sensibilidade do método em termos da unidade de concentração que é utilizada, sendo definida como a razão entre a sensibilidade e o desvio padrão do sinal de referência de acordo com

a Equação 32.^{31,33,34,39,70-72} Em dados de segunda ordem a Equação 32 também é aplicável.^{42,73}

Seletividade

É a medida do grau de sobreposição entre o sinal da espécie de interesse e os interferentes presentes na amostra indicando, também, a parte do sinal que é perdida por essa sobreposição.⁴³ É definida pela Equação 33.^{50,54} Para dados de segunda ordem quando o NAS é calculado a partir do método HCD ou MKL, a seletividade é obtida pela divisão das Equações 28 e 30 pelo sinal total da espécie de interesse.⁷⁴ Por outro lado, quando o NAS é obtido por WBKGT a Equação 34 é a correspondente para o cálculo da seletividade.^{2,62}

Trvisan e Poppi⁶³ utilizaram a Equação 33 para estimar a seletividade da calibração de segunda ordem para determinação de doxorubicina em plasma sanguíneo humano por fluorescência e PARAFAC, enquanto Olivieri⁷⁴ estimou a seletividade para vários métodos de calibração de segunda ordem em sistemas binários e ternários obtidos por simulação de Monte Carlo.

Linearidade

A avaliação deste parâmetro em calibração multivariada utilizando PLS ou PCR é problemática, uma vez que as variáveis são decompostas pelas componentes principais. Assim, uma medida quantitativa para a linearidade não corresponde a uma tarefa simples, ou mesmo possível. Qualitativamente, o gráfico dos resíduos para as amostras de calibração e validação pode indicar se os dados seguem um comportamento linear se a distribuição destes resíduos for aleatória.⁶⁶

Vuorela *et al.*⁷⁵ mostraram que a distribuição aleatória dos resíduos atesta a linearidade de modelos PLS na quantificação de cafeína em tabletes intactos por espectroscopia no infravermelho próximo.

Ajuste

O ajuste para modelos multivariados não consiste em uma figura de mérito abordada com frequência em guias e normas oficiais. Entretanto, devido à dificuldade em realizar estimativas para linearidade, esse parâmetro é com frequência determinado em trabalhos que envolvem modelos de calibração multivariada. Este parâmetro pode ser estimado a partir da correlação entre os valores tidos como referência e os valores estimados pelo modelo de calibração multivariada, para a propriedade de interesse. Isso é feito determinando-se por mínimos quadrados a reta que melhor se ajusta aos valores de referência e os valores estimados pelo modelo.^{75,76} Quando o escalar “nas” é determinado, é possível também determinar o ajuste do modelo através da melhor reta que se ajusta à relação do “nas” contra a concentração, para as amostras de calibração.³¹⁻³³

Razão sinal/ruído

Indica o quanto da intensidade do NAS da espécie de interesse está acima do desvio padrão do sinal de referência.^{47,54} A Equação 35 ilustra a proposta para o cálculo. Para dados de segunda ordem, quando o NAS é estimado por WBKGT, a razão sinal/ruído é estimada através da Equação 36.²

Extensão da faixa de trabalho

É estabelecida determinando-se a concentração da espécie de interesse em diferentes níveis de concentração. Através dos resulta-

dos obtidos, determina-se qual a faixa de concentração na qual os resultados apresentam um nível aceitável de incerteza para o método empregado.¹⁸

Limite de detecção (LD)

Em calibração de primeira ordem, o cálculo do LD é proposto a partir da Equação 37.⁷⁷ Para dados de segunda ordem, quando o NAS é estimado por WBKGT o LD é calculado através da Equação 38.^{2,62}

Limite de quantificação (LQ)

O cálculo do LQ para calibração multivariada é proposto a partir da Equação 39.⁷⁷

Intervalos de confiança

O valor estimado de y de uma amostra “ i ” pode ser definido como o intervalo no qual se pode afirmar com certo grau de confiança, ou probabilidade, que inclui o valor verdadeiro da propriedade de interesse. O cálculo depende de uma estimativa razoável da variância dos erros de previsão para amostras desconhecidas.

Em modelos de calibração multivariada, uma determinação razoável de uma estimativa dessas variâncias não constitui uma tarefa simples, pois, ao contrário de modelos univariados (que utilizam uma estimativa de variância que representa a distribuição dos erros que é esperada para novas amostras), modelos de calibração multivariada, na maioria das vezes, necessitam de uma equação que forneça uma estimativa de variância específica para cada nova amostra que está sendo prevista. Estes intervalos podem ser estimados por um teste- t e uma estimativa aproximada para a variância nos erros de previsão ($V(PE)$) que para modelos de calibração multivariada, como PCR e PLS, vem sendo focada em duas aproximações.⁷⁸ A primeira foi proposta por Hoy, Steen e Martens,⁷⁹ que foi adotada no pacote comercial *Unscrambler* e é representada pela Equação 40. Essa equação foi posteriormente corrigida por De Vries e Ter Braak,⁸⁰ através da introdução de um fator de correção como pode ser observado através da Equação 42. O segundo método foi descrito por Faber e Kowalski⁸¹⁻⁸³ e tem base na aproximação de erros em variáveis ($EIV - Error in Variable$), mais conhecido como método de propagação de erros. A equação para a variância dos erros de previsão leva em consideração fontes de erro como a incerteza do método de referência e das medidas instrumentais como expresso pela Equação 43. O segundo método apresenta uma simplificação abordada pela norma E1655-00 da ASTM,²⁵ cujo cálculo da variância dos erros de previsão é expresso pela Equação 45. Esta estimativa é baseada no conceito de pseudo-erro médio quadrático da calibração ($MSEC_p - Pseudo Mean Square Error of Calibration$) calculado a partir da Equação 46. Para dados de segunda ordem, quando N-PLS ou *unfold* PLS é utilizado para a calibração, Faber e Bro⁸⁴ propuseram a Equação 47, que é uma simplificação da Equação 43.

O número efetivo de graus de liberdade envolvidos no cálculo do erro médio quadrático da calibração ($MSEC - Mean Square Error of Calibration$) consiste em mais uma dificuldade para o cálculo dos intervalos de confiança. Nesse sentido, van der Voet⁸⁵ definiu o conceito de pseudo-graus de liberdade ($PDF - Pseudo-Degrees of Freedom$), que leva em consideração a diferença entre o erro médio quadrático de calibração estimado por validação cruzada ($MSECV - Mean Square Error of Cross Validation$) e pela previsão das próprias amostras de calibração ($MSEC$), de modo que quanto maior for essa diferença, menor será o número de graus de liberdade, conforme a Equação 48. Quando a calibração de primeira ordem for desenvolvida através do método PCR, o conceito de pseudo-graus de liberdade deve ser desconsiderado. Assim, após o cálculo da variância, com um número

Quadro 3. Equações para figuras de mérito em calibração multivariada

$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n_v}} \quad (20)$	$\text{SEN}_{k,\text{MKL}} = k_k \left\{ \left[(\mathbf{B}^T \mathbf{B}) * (\mathbf{C}^T \mathbf{C})^{-1} \right]_{nn}^{-1/2} \right\} \quad (30)$	$V(\text{PE}_i)_{\text{HSM}} = V_{ry} \frac{1}{2} \left(h_i + \frac{V_{rx_i}}{V_{rx}} + \frac{2}{n_c} \right) \quad (40)$
$\text{precisão} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (\hat{y}_{ij} - \hat{y}_i)^2}{n(m-1)}} \quad (21)$	$\text{SEN}_{k,\text{OF}} = k_k \left\{ \left[(\mathbf{B}^T \mathbf{P}_{b,\text{unx}} \mathbf{B}) * (\mathbf{C}^T \mathbf{P}_{c,\text{unx}} \mathbf{C}) \right]^{-1/2} \right\} \quad (31)$	$h_i = \sum_{a=1}^A \frac{\hat{t}_{i,a}^2}{\hat{t}^T \hat{t}} \quad (41)$
$\text{bias} = \frac{\sum_{i=1}^{n_v} (y_i - \hat{y}_i)}{n_v} \quad (22)$	$\gamma = \frac{\hat{\text{SEN}}}{\ \delta x\ } \quad (32)$	$V(\text{PE}_i)_{\text{VB}} = V_{ry} \left(1 - \frac{A+1}{n_c} \right) \left(h_i + \frac{V_{rx_i}}{V_{rx}} + \frac{2}{n_c} \right) \quad (42)$
$\text{SDV} = \sqrt{\frac{\sum [(y_i - \hat{y}_i) - \text{bias}]^2}{n_v - 1}} \quad (23)$	$\hat{\text{SEL}}_{k,i} = \frac{n \hat{s}_{k,i}}{\ \mathbf{x}_{k,i}\ } \quad (33)$	$V(\text{PE}_i)_{\text{FK,EIV}} = \left(h_i + \frac{1}{n_c} \right) \left(V_E + V_y + \ \mathbf{b}\ ^2 V_X \right) + V_{E,i} + \ \mathbf{b}\ ^2 V_{x_i} \quad (43)$
$t_{\text{bias}} = \frac{ \text{bias} \sqrt{n_v}}{\text{SDV}} \quad (24)$	$\text{SEL}_{\text{WBKGT}} = \frac{\ \mathbf{NAS}\ _F}{\ \mathbf{N}\ _F} \quad (34)$	$V_E = \text{MSEC} - \left(V_y + \ \mathbf{b}\ ^2 V_X \right) \quad (44)$
$\hat{\text{SEN}} = \frac{1}{\ \mathbf{b}_k\ } \quad (25)$	$S/R_{k,i} = \frac{n \hat{s}_{k,i}}{\delta x} \quad (35)$	$V(\text{PE}_i)_{\text{ASTM}} = \left(1 + h_i + \frac{1}{n_c} \right) \text{MSEC}_p \quad (45)$
$\mathbf{s}_k^{\text{nas}} = \left\ \frac{\hat{\mathbf{x}}_{A,k}^{\text{nas}}}{\mathbf{y}} \right\ \quad (26)$	$S/R_{\text{WBKGT}} = \frac{\ \mathbf{NAS}\ _F}{\ \mathbf{E}\ _F} \quad (36)$	$\text{MSEC}_p = \sum_{i=1}^{n_c} \frac{(y_i - \hat{y}_i)^2}{n_{\text{GL}}} \quad (46)$
$\hat{\text{SEN}} = \ \mathbf{s}_k^{\text{nas}}\ \quad (27)$	$\text{LD} = 3,3\delta x \ \mathbf{b}_k\ = 3,3\delta x \frac{1}{\hat{\text{SEN}}} \quad (37)$	$V(\text{PE}_i)_{\text{FB}} = \left(\frac{1}{n_c} + h_i \right) \text{MSEC} + V_y \quad (47)$
$\text{SEN}_{k,\text{HCD}} = k_k \left\{ \left[(\mathbf{B}^T \mathbf{B})^{-1} \right]_{nn} \left[(\mathbf{C}^T \mathbf{C})^{-1} \right]_{nn} \right\}^{-1/2} \quad (28)$	$\text{LD}_{\text{WBKGT}} = \frac{C}{\left(\ \mathbf{NAS}\ _F / 3 \ \mathbf{E}\ _{F-1} \right)} \quad (38)$	$n_{\text{GL}} = n \left(1 - \sqrt{\frac{\text{MSEC}}{\text{MSECV}}} \right) \quad (48)$
$\text{SEN}_{\text{WBKGT}} = \frac{\ \mathbf{NAS}\ _F}{C} \quad (29)$	$\text{LQ} = 10\delta x \ \mathbf{b}_k\ = 10\delta x \frac{1}{\hat{\text{SEN}}} \quad (39)$	$\phi_i = t_{1-\alpha/2n_{\text{GL}}} \sqrt{V(\text{PE}_i)} \quad (49)$

n_v é o número de amostras de validação; y_i e \hat{y}_i correspondem aos valores de referência e aos previstos pelo modelo, respectivamente; n é o número de amostras utilizadas no cálculo da precisão; m é o número de replicatas de n ; \mathbf{b}_k é o vetor dos coeficientes de regressão para a espécie de interesse k estimados pelo modelo de calibração multivariada; $\mathbf{s}_k^{\text{nas}}$ é o vetor de sensibilidades (deve ser igual para todas as amostras de calibração); $\hat{\mathbf{x}}^{\text{nas}}$ é o vetor de sinal analítico líquido para a espécie k com A variáveis latentes; \mathbf{y} é o vetor que contém os valores de referência; \mathbf{B} e \mathbf{C} são matrizes que possuem nas colunas o perfil para todos os componentes na primeira e segunda dimensão, respectivamente; O subscrito ‘nn’ indicam o (n,n) elemento de uma matriz; k_k é o sinal total para o componente ‘k’; $\|\cdot\|_F$ representa a norma de uma matriz; C é a concentração da espécie de interesse na mistura; $\mathbf{P}_{b,\text{unx}}$ e $\mathbf{P}_{c,\text{unx}}$ são matrizes identidade; δx é o desvio padrão do sinal de referência estimado através do desvio padrão do valor de NAS para 15 espectros do sinal de referência; γ permite estabelecer a menor diferença de concentração entre amostras que pode ser distinguida pelo método; $n \hat{s}_{k,i}$ é o valor escalar do sinal analítico líquido para a amostra ‘i’; $\mathbf{x}_{k,i}$ é o vetor de resposta instrumental para a amostra ‘i’; N é o sinal total para a espécie de interesse na mistura M ; \mathbf{E} é a matriz de erros; V_y, V_{rx}, V_{rx_i} são a média do quadrado dos resíduos em E, f e e_i (Equações 7 e 8) para as amostras de calibração, valores de referência e uma amostra desconhecida, respectivamente; n_c é o número de amostras de calibração; h_i é o leverage de uma amostra desconhecida calculado pela Equação 41; ‘A’ é o número de variáveis latentes; \hat{t} e \hat{t}_i são os scores do conjunto de calibração e de uma amostra desconhecida, respectivamente; V_y é a variância do método padrão utilizado na obtenção dos valores de referência para a propriedade de interesse; V_x e V_{x_i} são as variâncias das respostas instrumentais para as amostras do conjunto de calibração e de uma amostra ‘i’ desconhecida; \mathbf{b} é o vetor com os coeficientes de regressão estimados por PCR ou PLS; V_E e $V_{E,i}$ são definidos pela Equação 44; MSEC é estimado igual MSEC_p ; n_{GL} é o número de graus de liberdade determinado pela abordagem de pseudo-graus de liberdade.

apropriado de graus de liberdade, os limites de confiança (ϕ) podem ser obtidos através da Equação 49. Os limites calculados a partir da simplificação proposta pela ASTM para a estimativa de $V(PE)$ admitem que as variâncias dos erros correspondentes às respostas instrumentais das amostras de calibração e previsão são iguais, que a variância dos erros devido ao método de referência é insignificante e que os erros correspondentes às concentrações estimadas não são correlacionados e seguem uma distribuição normal. Esta última consideração pode ser atestada através de um teste de normalidade.⁸⁶ Estudos feitos por Faber⁷⁸ mostram que a primeira suposição é consistente com a maior parte das aplicações práticas, contudo em ocasiões em que a variância do método de referência for significativa, esta deve ser considerada no cálculo de $V(PE)$ conforme a Equação 43.

Com relação às estimativas de incerteza para modelos multivariados, principalmente em modelos de calibração de segunda ou ordens superiores, que ainda não se apresentam definidas adequadamente, pode-se citar a utilização de métodos de re-amostragem como *Bootstrap* e adição de ruído⁸⁷⁻⁹³ como formas de se obter uma estimativa independente da incerteza desses modelos. Dessa forma, é possível verificar a veracidade de estimativas obtidas por equações analíticas como as disponíveis para calibração de ordem zero. Esses métodos procuram estimar a distribuição dos erros para a propriedade de interesse e, a partir dela, obter a incerteza. Para a obtenção dessa estimativa da distribuição geralmente são adicionados ruídos aleatórios e com intensidade apropriada aos dados instrumentais e/ou concentrações de referências e os cálculos realizados um número suficiente de vezes para que se tenha uma estimativa precisa e exata da distribuição dos erros ou de qualquer parâmetro de interesse no modelo. Trabalhos como os de Wehrens *et al.*^{88,89} e Massart *et al.*⁹⁰ ilustram a implementação desses métodos para as estimativas de parâmetros em modelos multivariados. A utilização desses métodos para a validação das estimativas de incerteza ou sensibilidade em modelos de calibração de primeira ou segunda ordens foi descrita em diversos trabalhos,⁸⁹⁻⁹² sendo que sua utilidade pode ser comprovada na avaliação de estimativas de incerteza e sensibilidade.

CONCLUSÕES

A confiabilidade dos dados analíticos vem sendo cada vez requerida. A necessidade de se averiguar que um método proposto atende ao seu propósito e a normas reguladoras ou órgãos de fiscalização vem promovendo cada vez mais o desenvolvimento da validação de métodos analíticos através do cálculo das figuras de mérito.

Em calibrações univariadas, o cálculo das figuras de mérito é simples e muito bem estabelecido, enquanto que para calibrações multivariadas muitas pesquisas ainda estão em desenvolvimento, principalmente no que diz respeito a calibrações de segunda ordem.

Em calibração multivariada de dados de primeira ordem, as figuras de mérito como exatidão, precisão, robustez e bias são estimadas de maneira bastante similar aos métodos de calibração univariada, o que não é verdadeiro para parâmetros como linearidade, sensibilidade, razão sinal/ruído, ajuste, seletividade e intervalos de confiança. A seletividade e a razão sinal/ruído são parâmetros ainda mais críticos e que somente podem ser estimados mediante o cálculo do sinal analítico líquido para a propriedade de interesse a ser quantificada. Quando se trata de métodos de calibração de segunda ordem são observadas algumas diferenças com relação ao cálculo de algumas figuras de mérito em relação aos métodos de calibração de primeira ordem. Essas diferenças são observadas principalmente para sensibilidade e estão relacionadas com o cálculo do sinal analítico líquido para a propriedade de interesse a ser quantificada. Por outro lado, para o MCR, a estimativa das figuras de mérito é realizada da mesma forma que em calibração univariada.

O cálculo das figuras de mérito para calibração multivariada de dados de primeira ordem, embora complexo, é bem desenvolvido. Para calibração multivariada de dados de segunda ordem, o cálculo é bem mais complexo e muito pouco desenvolvido, as pesquisas são recentes e muita coisa ainda se encontra em desenvolvimento. Tanto para calibrações de primeira quanto de segunda ordem, a maioria dos trabalhos são mais no sentido do desenvolvimento e evolução, mostrando, comparando e até contestando equações e metodologias, do que no sentido de aplicações.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP (Proc. 05/56188-1) e ao CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa (R. J. Poppi, Proc. 309992/2006-0).

REFERÊNCIAS

1. Barros Neto, B.; Pimentel, M. F.; Araújo, M. C. U.; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 856.
2. Booksh, K. S.; Kowalski, B. R.; *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 782A.
3. Escandar, G. M.; Faber, N. K. M.; Goicoechea, H. C.; Muñoz de la Pena, A.; Olivieri, A. C.; Poppi, R. J.; *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2007**, *26*, 752.
4. Bro, R.; *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2006**, *36*, 279.
5. Beebe, K. R.; Kowalski, B. R.; *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 1007A.
6. Beebe, K. R.; Pell, R. J.; Seasholtz, M. B.; *Chemometrics: A practical guide*, Wiley Interscience: New York, 1998.
7. Vandeginste, B. G. M.; Massart, D. L.; Buydens, L. M. C.; Jing, S.; Lewi, P. J.; Smeyers-Verbeke, J.; *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B*, Elsevier: Amsterdam, 1998.
8. Otto, M.; *Chemometrics*, Wiley: Weinheim, 1999.
9. Brereton, R. G.; *Analyst* **2000**, *125*, 2125.
10. Bro, R.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1997**, *38*, 149.
11. Braham, M.; Bro, R.; *Anal. Chim. Acta* **2007**, *584*, 397.
12. Wilson, B. E.; Sanchez, E.; Kowalski, B. R.; *J. Chemom.* **1989**, *3*, 493.
13. Bro, R.; *J. Chemom.* **1996**, *10*, 47.
14. Tauler, R.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1995**, *30*, 133.
15. Linder, M.; Sundberg, R.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1998**, *42*, 159.
16. Wold, S.; Geladi, P.; Esbensen, K.; Øhman, J.; *J. Chemom.* **1987**, *1*, 41.
17. Ribani, M.; Bottoli, C. B.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 771.
18. Eurachem/Citac – Work Group; *Guide of quality in analytical chemistry – An aid to accreditation*, 2nd ed., 2002.
19. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); *Resolução RE n°899*, de 29/05/2003.
20. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); *Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*, DQO-CGRE-008, 2003.
21. United States Pharmacopeia Convention; *US Pharmacopeia 24; Validation of compendial methods <1225>*, Rockville, 1999.
22. International Conference on Harmonisation (ICH); *Text on validation analytical procedures, Q2A*, 1995.
23. International Conference on Harmonisation (ICH); *Validation of analytical procedures: Methodology, Q2B*, 1997.
24. International Standard Organization (ISO); *General requirements for the competence of testing and calibration laboratories (ISO/IEC 17025)*, 1995.
25. Annual Book of ASTM Standards; *Standards practices for infrared, multivariate, quantitative analysis, E1655*, vol 03.06, ASTM International: West Conshohocken, 2000.
26. Pharmaceutical Analytical Sciences Group (PASG); *Guidelines for the development and validation of near infrared (NIR) spectroscopic methods*, <http://www.pasg.org.uk>, acessada em Outubro 2006.

27. Eurachem/Citac – Work Group; *Quantifying uncertainty in analytical measurement*, 2nd ed., 2000.
28. Leite, F.; *Validação em análise química*, 4^a. ed., Ed. Átomo: Campinas, 2002.
29. Danzer, K.; Otto, M.; Currie, L.; *Pure Appl. Chem.* **2004**, *76*, 1215.
30. Currie, L. A.; *Anal. Chim. Acta* **1999**, *391*, 105.
31. Braga, J. W. B.; Poppi, R. J.; *J. Pharm. Sci.* **2004**, *93*, 2124.
32. Braga, J. W. B.; Poppi, R. J.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 1004.
33. Valderrama, P.; Braga, J. W. B.; Poppi, R. J.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18*, 259.
34. Valderrama, P.; Braga, J. W. B.; Poppi, R. J.; *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *52*, 8331.
35. Saurina, J.; Leal, C.; Compañó, R.; Granados, M.; Dolors Prat, M.; Tauler, R.; *Anal. Chim. Acta* **2001**, *432*, 241.
36. Rodríguez-Cuesta, M. J.; Boqué, R.; Rius, F. X.; Picón Zamora, D.; Martínez Galera, M.; Garrido Frenich, A.; *Anal. Chim. Acta* **2003**, *491*, 47.
37. Rodríguez-Cuesta, M. J.; Boqué, R.; Rius, F. X.; Martínez Vidal, J. L.; Garrido Frenich, A.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2005**, *77*, 251.
38. Haimovich, A.; Orselli, R.; Escandar, G. M.; Olivieri, A. C.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2006**, *80*, 99.
39. Olivieri, A. C.; Faber, N. K. M.; Ferré, J.; Boqué, R.; Kalivas, J. H.; Mark, H.; *Pure Appl. Chem.* **2006**, *78*, 633.
40. Braga, J. W. B.; Bottoli, C. B. G.; Jardim, I. C. S. F.; Goicoechea, H. C.; Olivieri, A. C.; Poppi, R. J.; *J. Chromatogr. A* **2007**, *1148*, 200.
41. Carneiro, R. L.; Braga, J. W. B.; Bottoli, C. B. G.; Poppi, R. J.; *Anal. Chim. Acta* **2007**, *595*, 51.
42. Valderrama, P.; Poppi, R. J.; *Anal. Chim. Acta* **2008**, *623*, 38.
43. Vessman, J.; Stefan, R. I.; Staden, J. F. V.; Danzer, K.; Lindner, W.; Burns, D. T.; Fajgelj, A.; Miller, H.; *Pure Appl. Chem.* **2001**, *73*, 1381.
44. Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Wood, R.; *Pure Appl. Chem.* **2002**, *74*, 835.
45. Miller, J. N.; Miller, J. C.; *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*, 4th ed.; Prentice Hall: New York, 2000, cap. 5.
46. Currie, L. A.; *Pure Appl. Chem.* **1995**, *67*, 1699.
47. Lorber, A.; *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 1167.
48. Brown, C. D.; *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4364.
49. Morgan, D. R.; *Appl. Spectrosc.* **1977**, *51*, 404.
50. Lorber, A.; Faber, K.; Kowalski, B. R.; *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 1620.
51. Xu, L.; Schechter, I.; *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 3722.
52. Wentzell, P. D.; Andrews, D. T.; Kowalski, B. R.; *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2299.
53. Faber, N. K. M.; *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 5108.
54. Ferré, J.; Brown, S. D.; Rius, X.; *J. Chemom.* **2001**, *15*, 537.
55. Andersen, C. M.; Bro, R.; *J. Chemom.* **2003**, *17*, 646.
56. Goicoechea, H. C.; Olivieri, A. C.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2001**, *56*, 73.
57. Faber, N. K. M.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2000**, *50*, 107.
58. Faber, N. K. M.; *J. Chemom.* **1998**, *12*, 405.
59. Ferré, J.; Faber, N. K. M.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2003**, *69*, 123.
60. Sena, M. M.; Chaudhry, Z. F.; Collins, C. H.; Poppi, R. J.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, *36*, 743.
61. Ho, C.-N.; Christian, D.; Davidson, E. R.; *Anal. Chem.* **1980**, *52*, 1071.
62. Wang, Y.; Borgen, O. S.; Kowalski, B. R.; *J. Chemom.* **1993**, *7*, 117.
63. Trevisan, M. G.; Poppi, R. J.; *Anal. Chim. Acta* **2003**, *493*, 69.
64. Bro, R.; *J. Chemom.* **1996**, *10*, 47.
65. Messick, N. J.; Kalivas, J. H.; Lang, P. M.; *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1572.
66. Martens, H.; Naes, T.; *Multivariate calibration*, Wiley: New York, 1989.
67. Riu, J.; Rius, F. X.; *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1851.
68. Faber, N. K. M.; Ferré, J.; Boqué, R.; Kalivas, J. H.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2002**, *63*, 107.
69. Olivieri, A. C.; Faber, N. K. M.; *J. Chemom.* **2005**, *19*, 583.
70. Rodrigues, L. C.; Campanã, A. M. G.; Linares, C. J.; Ceba, M. R.; *Anal. Lett.* **1993**, *26*, 1243.
71. Goicoechea, H. C.; Olivieri, A. C.; *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 4361.
72. Muñoz de la Pena, A.; Espinosa-Mansilla, A.; Acedo Valenzuela, M. I.; Goicoechea, H. C.; Olivieri, A. C.; *Anal. Chim. Acta* **2002**, *463*, 75.
73. Muñoz de la Pena, A.; Espinosa Mansilla, A.; Gómez, D. G.; Olivieri, A. C.; Goicoechea, H. C.; *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 2640.
74. Olivieri, A. C.; *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4936.
75. Laasonen, M.; Harmia-Pulkkinen, T.; Simard, C.; Rasanen, M.; Vuorela, H.; *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 754.
76. Moffat, A. C.; Trafford, A. D.; Jee, R. D.; Graham, P.; *Analyst* **2000**, *125*, 1341.
77. Boqué, R.; Rius, F. X.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1996**, *32*, 11.
78. Fernandez, J. A.; Jin, L.; Wahl, F.; Faber, N. M.; Massart, D. L.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2003**, *65*, 281.
79. Hoy, M.; Steen, K.; Martens, H.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1998**, *44*, 123.
80. De Vries, S.; Ter Braak, C. J. F.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1995**, *30*, 239.
81. Faber, K.; Kowalski, B. R.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1996**, *34*, 283.
82. Faber, K.; Kowalski, B. R.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1997**, *11*, 181.
83. Faber, N. M.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2000**, *52*, 123.
84. Faber, N. K. M.; Bro, R.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2002**, *61*, 133.
85. van der Voet, H.; *J. Chemom.* **1999**, *13*, 195.
86. Jarque, C. M.; Bera, A. K.; *International Statistical Review* **1987**, *55*, 163.
87. Bonate, P. L.; *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 1307.
88. Wehrens, R.; Putter, H.; Buydens, L. M. C.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2000**, *54*, 35.
89. Wehrens, R.; van Der Linden, W. E.; *J. Chemom.* **1997**, *11*, 157.
90. Fernandez Pierna, J. A.; Jina, L.; Wahlc, B. F.; Faber, N. M.; Massart, D. L.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2003**, *65*, 281.
91. Olivieri, A. C.; Faber, N. M.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2004**, *70*, 75.
92. Kiers, H. A. L.; *J. Chemom.* **2004**, *18*, 22.
93. Olivieri, A. C.; *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4936.