

Emprego de planilhas eletrônicas, baseadas nas normas ISO e recomendações IUPAC, em curvas analíticas da análise de água

Use of electronic spreadsheets, based on ISO standards and IUPAC guidelines, for assessing the quality of water analytical curves

RIALA6/1537

Sérgio DOVIDAUSKAS^{1*}, Isaura Akemi OKADA¹, Alice Momoyo SAKUMA², Maria Cristina DURAN², Camila Cardoso de OLIVEIRA³

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

²Centro de Materiais de Referência, Instituto Adolfo Lutz

³Núcleo de Análise e Tratamento de Dados, Centro de Materiais de Referência, Instituto Adolfo Lutz Recebido: 22.11.2012 - Aceito para publicação: 19.02.2013

RESUMO

Este trabalho descreve o desenvolvimento, a validação e a aplicação de planilhas eletrônicas no software Microsoft Excel® para avaliar a qualidade analítica de gráficos de calibração de funções lineares e homoscedásticas, que são usados em análises físico-químicas de águas por espectrofotometria UV-Vis, e obtidos segundo as normas ISO e recomendações IUPAC. Por meio da inserção dos valores de absorbância, as planilhas apresentam os gráficos de calibração e de resíduos e calculam desvio-padrão residual, desvio-padrão para coeficiente angular, desvio-padrão para intercepto e coeficiente de determinação. Em termos de predições, as planilhas calculam, com 95 % de confiança, o intervalo de predição (apresentado com a respectiva curva com limites superior e inferior), o valor crítico da absorbância, o valor crítico da concentração (x_c), o valor mínimo detectável da concentração (x_D) ou limite de detecção, o limite de quantificação e os intervalos de confiança para amostras. De uma planilha inicial, simplificações foram introduzidas e as planilhas resultantes foram usadas nas análises de nitrato, nitrito e ferro. A influência das simplificações no cálculo dos parâmetros, nas relações entre os parâmetros x_c/x_D da ISO 11843-1,2 e nos parâmetros da Comissão Europeia CC α (limite de decisão)/CC β (capacidade de detecção), são discutidas. **Palavras-chave.** controle de qualidade analítica, curvas analíticas, análise da água, planilhas eletrônicas.

ABSTRACT

This paper describes the development and validation of the electronic spreadsheet in Microsoft Excel® software for evaluating the analytical quality of calibration graphs of linear and homoscedastic functions, used in water physical-chemical analysis by UV-Vis spectrophotometry, and obtained according to ISO standards and IUPAC guidelines. By introducing the absorbance data, the spreadsheet shows the calibration (with respective function) and the residues graphs, and also computes the residual standard deviation, angular coefficient standard deviation, interception standard deviation, and coefficient of determination R^2 . On prediction terms, the spreadsheets calculate (confidence level at 95 %): the prediction interval (showing the respective curve with upper and lower limits), the absorbance critical value, the concentration critical value (x_c), the minimum detectable value of concentration (x_D) or detection limit, the quantification limit, and the confidence intervals for samples. From the initial spreadsheet, simplifications were introduced and the new spreadsheets were used for analyzing nitrate, nitrite and iron. The effect of the simplifications on the parameters calculation, and the correlations between x_c/x_D ISO 11843-1,2 parameters and the CC α (decision limit)/CC β (detection capability) European Commission parameters, were discussed.

Keywords. analytical quality control, analytical curves, water analysis, electronic spreadsheets.

INTRODUÇÃO

Entende-se a Quimiometria como a aplicação da estatística à análise de dados químicos (da química orgânica, analítica ou medicinal) e ao planejamento de simulações químicas e experimentos químicos. Na prática, isto significa planejar ou selecionar as melhores condições para experiências e medidas experimentais, e obter o maior volume de informações a partir da análise dos dados químicos¹⁻³. Com esta abordagem estatística, fica claro que os recursos computacionais são úteis porque reduzem o tempo demandado para os cálculos e proporcionam informações de interpretação direta por meio de gráficos.

Dentro da Quimiometria, os gráficos de calibração ocupam lugar de destaque devido ao seu uso extensivo em Química Analítica, principalmente em técnicas como cromatografia, potenciometria e as espectrofotometrias UV-Visível e de absorção/emissão atômicas, em que sinais analíticos (áreas de picos cromatográficos, diferenças de potencial, absorvâncias ou emissões de radiações) são grafados em função da concentração de um analito de interesse. Deste modo, a relação matemática “sinal = função_(concentração)” pode ser obtida por operações como a regressão linear por mínimos quadrados ordinários, regressão linear por mínimos quadrados ponderados e regressão polinomial⁴⁻⁶. Contudo, não é comum na atividade rotineira de um laboratório expressar ou avaliar a precisão de um gráfico de calibração por meio dos

chamados limites de confiança e de predição (ou intervalos de confiança e predição), devido ao volume de cálculos a serem realizados. Esta situação pode ser visualizada pela Figura 1. A parte A desta figura mostra um gráfico de calibração simples, em que um sinal analítico de absorvância Y^S de uma amostra é associado por interpolação à concentração X^S do analito à que a curva se refere. Já a parte B apresenta o mesmo gráfico em que foram adicionados os limites inferior e superior de predição (ou previsão), expressos como curvas que possuem como eixo de simetria a reta obtida pela regressão linear⁷. Neste segundo caso, podemos associar a incerteza $\pm s$ ao valor de X^S , obtida pela intersecção do sinal Y^S com os limites superior e inferior de predição. Em adição, parâmetros importantes, como os limites de decisão e de detecção são, geralmente, estimados somente no momento da validação do método analítico⁸, não sendo comum um acompanhamento rotineiro do desempenho do método quanto a estes parâmetros, utilizando a precisão de curvas analíticas.

No intuito de colaborar com a melhoria da qualidade nos laboratórios de Saúde Pública, nos quais a obtenção de resultados não tendenciosos, exatos e precisos é imprescindível, este trabalho apresenta planilhas eletrônicas desenvolvidas no software *Microsoft Excel* que avaliam a qualidade analítica de gráficos de calibração de funções lineares e homoscedásticas, rotineiramente utilizados nas análises físico-químicas de águas para consumo humano por métodos validados e baseados em espectrofotometria

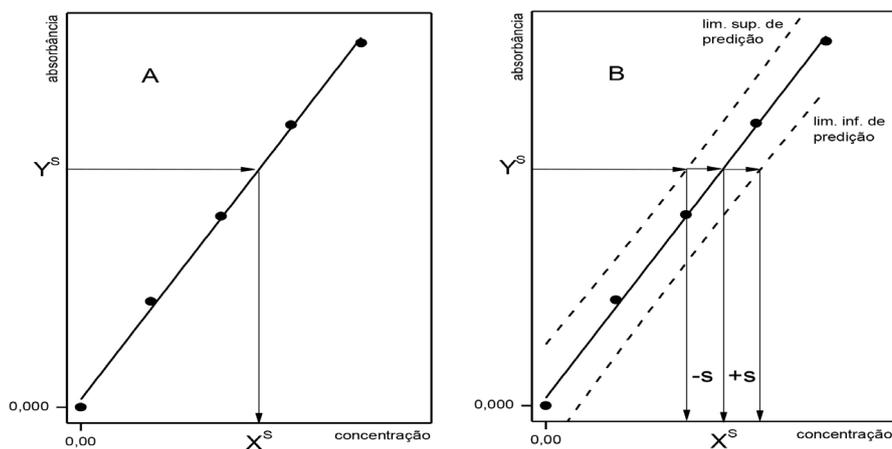


Figura 1. (A) Curva de calibração simples. (B) Curva de calibração acrescida dos limites superior e inferior de predição

UV-Visível. Como exemplos, apresentamos a aplicação dessas planilhas para as determinações de nitrito, ferro e nitrato, que estimam parâmetros das curvas (desvio padrão residual $\hat{\sigma}$, coeficiente angular e \hat{b} respectivo desvio padrão s_b , intercepto \hat{a} e respectivo desvio padrão s_a , coeficiente de determinação R^2), além de apresentar os gráficos de calibração e de resíduos. Na etapa preditiva, é apresentado o gráfico de calibração com os limites superior e inferior de predição, sendo calculados o valor crítico de concentração (limite de decisão para uma probabilidade α de um erro tipo I para o branco do ensaio), o valor mínimo detectável de concentração (capacidade de detecção ou limite de detecção para uma probabilidade β de um erro tipo II) e o valor do limite de quantificação, além de fornecer a predição para a amostra (resultado da função de avaliação analítica para a amostra ou, simplesmente, concentração do analito na amostra) e seu respectivo intervalo de confiança (95 %). Os cálculos envolvidos nas planilhas são baseados nas normas ISO 8466-1⁹, ISO 11095¹⁰, ISO 11843-1,2¹¹ e em recomendações da International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC^{7,12}. O uso dessas planilhas eletrônicas na rotina permite a avaliação dos resultados obtidos sempre que uma curva de calibração é construída, ou seja, sempre que o método é utilizado.

MATERIAL E MÉTODOS

Os dados experimentais utilizados na elaboração das planilhas são provenientes da análise físico-química de águas, rotineiramente realizadas no Instituto Adolfo Lutz (Regional de Ribeirão Preto) por métodos espectrofotométricos normalizados: nitrito (por espectrofotometria na região Visível, após desenvolvimento de cor com sulfanilamida e N-1-naftil-etilenodiamina, em duas séries diferentes de níveis de concentração), ferro (por espectrofotometria na região Visível, após complexação do íon Fe^{2+} com 1,10-fenantrolina) e nitrato (por espectrofotometria na região UV). Estas determinações estão descritas em literatura pertinente.^{13,14} Os cálculos efetuados pelas planilhas foram validados por comparação dos resultados gerados pelas planilhas com aqueles resultantes do processamento manual dos dados e pela reprodução do tratamento de dados de exemplos de análises que fazem parte das normas ISO 11843-2 e ISO 8466-1.

Cálculo dos parâmetros da função

Uma vez que as planilhas referem-se a quatro métodos analíticos já validados, assumem-se como verdadeiras duas características destes métodos, determinadas durante as respectivas validações: a homoscedasticidade e a linearidade da função de calibração, ou seja, considera-se que os erros estão essencialmente nos valores medidos de absorbância (y), distribuindo-se com desvio padrão constante e independente da concentração (x). Não obstante, os dados de cada método foram submetidos a testes de homoscedasticidade (teste F em que as variâncias foram testadas para diferenças significativas nos limites da faixa de trabalho, ou seja, branco e solução-padrão de maior concentração) e linearidade (teste F em que a diferença entre as variâncias do modelo linear e do modelo não linear, considerado polinômio de grau 2, é comparada com a variância do modelo não linear), conforme norma ISO 8466-1 e recomendação IUPAC^{7,9}. Todos os resultados confirmaram as duas características. Deste modo, uma função linear foi ajustada aos valores experimentais por regressão linear (mínimos quadrados ordinários), resultando na estimativa:

$$\hat{y} = \hat{a} + \hat{b}x \quad (1)$$

em que

$$\hat{b} = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (x_i - \bar{x})(\bar{y}_{ij} - \bar{y})}{J \cdot \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2} \quad (2)$$

e

$$\hat{a} = \bar{y} - \hat{b}\bar{x} \quad (3)$$

Os somatórios na equação 2 referem-se a I soluções-padrão de concentrações diferentes usadas no gráfico de calibração, cada uma delas preparadas em J repetições. Assim, por exemplo, um gráfico construído com 5 soluções-padrão (incluindo o branco), cada uma das soluções preparadas em duplicata apresentará $I = 5$ e $J = 2$. Se para cada preparação, de cada solução-padrão, forem efetuadas L medidas de absorbância, temos:

$$\bar{y}_{ij} = \frac{\sum_{l=1}^L y_{ijl}}{L} \quad (4)$$

$$\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{l=1}^L y_{ijl}}{I \cdot J \cdot L} \quad (5)$$

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^I x_i}{I} \quad (6)$$

A precisão na calibração foi caracterizada pelo desvio-padrão residual estimado ($\hat{\sigma}$), pelo desvio-padrão estimado de b (s_b) e pelo desvio-padrão estimado de a (s_a):

$$\hat{\sigma} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (\bar{y}_{ij} - \hat{a} - \hat{b}x_i)^2}{(I \cdot J) - 2}} \quad (7)$$

$$s_b = \frac{\hat{\sigma}}{\sqrt{J \cdot \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} \quad (8)$$

$$s_a = \hat{\sigma} \cdot \sqrt{\frac{1}{I \cdot J} + \frac{\bar{x}^2}{J \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} = \hat{\sigma} \cdot \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I x_i^2}{I \cdot J \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} \quad (9)$$

A qualidade do ajuste pôde ser avaliada comparando a variância devida à regressão (SSR) com a variância observada (SST), pelo cálculo do coeficiente de determinação R^2 :

$$R^2 = \frac{SSR}{SST} = \frac{\sum_{i=1}^I (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (\bar{y}_{ij} - \bar{y})^2} \quad (10)$$

Cálculos preditivos

As curvas correspondentes ao intervalo de predição foram calculadas pela equação 11, que conduz ao intervalo de confiança de uma média de concentrações \bar{x} obtida a partir de K repetições, expressa pela equação 12:

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

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

Em particular, o valor crítico da absorbância (y_c) acima do qual existe a probabilidade α de um erro tipo I para o branco do ensaio foi calculado pela equação 13, em que K é o número de repetições preparadas para as amostras (se, por exemplo, as amostras são analisadas em triplicata, K = 3).

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

O valor de t Student depende do intervalo de confiança ($1 - \alpha/2$ ou $1 - \alpha$) e do número de graus de liberdade v ($I \cdot J \cdot L - 2$). Se a curva for construída, por exemplo, com 6 soluções-padrão ($I = 6$) em triplicata ($J = 3$), com medida única de absorbância ($L = 1$), então $v = (I \cdot J \cdot L) - 2 = 16$. Observe que, enquanto o intervalo de predição das equações (11) e (12) implica em intervalo de confiança de nível ($1 - \alpha/2$) exigindo, portanto, um valor de t bilateral (ou bicaudal, com teste de hipóteses $H_0: \mu = \mu_0$; $H_a: \mu \neq \mu_0$), o valor de y_c na equação 13 utiliza um valor de t unilateral porque se trata de um teste de hipóteses unilateral ($H_0: \mu = \mu_0$; $H_a: \mu > \mu_0$), como pode ser visualizado na Figura 2A.

y_c é o valor da variável resposta Y (no caso deste trabalho, a absorbância) acima do qual conduz, para uma dada probabilidade α de erro tipo I, à decisão de que o sistema em observação (amostra) não está em seu estado básico (o analito está presente). Ao valor crítico da absorbância (y_c) corresponde o valor crítico da concentração (x_c), acima do qual existe a probabilidade de um erro tipo I para o branco do ensaio.

A partir de $y_c = \hat{a} + \hat{b} \cdot x_c$, x_c pode ser calculado pela equação 14, em que δ representa o parâmetro não-centralidade da distribuição t não-central. O valor mínimo detectável de concentração (x_D) ou limite de detecção (L_D) pode ser calculado pela equação 15; porém, quando $\alpha = \beta$ (β é a probabilidade de um erro tipo II) e $v > 3$, uma aproximação é dada por assim, a equação 16, o que torna possível estimar x_D pela equação 17.

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

$$x_D = \delta \frac{\hat{\sigma}}{\hat{b}} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{\bar{x}^2}{J \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} \quad (15)$$

$$\delta_{(v;\alpha;\beta)} \approx 2 \cdot t_{1-\alpha(v)} \quad (16)$$

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

Com relação ao limite de quantificação (L_Q), são necessárias algumas observações: (i) a IUPAC não recomenda o seu uso em validação de métodos, afirmando que é preferível expressar a incerteza da medida como uma função da concentração, verificando se esta função cumpre os requisitos do método ou exigências do usuário final dos resultados (cliente)¹²; (ii) o Inmetro (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia), por sua vez, estabelece algumas maneiras de se calcular o L_Q como, por exemplo, somar 10 desvios-padrão amostrais dos brancos à média dos valores dos brancos da amostra ($L_Q = X_{\text{branco}} + 10s$)¹⁵. Assim, para contornar estas dificuldades em se definir o cálculo de L_Q e tendo em mente que a proposta da planilha não é a validação de um método, mas o controle rotineiro da qualidade analítica da função (ou curva) de calibração de métodos já validados, incluiu-se na planilha o intervalo de predição (incertezas das medidas como funções das concentrações) compreendendo todo o intervalo de concentrações do gráfico de calibração (desde o branco até a maior concentração do analito presente nas soluções-

padrão). Em adição, para fornecer uma concentração maior, que pudesse ser claramente diferenciada do limite de detecção L_D (x_D) e cujo cálculo fosse também baseado na função de calibração, pela experiência dos analistas, optou-se por estimá-lo como o dobro do valor de x_D (equação 18).

$$L_Q = 2 \cdot x_D \quad (18)$$

Consequentemente, para se avaliar a precisão do L_Q , o respectivo desvio-padrão $s_{(L_Q)}$ foi calculado pela equação 19:

$$s_{(L_Q)} = \frac{\hat{\sigma}}{\hat{b}} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{(y_{L_Q} - \bar{y})^2}{\hat{b}^2 \cdot J \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} \quad (19)$$

Quando $\alpha = \beta$ e $v > 3$, a aproximação, realizada na obtenção da equação 16, conduz, nesse caso, a

$$L_Q = 2 \cdot x_D \approx 4 \cdot x_c \quad (20)$$

e

$$y_{L_Q} = \hat{a} + \hat{b} x_{L_Q} \approx \hat{a} + \hat{b} \cdot 4 \cdot x_c \quad (21)$$

Finalmente, a dispersão em torno do L_Q foi também expressa pelo cálculo do coeficiente de variação ($CV_{\%}$):

$$CV_{(L_Q)\%} = \frac{s_{(L_Q)}}{L_Q} \cdot 100 \quad (22)$$

Uma visualização gráfica dos cálculos de y_c , x_c , x_D (ou L_D) e L_Q é exibida na Figura 2.

RESULTADOS

Validação das planilhas

Assim como é necessário validar um método analítico para que se comprove a sua adequação à finalidade a que se propõe (em termos de exatidão, precisão, seletividade, robustez etc.), em planilhas como as que foram desenvolvidas neste trabalho, criadas em

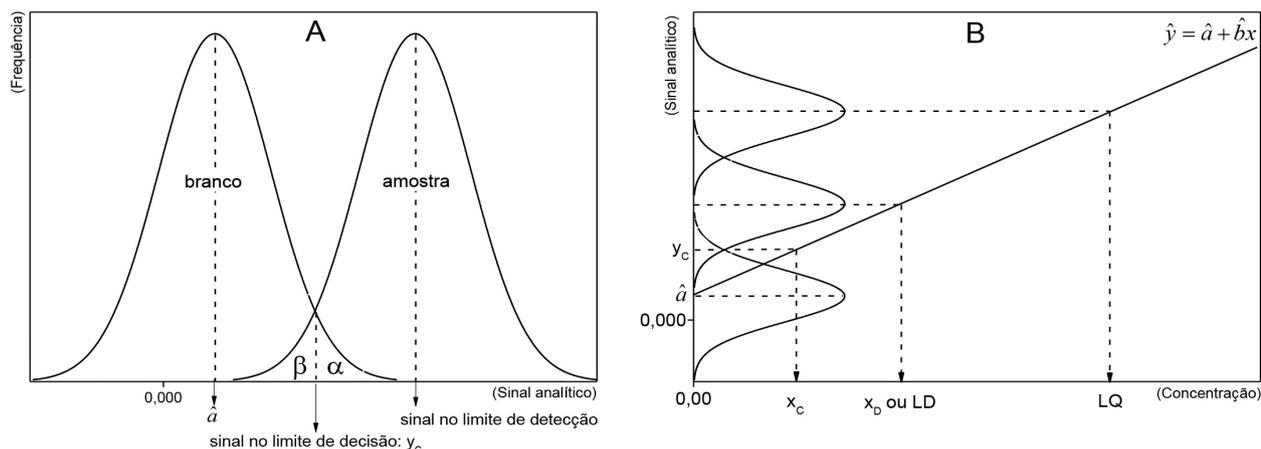


Figura 2. Visualização gráfica: (A) das distribuições amostrais das médias dos sinais analíticos para o branco e para a amostra nos limites de decisão e de detecção – α é a probabilidade de um erro tipo I e β é a probabilidade de um erro tipo II; (B) das determinações de y_c , x_c , x_D (ou LD) e LQ para a função de calibração $\hat{y} = \hat{a} + \hat{b}x$

software comercial (*Excel*), deve-se ter um cuidado especial em demonstrar que os cálculos nelas inseridos estejam corretos. As planilhas foram validadas de duas maneiras: (i) pela reprodução de exemplos de cálculos que fazem parte das normas ISO 11843-2 e ISO 8466-1 e (ii) pela comparação dos resultados gerados pelas planilhas com os resultantes do processamento manual dos dados.

Quando dados constantes em exemplos de duas normas ISO (dados de entrada) foram inseridos nos campos a eles designados em duas planilhas diferentes, foi observada concordância entre os resultados apresentados pelas normas e aqueles calculados pelas respectivas planilhas (Tabela 1). Posteriormente, simplificações foram introduzidas nas planilhas de modo a contemplar o seu uso em rotina laboratorial e, na comparação com o processamento manual dos dados, todas as planilhas, simplificadas ou não, mostraram resultados em concordância.

Aplicação das planilhas

O conceito inicial que norteou o desenvolvimento das planilhas era possibilitar que a simples introdução de dados obtidos experimentalmente (dados de entrada ou dados brutos como valores de absorbância, por exemplo), e que são frequentemente grafados em cadernos específicos durante a realização de uma análise, pudesse

obter como dados de saída (resultados) não somente as concentrações dos analitos nas amostras, mas também os respectivos intervalos de confiança. Posteriormente, constatou-se que seria também interessante ter uma visão geral da qualidade analítica da curva de calibração construída (tendo em mente que o erro analítico é uma combinação da incerteza na determinação do valor medido e da incerteza na estimativa dos coeficientes da regressão), bem como acessar alguns parâmetros de relevância, como o L_D e o L_Q . Assim, a Figura 3 apresenta uma vista geral de uma planilha desenvolvida, na forma simplificada, para a análise de nitrito em águas para consumo humano por espectrofotometria. Contudo, deve ser ressaltado que as planilhas aqui apresentadas continuarão a ser aperfeiçoadas, seja na sua apresentação, seja na inclusão de cálculos adicionais, ou, ainda, na sua adaptação a outras situações (como na análise de alimentos, por exemplo), em sintonia com a filosofia da qualidade em termos da melhoria contínua.

Na Figura 3 podemos observar a demarcação de 6 regiões: na região A estão os campos (células no software *Excel*) para identificação geral da análise (analito, data, analista e responsável pelo preenchimento da planilha); na região B estão os campos para os dados iniciais de entrada (6 concentrações em mg/L das soluções-padrão, e respectivas absorbâncias a 543 nm); uma vez introduzidos estes dados, são produzidos resultados nas regiões C, D e E. Na região C

Tabela 1. Validação de planilhas desenvolvidas por comparação com exemplos em normas ISO

Parâmetro	Comparação com ISO 11843-2 (I = 6; J = 3; L = 1; K = 3)		Comparação com ISO 8466-1 (I = 10; J = 1; L = 1; K = 3)	
	Resultados da norma	Resultados da planilha ^a	Resultados da norma	Resultados da planilha ^a
\bar{x}	1,1167	1,11667	0,275	0,275
$S_{xx} = J \cdot \sum(x_i - \bar{x})^2$	20,425	20,425	Não calculado	Não calculado
\hat{a}	$9,9959 \times 10^{-5}$	$9,99592 \times 10^{-5}$	0,018	0,018
\hat{b}	0,02374	0,023741	2,5752	2,57527 ^b
$\hat{\sigma}$	$1,1099 \times 10^{-3}$	$1,10993 \times 10^{-3}$	0,0052	0,00517
y_c	0,00140	0,001399	Não calculado	Não calculado
x_c	0,055	0,0548	Não calculado	Não calculado
x_D	0,110	0,1095	Não calculado	Não calculado
\hat{x}	Não calculado	Não calculado	$0,240 \pm 0,003$	$0,2396 \pm 0,0031$

^aResultados fornecidos com uma casa decimal adicional em relação àqueles constantes nas respectivas normas

^bEste resultado foi confirmado pelas regressões realizadas nos softwares *Excel*® 2010 e *Origin* 8.1, assim como por processamento manual dos dados

estão indicados parâmetros da regressão linear (\hat{a} , \hat{b} , $s_{\hat{a}}$, $s_{\hat{b}}$, $\hat{\sigma}$, R^2); na região D estão informados os 3 gráficos resultantes: curva de calibração, gráfico de resíduos e limites de predição. Este último gráfico é resultado do processamento de dados da região E que indica também: y_c , x_c , y_{LQ} , x_{LQ} , x_D (L_D), L_Q , s_{LQ} e CV_{LQ} . Em adição, os resultados para x_D (L_D), L_Q , s_{LQ} e CV_{LQ} são convertidos para a sua expressão em termos de concentração de nitrito (NO_2^-), uma vez que os dados de concentração das soluções-padrão são introduzidos na planilha em termos de concentração de nitrogênio (N-NO_2^-) – tal conversão foi introduzida em vista da diferença no estabelecimento dos Valores Máximos Permitidos (VMP) entre a legislação da água destinada ao consumo humano proveniente de sistema e solução alternativa de abastecimento (Portaria 2914/11¹⁶, concentração em N-NO_2^-) e a legislação para águas envasadas e gelo (Resolução RDC n° 274/05¹⁷, concentração em NO_2^-). Finalmente, na região F, estão as células para a introdução de dados sobre as amostras: identificação, valores de absorbância e fatores de diluição – como resultados, aparecem as concentrações (mg/L), em N-NO_2^- e em NO_2^- , acompanhadas dos respectivos intervalos de confiança (95 %).

De estrutura similar à da Figura 3 são as planilhas adaptadas para as determinações de nitrato, ferro e nitrito (a concentrações maiores) em águas para consumo humano. A Tabela 2 exhibe valores típicos dos parâmetros calculados pelas planilhas. A planilha desenvolvida para nitrito a concentrações mais elevadas foi adaptada da constante na Figura 3, simplesmente pelo aumento dos níveis de concentração das soluções-padrão, uma vez que

o VMP estabelecido para águas provenientes de sistema e solução alternativa de abastecimento é aproximadamente 160 vezes maior que o VMP para águas envasadas e gelo, considerando a comparação dos VMPs em uma expressão comum: ou concentração em N-NO_2^- , ou concentração em NO_2^- . Após serem submetidas à validação por processamento manual dos dados, as quatro planilhas vêm sendo utilizadas rotineiramente no IAL de Ribeirão Preto. Em adição, na Tabela 2 estão indicadas as concentrações das soluções-padrão utilizadas nas respectivas curvas de calibração.

DISCUSSÃO

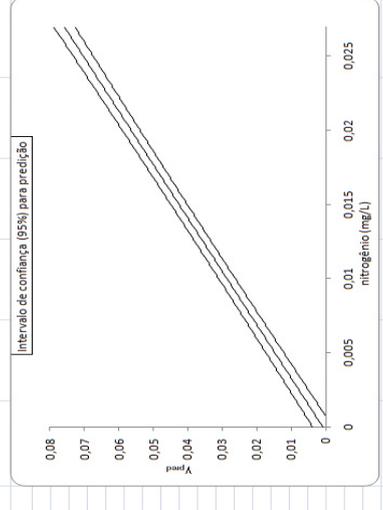
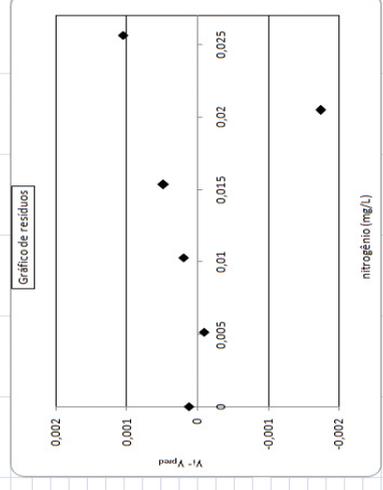
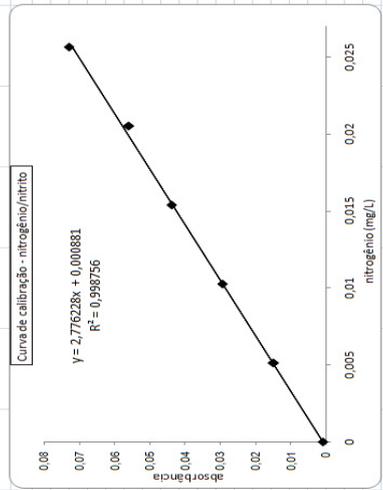
Uma primeira demonstração da versatilidade da planilha pode ser extraída das duas primeiras colunas da Tabela 2: a simples mudança dos níveis de concentração das soluções-padrão empregadas pode ajustar a curva aos níveis de detecção e quantificação desejados. Assim, enquanto o primeiro método (primeira planilha, primeira coluna da Tabela 2) para nitrito apresenta $L_D = 0,0016 \text{ mgN-NO}_2^-/\text{L}$ (= $0,0054 \text{ mgNO}_2^-/\text{L}$) e $L_Q = 0,0033 \text{ mgN-NO}_2^-/\text{L}$ (= $0,011 \text{ mgNO}_2^-/\text{L}$), o segundo método (segunda coluna da Tabela 2) apresenta $L_D = 0,0027 \text{ mgN-NO}_2^-/\text{L}$ (= $0,0090 \text{ mgNO}_2^-/\text{L}$) e $L_Q = 0,0054 \text{ mgN-NO}_2^-/\text{L}$ (= $0,018 \text{ mgNO}_2^-/\text{L}$). Como este último limite de quantificação está muito próximo do VMP pela Resolução RDC n° 274/05 ($0,02 \text{ mgNO}_2^-/\text{L}$), seria justificada a utilização da primeira planilha na análise de águas envasadas e gelo.

Com algumas modificações, a planilha também pode ser adaptada a situações diferentes das apresentadas

A	ANÁLISE DE NITRITO	Data: 06/12/2011
Análise:	NONOMO	Planilha preenchida por: SÉRGIO

CURVA DE CALIBRAÇÃO

Identificação padrão	Concentração mg/L, xi		Absorbância 543 nm		Média, Yi	xi - xi_m	(xi - xi_m) ²	Yi - Yi_m	(Yi - Yi_m) ²	(xi - xi_m)(Yi - Yi_m)	Ymes	Yi - Ymes	Ymes - Yi_m	(Ymes - Yi_m) ²	(Yi - Ymes) ²	(xi) ²	C			
	Abs 1	Abs 2	Abs 1	Abs 2													$\hat{y} = \hat{a} + \hat{b}x$	$\hat{\sigma}(S_{y/x})$	desv. padr. residual, (G _{res} -t)	desv. padr. =
padrão 1 (lco)	0	0,002	0,015	0,015	0,001	-0,0128	0,00016384	-0,035416867	0,00125434	0,000453333	0,00080852	0,000119048	-0,035535714	0,001262787	1,41723E-08	0	$\hat{\sigma}(S_{y/x})$	desv. padr. padrão residual, (G _{res} -t)	0,0001049576	
padrão 2	0,00512	0,015	0,015	0,015	0,035	-0,00768	5,89824E-05	-0,021416667	0,000458674	0,00016448	0,015095238	-9,52381E-05	-0,021321429	0,000454603	9,0729E-09	2,62144E-05	\hat{b}	2,776228	desv. padr. =	0,04899
padrão 3	0,01024	0,03	0,029	0,029	0,0295	-0,00256	6,5536E-06	-0,008916667	4,79403E-05	1,71067E-05	0,029309524	0,000190476	-0,007107143	5,05119E-05	3,62812E-08	0,000104858	\hat{a}	0,000881	desv. padr. =	0,00076
padrão 4	0,01536	0,043	0,045	0,045	0,044	0,00256	6,5536E-06	0,007583333	5,75069E-05	1,94133E-05	0,0432281	0,00047619	0,007107143	5,05119E-05	2,26757E-07	0,00023593	R^2	0,998756		
padrão 5	0,02048	0,055	0,057	0,057	0,056	0,00768	5,89824E-05	0,019583333	0,000393007	0,0001504	0,057738095	-0,001738095	0,021321429	0,000454603	3,02098E-06	0,00041943	$t_{0,95;sig}$, unil.	2,132		
padrão 6	0,0256	0,073	0,073	0,073	0,073	0,0128	0,00016384	0,036583333	0,00133834	0,00048267	0,071952381	0,001047619	0,035535714	0,001262787	1,09751E-06	0,00065536	$t_{0,95;sig}$, bil.	2,776		
Média/Soma	0,0128	0,073	0,073	0,073	0,036416667		0,000458752		0,003540208	0,0012736				0,003535604	4,40478E-06	0,001447792				



PREDIÇÃO

Y crítico =	0,003144737	ua	X crítico =	0,000815417	mg/L
Y _{lq} =	0,00953609	ua	X _{lq} =	0,00326167	mg/L
NITRITO					
LD, [N _{ox}] =	0,001630835	mg/L	LD, [N _{ox}] =	0,005358457	mg/L
LQ, [N] =	0,00326167	mg/L	LQ, [N _{ox}] =	0,010716915	mg/L
DP (LQ) =	0,000315029	mg/L	DP (LQ) =	0,00035095	mg/L
CV (LQ) =	9,658514824	%	CV (LQ) =	9,658514824	%

Intervalo de predição, amostra em duplicata, C = 0,95			
X	Y _{predito}	Lim. superior	Lim. inferior
0	0,00080952	0,003282544	-0,002066639
0,0001	0,001168675	0,004981155	-0,001781004
0,0002	0,001436198	0,004367806	-0,00149541
0,0003	0,001713821	0,0046375	-0,001209859
0,0004	0,001991443	0,004907293	-0,000924348

AMOSTRAS

Amostra	Abs 1	Abs 2	Abs média	Conc N-NO ₂	95% conf. +/-	Fator diluição	Nitrogênio, N-N _{ox} , mg/L	95% conf. +/-	Nitrito, N _{ox} , mg/L	95% conf. +/-
XXXX-2012	0,3	0,31	0,305	0,1095	0,0054	1	0,1095	0,0054	0,360	0,018
XXXX-2012	0,005	0,005	0,005	0,0015	0,0009	1	0,0015	0,0009	0,005	0,003
XXXX-2012	0,009	0,01	0,0095	0,0031	0,0019	1	0,0031	0,0019	0,010	0,003
XXXX-2012	0,018	0,019	0,0185	0,0063	0,0039	1	0,0063	0,0039	0,021	0,003

Figura 3. Visualização geral de uma das planilhas desenvolvidas (análise de nitrito), com a demarcação de 6 regiões A-F (veja texto para a discussão destas regiões)

neste trabalho. Por exemplo, ao passarmos de uma curva com 6 soluções-padrão (como as indicadas na Tabela 2) para 5 soluções (incluindo o branco), as seguintes modificações são necessárias: σ deve ser recalculado para 3 graus de liberdade (equação 7); na expressão de s_a (equação 9), o denominador na raiz deve incluir agora $I = 5$) e modificações semelhantes devem ser realizadas nas equações 11-15 e 19; como na planilha existem duas células específicas para valores de t , cada uma delas designada para os casos unilateral e bilateral, a substituição destes valores de t pelos correspondentes à nova situação (3 graus de liberdade) promoverá a modificação automática das células que fazem uso destes valores (equações 11-15 e 19).

O exposto no parágrafo anterior conduz a outra consideração: a simplificação das planilhas, refletindo a simplificação dos métodos rotineiros quando comparados aos respectivos métodos nas condições de validação. Por exemplo: em uma validação, uma série de, no mínimo, 5 soluções-padrão são preparadas ($I \geq 5$) em, no mínimo, 3 replicatas ($J \geq 3$), e em cada solução preparada são

realizadas, no mínimo, duas medidas do sinal analítico ($L \geq 2$); em uma típica análise de rotina, uma série única de 5 soluções-padrão é preparada ($I = 5, J = 1$) e a medida do sinal analítico de cada solução-padrão é realizada no início e no final da análise ($L = 2$). O impacto dessa simplificação do método, essencialmente sobre os parâmetros envolvendo precisão ($\sigma, s_a, s_b, \text{pred}_{(y)}, \text{pred}_{(xi)}, y_c, x_c, x_d, L_Q, s_{(LQ)}, CV_{(LQ)}$) é controlado pela planilha, permitindo avaliar se o método, quando usado em rotina, não perde significativamente sua qualidade analítica, retendo satisfatoriamente suas características definidas na validação.

Além de controlar a qualidade analítica da curva de calibração entre as análises (ao longo do tempo, desde a validação do método), a planilha permite também o diagnóstico gráfico de ocorrências não usuais na construção da curva de calibração da análise sendo realizada como, por exemplo, a preparação inadequada de uma das soluções-padrão: esta solução poderá ser identificada pelo gráfico de resíduos, enquanto as curvas de intervalos de predição apresentarão um afastamento anormal da reta de calibração. Estes recursos visuais

Tabela 2. Resultados típicos de cálculos das planilhas desenvolvidas neste trabalho

Parâmetro	Resultados das planilhas ^a			
	Nitrito (0 a 0,025 mgN/L) ^b	Nitrito (0 a 0,20 mgN/L) ^b	Nitrato (0 a 2,0 mgN/L) ^b	Ferro (0 a 0,80 mgFe/L) ^b
\bar{x} (mg/L)	0,0128	0,0887	0,867	0,35
$S_{xx} = J \cdot \sum(x_i - \bar{x})^2$	0,000459	0,0318	3,033	0,475
\hat{a}	0,0009	0,00036	0,013	0,008
s_a	0,0008	0,0012	0,004	0,002
\hat{b}	2,776	2,865	0,258	0,200
s_b	0,049	0,011	0,003	0,003
σ	0,00105	0,00192	0,00577	0,00232
R^2	0,99876	0,99994	0,99934	0,99887
y_c	0,0031	0,0043	0,025	0,013
x_c (mg/L)	0,0008	0,00137	0,046	0,024
x_d (mg/L)	0,0016	0,0027	0,091	0,048
L_Q (mg/L)	0,0033	0,0054	0,18	0,095
$s_{(LQ)}$ (mg/L)	0,0003	0,0005	0,02	0,010
$CV_{(LQ)}$ (%)	9,7	10,0	11,1	10,2

^aCálculos baseados em: $K = 2$ (amostras em duplicata); $I = 6$ (6 soluções-padrão); $J = 1$ (uma preparação para cada solução-padrão); $L = 2$ (duas medidas de absorbância em cada solução-padrão). ^bFaixa de concentrações das soluções-padrão

permitem a tomada de decisão para uma ação corretiva imediata, como substituir a solução-padrão inadequadamente preparada, antes que as amostras sejam analisadas. Resumindo, além da análise da qualidade analítica da curva de calibração por meio de parâmetros numéricos, o analista dispõe de informações gráficas facilmente interpretáveis.

Para finalizar esta discussão, tornam-se necessárias algumas considerações sobre os parâmetros $CC\alpha$ (limite de decisão) e $CC\beta$ (capacidade de detecção), definidos pela Comissão das Comunidades Europeias (CCE) em 2002¹⁸ e utilizados pelo Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – Animal (PNCRC-Animal) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento¹⁹. Por definição, $CC\alpha$ significa o limite a partir do qual pode ser concluído, com uma probabilidade de erro α , que uma amostra é não conforme, enquanto $CC\beta$ significa o menor conteúdo da substância que pode ser detectado, identificado e/ou quantificado em uma amostra com uma probabilidade de erro β . No caso de substâncias para as quais não foram estabelecidos limites permitidos (ou seja, para substâncias proibidas), $CC\beta$ é a mais baixa concentração na qual um método é capaz de detectar amostras contaminadas com uma certeza estatística de probabilidade $1 - \beta$. No caso de substâncias com limites permitidos estabelecidos (VMPs), $CC\beta$ é a concentração na qual o método é capaz de detectar concentrações dentro do limite permitido com certeza estatística de probabilidade $1 - \beta$. Em outras palavras, nas situações envolvendo $CC\beta$, o poder do teste de hipóteses aplicado é $1 - \beta$. Portanto, primeiramente, é preciso salientar que tanto $CC\alpha$ quanto $CC\beta$ referem-se ao domínio das concentrações, e não ao domínio dos sinais analíticos. Em segundo lugar, em se tratando de concentrações, é interessante comparar as formas de cálculo propostas. Em ambos os casos, limites permitidos estabelecidos ou não estabelecidos, a CCE estabelece que uma das formas de se calcular $CC\alpha$ seria por meio do procedimento indicado pela ISO 11843-1,2 (procedimento este que foi utilizado na preparação da planilha inicial deste trabalho, e seguido nas planilhas simplificadas seguintes), mas, ao invés de utilizar a “studentização” dos dados (distribuições t, sendo t o quociente de um resíduo por uma estimativa do desvio-padrão) na previsão de $CC\alpha$ (esta “studentização” conduz à obtenção de x_c da ISO, ou do valor crítico da concentração neste trabalho), adota a abordagem de fazer a previsão considerando distribuição normal para $CC\alpha$ e, como medida de dispersão, o desvio

padrão de precisão intermediária do intercepto ($\alpha = 1\%$) ou do limite permitido ($\alpha = 5\%$), para substâncias com limites permitidos não estabelecidos ou estabelecidos, respectivamente. Observações semelhantes podem ser feitas com relação ao cálculo de $CC\beta$. Esta diferença de abordagem entre ISO e CCE (dados “studentizados” versus dados normais) já havia sido observada em 2004 por Desimoni²⁰ ao criticar algumas das propostas da CCE.

CONCLUSÃO

A proposta deste trabalho foi demonstrar que parâmetros importantes de uma curva de calibração podem ser controlados rotineiramente com facilidade, desde que planilhas de cálculo sejam criteriosamente construídas em software acessível, tendo em mente que a melhoria da qualidade analítica dos resultados gerados por laboratórios de Saúde Pública deve ser uma busca incessante, dada a importância dos laudos gerados, em consequência destes resultados, na tomada de decisão.

REFERÊNCIAS

1. Malinowski E. Factor analysis in chemistry. 3rd ed. New York: John Wiley and Sons, Inc.; 2002.
2. Miller J, Miller J. Statistics and chemometrics for analytical chemistry. 4th ed. Harlow: Pearson Education Limited; 2000.
3. Otto M. Chemometrics - Statistics and computer application in analytical chemistry. 2nd ed. Weinheim: WILEY-VCH; 2007.
4. Custodio R, Andrade J, Augusto F. O ajuste de funções matemáticas a dados experimentais. *Quim Nova*. 1997;20(2):219-25.
5. Mendham J, Denney R, Barnes J, Thomas M. Vogel - Química Analítica Quantitativa. Rio de Janeiro: LTC Livros Técnicos e Científicos Editora SA; 2002.
6. Skoog D, West D, Holler F, Crouch S. Fundamentals of Analytical Chemistry. 8th ed. Belmont: Brooks/Cole - Thomson Learning Inc.; 2004.
7. Danzer K, Currie LA. Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part 1. Fundamentals and single component calibration. *Pure Appl Chem*. 1998;70(4):993-1014.
8. Ribeiro F, Ferreira M, Morano S, Silva L, Schneider R. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Quím Nova*. 2008;31(1):164-71.
9. ISO. Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. International Organization for Standardization. 1990:ISO 8466-1.
10. ISO. Linear calibration using reference materials. International Organization for Standardization. 1996:ISO 11095.
11. ISO. Capability of detection. International Organization for Standardization. 1997:ISO 11843-1,2.

12. Thompson M, Ellison S, Wood R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl Chem*. 2002;74(5):835-55.
13. APHA, AWWA, WEF. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 19th ed. AD E, LS C, AE G, editors. Washington DC: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation; 1995.
14. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). *Métodos físico-químicos para análise de alimentos: Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. 4^a ed. Brasília: (DF) Anvisa; 2005.
15. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO. Cgcre-8 4: Orientação sobre validação de métodos analíticos - Revisão 04 [acesso 2012 Out]: Disponível em [http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_4.pdf].
16. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 14 dez. 2011. Seção 1, p. 39-46.
17. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 274, de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento técnico para águas envasadas e gelo. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 23 set. 2005. Seção 1, p. 376-377.
18. Commission E. Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off J Eur Comm*. 2002; L221:8-36.
19. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 24 de 14 de julho de 2009. Define os requisitos e critérios específicos para funcionamento dos Laboratórios de Análises de Resíduos e Contaminantes em Alimentos integrantes da rede Nacional de Laboratórios Agropecuários. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 22 jul. 2009. Seção 1, p. 7-15.
20. Desimoni E. About CC α and CC β as introduced by the Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC. *Accred Qual Assur*. 2004;9:724-5.