

Artigos técnicos

Uma estimativa do efeito das incertezas dos padrões na incerteza das curvas de calibração em química analítica

An estimate of the effect of the uncertainty of the standards in the uncertainty of the calibration curves in analytical chemistry

Ricardo Rezende Zucchini ^{a*}

^a Laboratório de Referências
Metrológicas, Instituto de
Pesquisas Tecnológicas do
Estado de São Paulo S.A.,
São Paulo-SP, Brasil.

*E-mail: zucchini@ipt.br

Palavras-chave:
incerteza; calibração;
simulação numérica;
simulação de Monte Carlo.

Keywords:
uncertainty; calibration;
numerical simulation;
Monte Carlo simulation.

Resumo

Curvas de calibração analíticas são importantes fontes de incerteza dos resultados de medições em química. As estimativas de incerteza geralmente desconsideram as incertezas herdadas dos padrões utilizados para construir as curvas, principalmente devido a dificuldades matemáticas. Neste trabalho, é apresentada uma investigação da influência das incertezas dos padrões na incerteza das curvas analíticas, utilizando a simulação pelo método de Monte Carlo aplicado a um exemplo clássico da literatura.

Abstract

Analytical calibration curves are important sources of uncertainty in the results of measurements in chemistry. Uncertainty estimates generally disregard the uncertainties inherited from the standards used to construct the curves mainly due to mathematical difficulties. This paper presents an investigation of the influence of the uncertainties of the standards on the uncertainty of calibration curves using the simulation by the Monte Carlo method applied to a classic example in literature.

1 Introdução

Curvas de calibração analíticas são modelos matemáticos utilizados para converter sinais analíticos em concentrações. Geralmente são construídas por meio de regressão numérica pelo método dos mínimos quadrados (MMQ), gerando tanto modelos lineares quanto não lineares.

É usual estimar a incerteza da curva de calibração analítica desconsiderando o efeito das incertezas dos padrões usados para preparar a curva, chamados usualmente de pontos de curva. Essa prática baseia-se na hipótese de que a variabilidade do sinal analítico em geral é muito maior que a incerteza dos pontos de curva de calibração (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2008a; ELLISON; WILLIAMS, 2012).

Essa simplificação é válida frequentemente e matematicamente conveniente, porém a hipótese deixará de ser válida quando a relação entre a incerteza dos padrões e a variabilidade de sinal analítico for suficientemente grande.

Neste trabalho, avaliamos o impacto de ignorar as incertezas dos padrões ao realizar a estimativa da incerteza devida à curva de calibração analítica, utilizando os dados do conhecido Exemplo A5 do Guia Eurachem CITAC (ELLISON; WILLIAMS, 2012).

2 Procedimento Metodológico

A estimativa da incerteza de uma curva de calibração analítica depende de algumas fontes bem conhecidas, sendo as mais importantes, conforme Ellison e Williams (2012):

- a. variabilidade aleatória no sinal analítico;
- b. incerteza no modelo matemático utilizado para descrever a curva de calibração;
- c. incerteza das concentrações dos padrões (pontos de curva);
- d. incertezas da preparação dos padrões.

2.1 Estimativa sem as incertezas dos padrões

A incerteza da curva de calibração é estimada utilizando-se a variância de predição do modelo matemático utilizado na regressão, técnica recomendada pelo Guia Eurachem CITAC (ELLISON; WILLIAMS, 2012) e pelo ISO GUM (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2008a).

A curva analítica linear representada pela **Equação 1**, pode ser obtida pelo MMQ utilizando j repetições de leituras das intensidades para cada uma das i concentrações dos padrões:

$$I(C) = a + bC \quad (1)$$

Onde:

I = intensidade do sinal;

C = concentração (mg/L);

a = intercepto;

b = inclinação.

Então, a incerteza padrão da determinação da concentração de uma amostra desconhecida, C_x , que foi obtida utilizando a curva analítica em p repetições pode ser estimada pela **Equação 2**:

$$u(C_x) = \frac{s}{b} \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_x - \bar{C})^2}{\sum_{i=1}^n (C_i - \bar{C})^2}\right)} \quad (2)$$

Sendo s calculado pela **Equação 3**:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (I_j - (a + bC_j))^2}{n-2}} \quad (3)$$

Onde:

C_x = concentração da amostra x (mg/L);

$u(C_x)$ = incerteza padrão da concentração da amostra x (mg/L);

S = desvio padrão residual (mg/L);

$\bar{C}$ = média geral das concentrações dos padrões (mg/L);

c_i = concentração do padrão i (mg/L);

p = número de medições para determinar C_x ;

n = número de medições para realizar a calibração;

I_j = intensidade do sinal na leitura j .

A incerteza expandida da concentração de uma amostra desconhecida, C_x , pode ser estimada pela **Equação 4**:

$$U(C_x) = k \cdot \frac{s}{b} \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_x - \bar{C})^2}{\sum_{i=1}^n (C_i - \bar{C})^2}\right)} \quad (4)$$

Onde:

$U(C_x)$ = incerteza expandida da concentração da amostra x (mg/L);

k = fator de abrangência.

Esta abordagem é simples, porém só inclui as incertezas a) e b) do item 2, faltando as incertezas das concentrações dos padrões e as incertezas de preparação dos mesmos padrões.

2.2 Estimativa incluindo incertezas dos padrões

Para obter uma estimativa de incertezas mais completa, é necessário assumir que além da variabilidade experimental do sinal analítico, as concentrações dos pontos de curva não são valores exatos, possuindo incertezas. Desta forma, não é possível utilizar o MMQ para encontrar o modelo matemático da curva analítica, por este não ser capaz de resolver este problema (DANZER, 2007).

Há alternativas, por exemplo, o método dos Mínimos Quadrados Ortogonais ou OLS (do inglês *Orthogonal Least Squares*), a Regressão por Componentes Principais ou PCR (do inglês *Principal Component Regression*) e a simulação de Monte Carlo ou MCS (do inglês *Monte Carlo Simulation*). OLS e PCR são técnicas matematicamente mais complexas (BESALÚ; JULIAN-ORTIZ; POGLIANI, 2010) e teoricamente resolvem este problema, mas na prática dependem de aproximações (WALD, 1940; MANDEL, 1984; SHARAF; ILLMAN; KOWALSKI, 1986; DANZER, WAGNER; FISCHBACHER, 1995).

A simulação pelo método de Monte Carlo (MCS) é uma alternativa que tem sido utilizada mais frequentemente, tendo sido empregada há bastante tempo (COX; HARRIS; SIEBERT, 2003), inclusive no suplemento do ISO GUM de 2008 (ISO/IEC Guide 98-3:2008 / Supplement 1; 2008b) e na edição mais recente do Guia Eurachem CITAC (ELLISON; WILLIAMS, 2012).

Os princípios básicos da simulação de Monte Carlo podem ser revisados em textos como, por exemplo, de Sobol (1994), Kalos e Whitlock (2004) ou Thomopoulos (2013). Destaca-se que já foram feitos esforços com o objetivo de prover especificações técnicas para o software empregado na avaliação de incertezas utilizando a simulação de Monte Carlo (COX; HARRIS, 2008). Basicamente, utilizam-se valores simulados de sinal analítico e de concentrações, considerando valores e desvios padrão experimentais e, assumem-se distribuições de probabilidade adequadas. O MCS gera grandes conjuntos de números simulados que podem ser coletados e analisados para estudo estatístico.

Neste trabalho, foi realizada a estimativa de incertezas empregando a Simulação de Monte Carlo (MCS), considerando sua simplicidade e exatidão. A **Figura 1** ilustra o MCS sendo utilizado. O método gera pontos sinal $\times$ concentração com as distribuições especificadas. Os pontos permitem traçar curvas de calibração (retas coloridas) pelo MMQ. Um número de intensidades de sinal (amostras simuladas) é gerado e as concentrações são calculadas pelas equações das curvas. O processo continua por vários ciclos e, no final, é produzida uma base de dados estatísticos de concentrações e sinais que permitem estimar as incertezas para diferentes níveis de concentração.

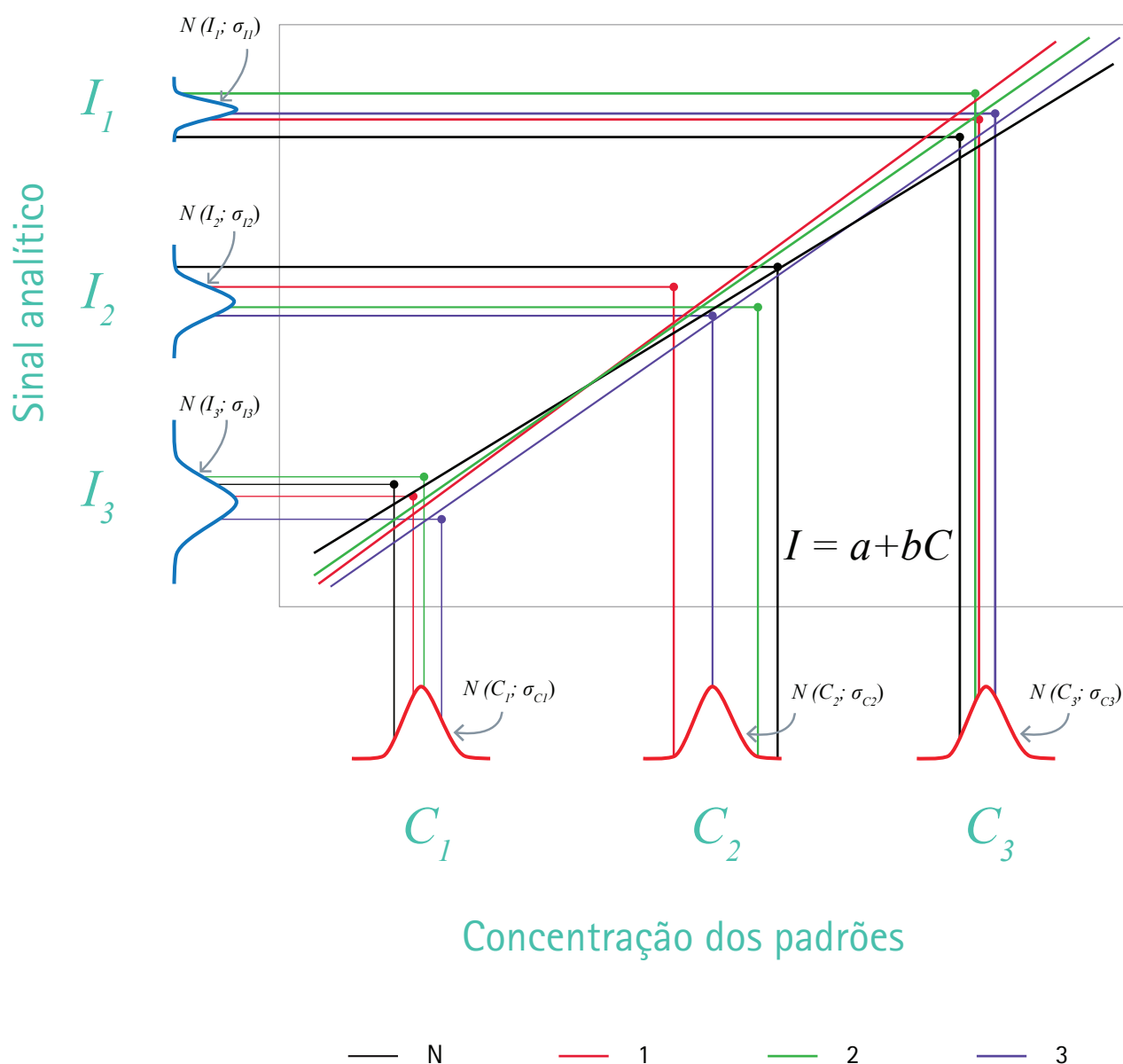


Figura 1 – Algumas curvas de calibração analítica geradas pela simulação MCS.

Fonte: elaborado pelo autor.

2.3 Estudo de caso

O ponto de partida desta simulação foi o conjunto de dados da curva de calibração apresentada no Exemplo A5 do Guia EURACHEM/CITAC, utilizada para a determinação de cádmio lixiviado de um material cerâmico, por espectrometria de absorção atômica.

No exemplo, foram preparados gravimetricamente cinco padrões de curva, os quais foram lidos três vezes, para o estabelecimento de uma curva de calibração. Os dados e resultados das leituras são apresentados na **Tabela 1**:

Tabela 1 – Dados experimentais do Exemplo A5 do Guia Eurachem/CITAC.

Concentração de Cd (mg/L)	Leituras de intensidades (adimensional)		
	1	2	3
0,1	0,028	0,029	0,029
0,3	0,084	0,083	0,081
0,5	0,135	0,131	0,133
0,7	0,180	0,181	0,183
0,9	0,215	0,230	0,216

Fonte: elaborado pelo autor.

Além destes dados experimentais, são incluídas incertezas dos padrões na forma de diferentes porcentagens das concentrações dos padrões. No modelo são estabelecidas as incertezas dos pontos de curva ($u_{padrões}$) numericamente iguais a 0,01 %; 0,5 %; 1 %, 2 % e 5 % das concentrações dos padrões ($c_{padrões}$). O estabelecimento das incertezas como porcentagens dos valores é uma convenção que foi adotada neste trabalho por conveniência e simplicidade de análise dos resultados obtidos por simulação.

A qualidade do processo de simulação depende de alguns fatores, entre eles a escolha de distribuições realistas para as variáveis simuladas, o tratamento dos erros de arredondamento, a aleatoriedade dos valores gerados e o número de repetições escolhido. Neste trabalho, foi utilizado o software Excel 2010, com distribuições normais para todas as variáveis simuladas, e o processo deve ser repetido ao menos 50 000 vezes. A **Figura 2** ilustra o processo de simulação utilizado neste trabalho.

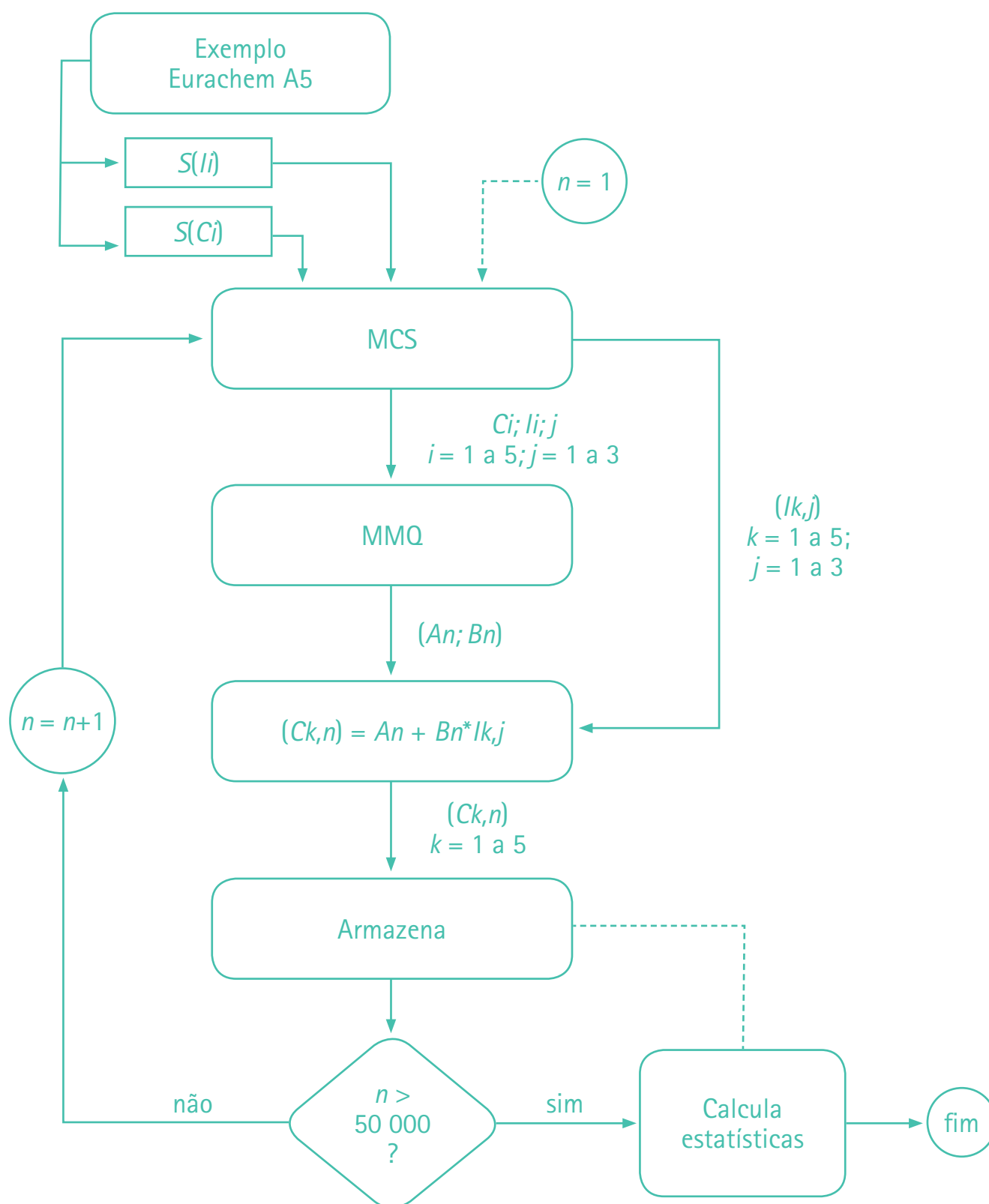


Figura 2 – Fluxograma da simulação do problema da incerteza das curvas de calibração pelo método de Monte Carlo.

Fonte: elaborado pelo autor.

3 Resultados e discussão

Foram feitas estimativas de incertezas das curvas de calibração tanto pelo método convencional, sem incluir incertezas dos padrões, quanto por simulação MCS, incluindo as incertezas dos padrões em alguns níveis.

3.1 Estimativa convencional

A curva de calibração analítica dos dados do Exemplo A5 do Guia Eurachem CITAC, obtida pelo MMQ entre as intensidades e as concentrações resulta na **Equação 5**:

$$I = 0,0087 + 0,2410 \cdot C \quad (5)$$

As estimativas de incertezas convencionais devidas às curvas de calibração para os resultados de concentração foram calculadas considerando-se três repetições, com fator de abrangência 2. Utilizando a **Equação 4**, é possível calcular a incerteza expandida da concentração C_x utilizando a **Equação 6**:

$$U(C_x) = 2 \cdot \frac{0,005486}{0,241} \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{3} + \frac{1}{15} + \frac{(C_x - 0,5)^2}{1,237}\right)} \quad (6)$$

Na **Tabela 2** apresentamos os cálculos de incertezas expandidas para cinco níveis de concentração, no caso os mesmos níveis dos padrões, por simplicidade.

Tabela 2 – Estimativas de incertezas convencionais. Desconsidera incertezas de padrões.

C (mg/L)	uc (mg/L)	Uc (95 %) (mg/L)	Uc/C (%)
0,100	0,017	0,033	33,1
0,300	0,015	0,030	10,0
0,500	0,014	0,029	5,8
0,700	0,015	0,030	4,3
0,900	0,017	0,033	3,7

Fonte: elaborado pelo autor.

3.2 Estimativa incluindo incertezas dos pontos de curva

Para realizar a estimativa das incertezas devidas à curva de calibração incluindo as incertezas devidas aos padrões, foram feitas simulações pelo método de Monte Carlo (**Tabelas de 3 a 7**). A simulação considerou todas as distribuições dos valores de entrada como gaussianas, com seus desvios padrão característicos. A simulação foi realizada com 50 000 repetições das variáveis do modelo.

Tabela 3 – Estimativas de incertezas por MCS ($u_{\text{padrões}} = 0,01 \% c_{\text{padrões}}$).

C (mg/L)	uc (mg/L)	Uc (95 %) (mg/L)	Uc/C (%)
0,100	0,005	0,010	10,3
0,300	0,005	0,009	3,0
0,500	0,007	0,014	2,8
0,700	0,010	0,020	2,8
0,900	0,027	0,052	5,8

Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 4 – Estimativas de incertezas por MCS ($u_{\text{padrões}} = 0,5 \% c_{\text{padrões}}$).

C (mg/L)	uc (mg/L)	Uc (95 %) (mg/L)	Uc/C (%)
0,100	0,005	0,011	10,7
0,300	0,005	0,009	3,0
0,500	0,007	0,014	2,9
0,700	0,010	0,020	2,9
0,900	0,027	0,053	5,9

Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 5 – Estimativas de incertezas MCS ($u_{padrões} = 1 \% c_{padrões}$).

C (mg/L)	uc (mg/L)	Uc (95 %) (mg/L)	Uc/C (%)
0,100	0,006	0,012	11,6
0,300	0,005	0,009	3,1
0,500	0,008	0,015	3,0
0,700	0,011	0,022	3,1
0,900	0,027	0,054	5,9

Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 6 – Estimativas de incertezas por MCS ($u_{padrões} = 2 \% c_{padrões}$).

C (mg/L)	uc (mg/L)	Uc (95 %) (mg/L)	Uc/C (%)
0,100	0,007	0,015	14,7
0,300	0,006	0,011	3,6
0,500	0,009	0,017	3,5
0,700	0,013	0,026	3,7
0,900	0,029	0,057	6,4

Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 7 – Estimativas de incertezas por MCS ($u_{padrões} = 5 \% c_{padrões}$).

C (mg/L)	uc (mg/L)	Uc (95 %) (mg/L)	Uc/C (%)
0,100	0,014	0,028	28,2
0,300	0,009	0,018	6,2
0,500	0,015	0,029	5,8
0,700	0,024	0,047	6,7
0,900	0,041	0,081	9,0

Fonte: elaborado pelo autor.

Observou-se adicionalmente que em todos os casos estudados as distribuições de concentrações obtidas pelo método de Monte Carlo se apresentaram de acordo com distribuições gaussianas e, portanto, simétricas.

3.3 Discussão

Na **Figura 3**, são apresentadas as incertezas expandidas devidas à curva de calibração obtida tanto pelo método convencional (ISO GUM ou Eurachem-CITAC) quanto pela simulação Monte Carlo, considerando incertezas dos padrões entre 0 % e 5 % das concentrações dos padrões.

Observa-se que a estimativa de incerteza da curva pelo GUM é maior que as estimativas por MCS nas concentrações baixas e médias, sendo superada nas concentrações mais altas. Além disso, as estimativas pelo GUM variam menos com as concentrações do que as pelo MCS. Observa-se também que a incerteza MCS aumenta fortemente de 2 % para 5 % em todas as concentrações.

Comparando-se a incerteza GUM com a MCS em 0 %, ambas supondo ausência da incerteza dos padrões, percebe-se que a estimativa GUM é exagerada em 80 % das concentrações.

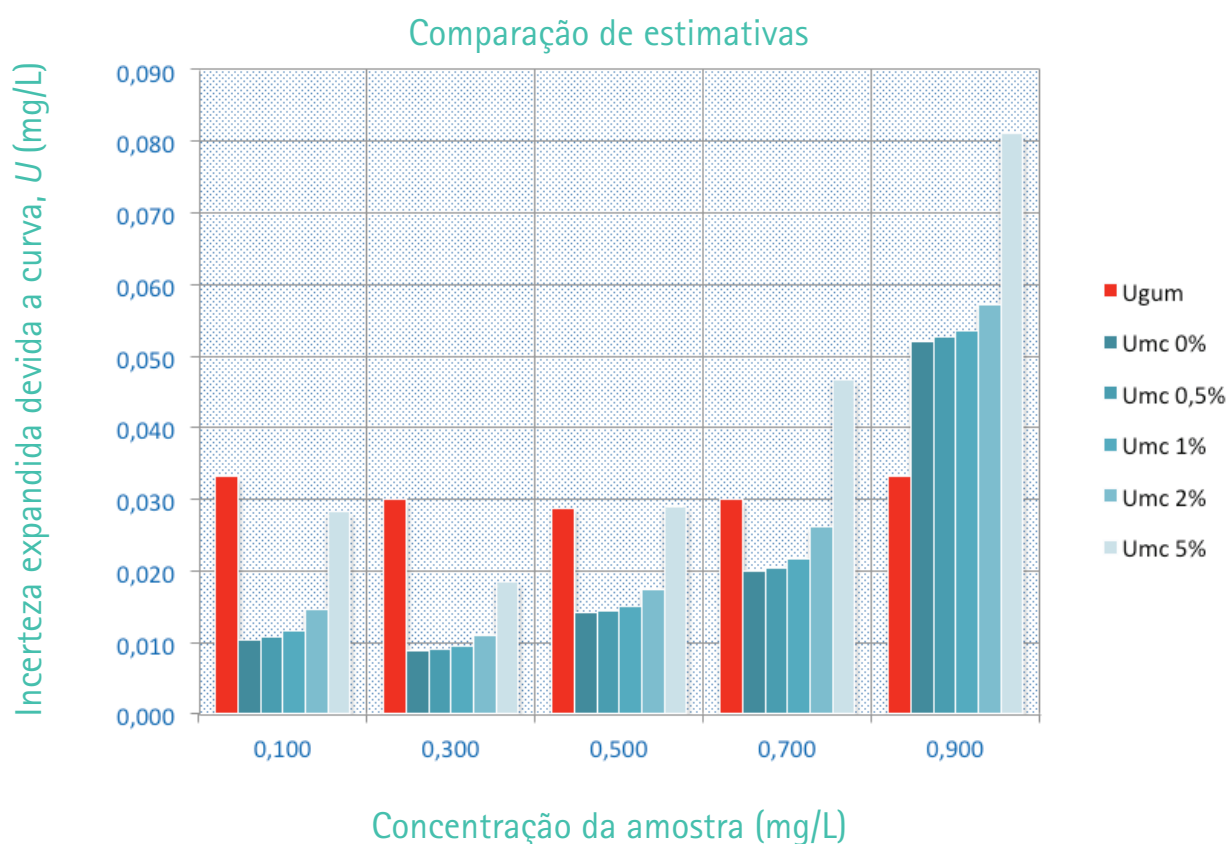


Figura 3 – Comparativo de estimativas das incertezas expandidas devidas à curva de calibração.

Fonte: elaborado pelo autor.

Se fizermos um cálculo da relação entre as incertezas pelo GUM e pelo MCS, em função das incertezas dos padrões e das concentrações é possível ver as regiões onde o GUM gera estimativas maiores que a realidade (pessimistas) e estimativas menores que a realidade (otimistas). A **Figura 4** apresenta esta informação para os dados deste estudo apenas. Nessa figura, a região azul mostra estimativas pessimistas da incerteza devida à curva de calibração produzida pelo GUM. A região vermelha mostra a região otimista demais, ou seja, o GUM estima incertezas menores que a realidade. A região branca é a mais realista.

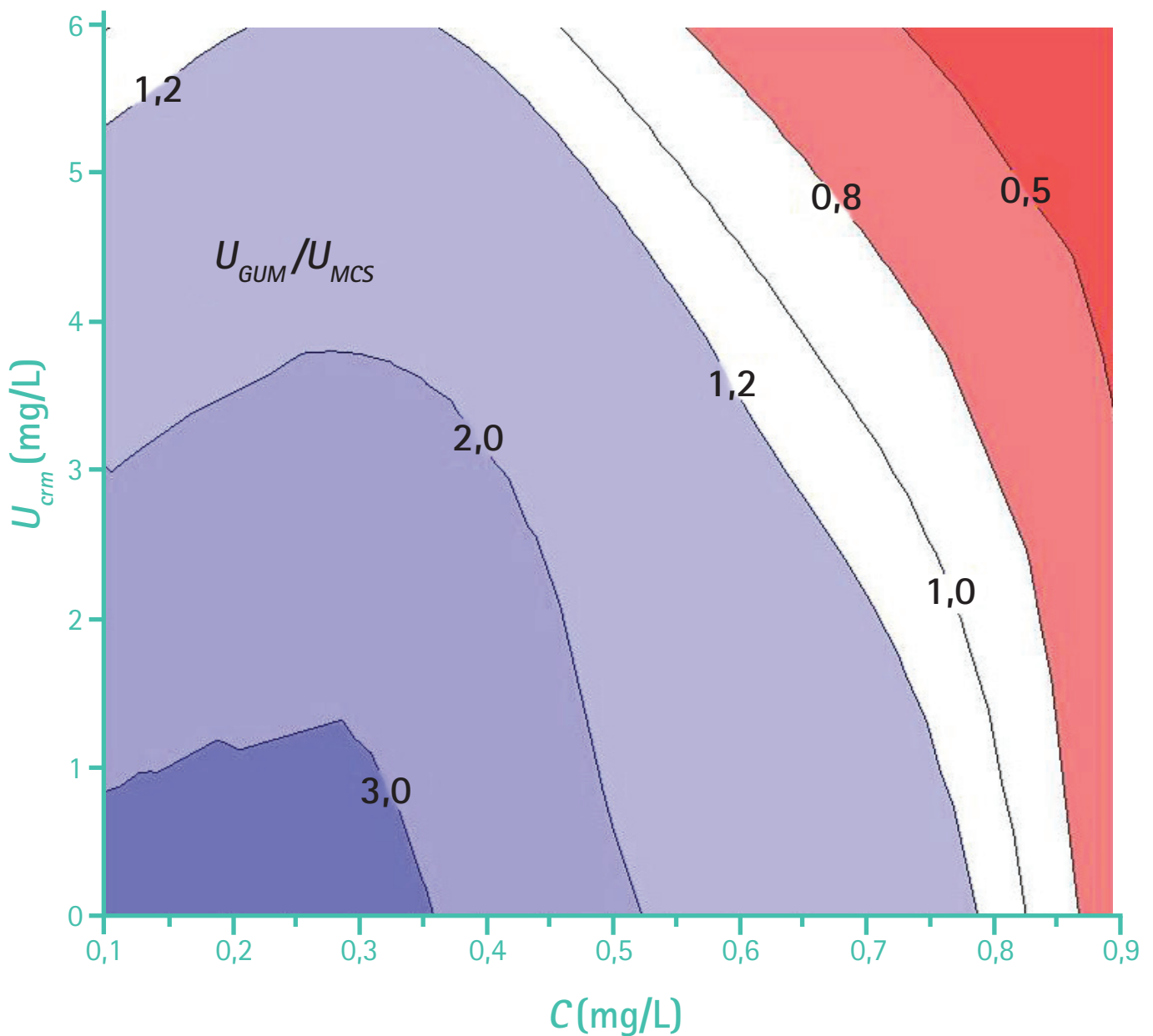


Figura 4 – Mapeamento da relação entre a incerteza pelo ISO GUM e por simulação de Monte Carlo.
Fonte: elaborado pelo autor.

4 Conclusões

Para o exemplo estudado, é possível concluir que o uso da estimativa de incerteza da curva de calibração analítica pelo modelo do ISO GUM, ou do Eurachem/CITAC, assumindo a hipótese de ausência de incertezas nos padrões, gera resultados maiores que os simulados (mais realistas) em cerca de 60 % dos casos. Para concentrações mais altas, e quando a incerteza dos padrões também é mais alta, a estimativa GUM apresenta-se menor que a simulada.

O uso de estimativas de incerteza maiores que as reais muitas vezes é entendido como uma prática segura, do ponto de vista do laboratório que gera os resultados de análise, porque prevê uma faixa de variabilidade maior ao redor dos valores obtidos. Por outro lado, estes valores com maior incerteza são também metrologicamente mais pobres, por terem menor resolução, digamos assim, sendo menos úteis para uma boa caracterização de materiais, para decidir sobre atendimento de especificações, para verificar o cumprimento de limites legais, etc.

5 Referências

- BESALÚ, E.; JULIÁN-ORTIZ, J. V.; POGLIANI, L. Ordinary and orthogonal regressions in QSAR/QSPR and chemistry-related studies. **MATCH Communications in Mathematical Computer Chemistry**, v. 63, p. 576-583, 2010.
- COX, M. G., P. HARRIS and B. R. L. SIEBERT. Evaluation of measurement uncertainty based on the propagation of distributions using Monte Carlo simulation. **Measurement Techniques**, v. 46, n. 9, p. 824-833, 2003.
- COX, M. G., P. M. HARRIS. **Software specifications for uncertainty evaluation**. Teddington: National Physical Laboratory, Sept. 2006; Revised/corrected Nov. 2008. (NPL Report DEM-ES-010; CMSC 40/04 revised).
- DANZER, K.; WAGNER, M.; FISCHBACHER, C. Calibration by orthogonal and common least squares - theoretical and practical aspects. **Fresenius Journal on Analytical Chemistry**, v. 352, n. 5, p. 407-412, 1995.
- DANZER, K. **Analytical chemistry: theoretical and metrological fundamentals**. Berlin: Springer, 2007. 315 p. ISBN 3540359885.
- ELLISON, S. L. R.; WILLIAMS, A. (Eds). **Eurachem/CITAC Guide: quantifying uncertainty in analytical measurement**. 3. ed. London: Eurachem, 2012. ISBN 978-0-948926-30-3.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO/IEC Guide 98-3:2008 (JCGM/WG1/100) Uncertainty of measurement – Part 3: Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM:1995 with minor corrections)**. Geneve, 2008a. 120 p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO/IEC Guide 98-3:2008/Suppl 1:2008 (JCGM/WG1/101)**: Propagation of distributions using a Monte Carlo method. Geneve, 2008b. 88 p.

KALOS, M. H.; WHITLOCK, P. A. **Monte Carlo methods**. New York: Wiley, 2004. 195 p. ISBN-10: 0-471-89839-2.

MANDEL, J. Fitting straight lines when both variables are subject to error. **Journal of Quality Technology**, v. 16, n. 1, p. 1-14, 1984.

SHARAF, M. A.; ILLMAN, D. L.; KOWALSKI, B. R. **Chemometrics**. New York: Wiley, 1986. 332 p.

SOBOL, I. M. **A Primer for Monte Carlo Method**. Boca Raton: CRC Press, 1994. 126 p. ISBN 0-8493-8673-X

THOMOPOULOS, N.T. **Essentials of Monte Carlo Simulation: Statistical Methods for Building Simulation Models**. New York: Springer, 2013. 174 p. DOI 10.1007/978-1-4614-6022-0

WALD, A. The fitting of straight lines if both variables are subject to error. **Annual Mathematical Statistics**, v. 11, n. 3, p. 284-300, 1940.