

6 Estudos de incerteza

O resultado de uma medição não pode ser caracterizado por um único valor, pois todo o processo possui fontes de incerteza que devem ser identificadas, quantificadas e, se possível, minimizadas. A fim de garantir que a informação obtida de uma medição seja real, a estimativa da incerteza é crucial para permitir resultados verdadeiros. As incertezas podem ser obtidas da análise estatística de observações experimentais ou de certificados de calibração, dados de referência, especificações de material fornecido e do conhecimento geral dos procedimentos e técnicas analíticas.

Sendo assim, o objetivo dessa parte do trabalho foi o de estudar as fontes de incerteza de medição de sinal associados às técnicas luminescentes (fluorimetria e fosforimetria em temperatura ambiente e substrato sólido), quantificar a contribuição dessas fontes, estimar as incertezas combinadas e expandidas e avaliar estratégias para minimização desses valores.

6.1 Fontes de incerteza

O procedimento para a estimativa da incerteza descrita no Guia para a Expressão da Incerteza na Medição (GUM) é baseado em uma relação entre as quantidades medidas (x) e os resultados das medições (y), sob a forma $y = f(x)$, conforme indicado na Equação 21^{131, 132}:

$$u^2(y) = \sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial y}{\partial x_i}\right)^2 u^2(x_i) + 2 \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=1}^n \left(\frac{\partial y}{\partial x_i} \frac{\partial y}{\partial x_j}\right) \text{cov}(x_i, x_j) \quad (21)$$

onde $\partial y/\partial x_i$ são coeficientes de sensibilidade em relação a cada fonte de incerteza e os valores $u^2(x_j)$ são as variâncias associadas a cada uma das fontes.

Considerando que todos os parâmetros que contribuem para a medição são independentes (covariância nula para os diferentes valores de entrada), a

incerteza combinada, $u(y)$, é, então, avaliada de acordo com princípios de propagação de erro (Equação 22):

$$u(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial y}{\partial x_i} \right)^2 u^2(x_i)} \quad (22)$$

O GUM¹³³ recomenda a expressão da incerteza do resultado medido como um intervalo de confiança em algum nível de probabilidade. A incerteza expandida $U(y)$ é a metade de largura deste intervalo, $u(y)$, multiplicada por um factor k , que é, em muitos casos, um valor t de Student tabelado (a um determinado nível de probabilidade).

A primeira etapa deste estudo foi o de definir e identificar as principais fontes de incerteza envolvidas na medição fotoluminescente. Em uma segunda etapa, essas fontes foram quantificadas e combinadas. Essas fontes de incerteza foram então divididas em quatro grupos diferentes: (i) repetitividade, (ii) reprodutibilidade interna, (iii) curva analítica e (iv) preparação de soluções, as quais são chamadas de padrão quando são provenientes de analitos e críticas para aquelas que são coadjuvantes utilizadas na fosforimetria (soluções de sal de átomo pesado e de surfactante). Dentro destes quatro grupos principais, outras fontes específicas são identificadas, como pode ser visto no diagrama de causa e efeito para as medições fluorimétricas e por fosforimetria em temperatura ambiente e substrato sólido.

O diagrama de causa e efeito representa a resposta analítica do mensurando (criseno, neste caso) no vetor principal da Figura 81, bem como a contribuição de diferentes fatores nas ramificações (separadas em quatro grupos acima indicados). Uma vez identificadas as fontes de incerteza e seus respectivos valores, as incertezas combinada e expandida para as medições envolvidas nos dois métodos luminescentes (fluorimetria e SSRTP) podem ser calculadas. A incerteza combinada (u_c) é a raiz quadrada da soma quadrática das fontes de incerteza individuais, considerando que todos os quatro grupos que contribuem para a variabilidade da medição são independentes uns dos outros. Se uma dessas fontes contribui mais significativamente para a incerteza do que as outras, será a única que irá controlar a incerteza global do processo e, portanto, um dos que devem ser estudados a fim de melhorar a qualidade da medição. A estimativa dos valores das incertezas associadas aos quatro diferentes grupos de fontes de incerteza que influenciam na medição

luminescente estão listados na Tabela 40. As respectivas incertezas combinada e expandida também estão listadas na mesma Tabela 40.

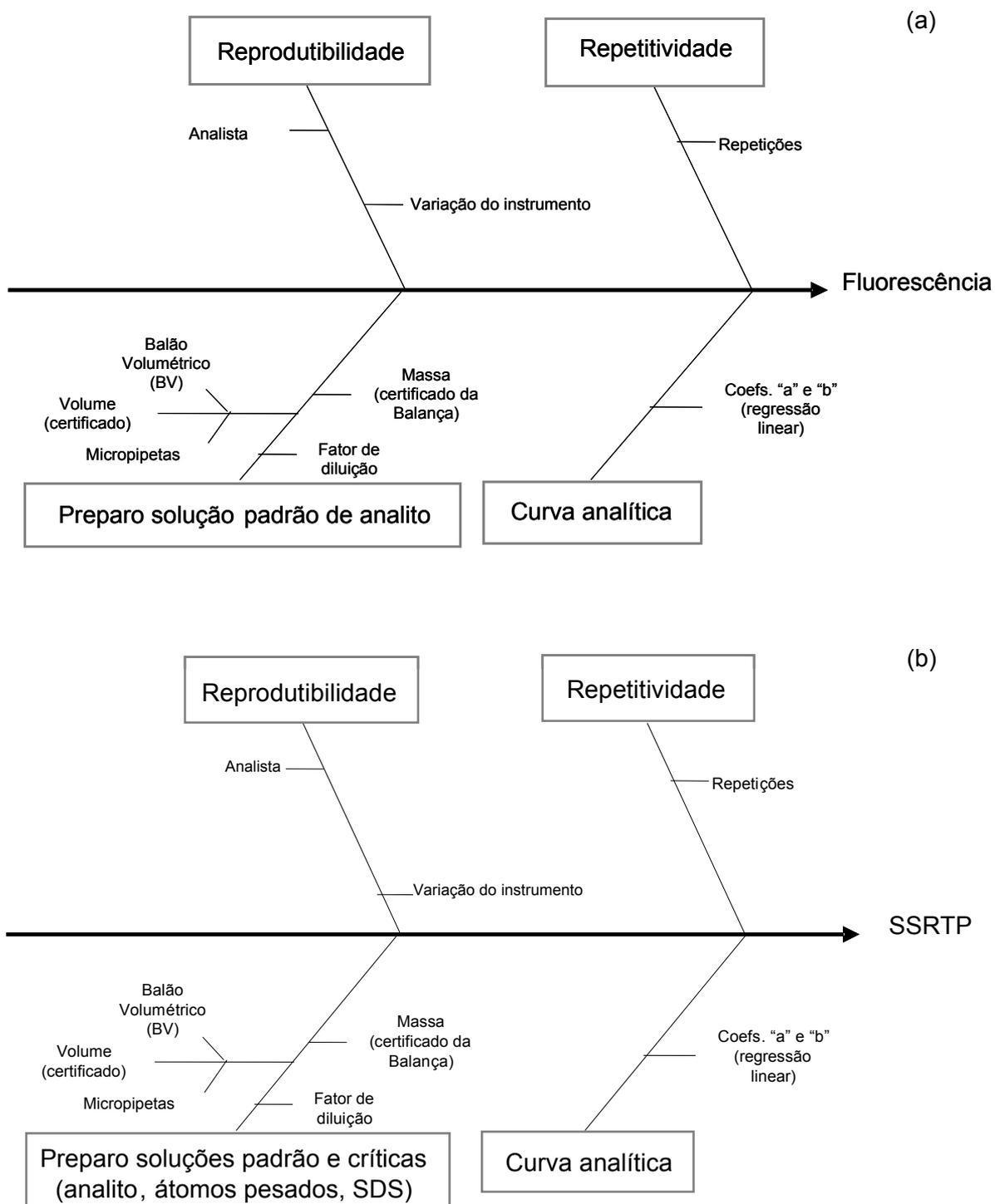


Figura 81: Diagrama de causa e efeito para (a) fluorimetria e (b) fosforimetria em temperatura ambiente e substrato sólido.

6.1.1 Incerteza associada à repetitividade (u_r)

A incerteza associada à repetitividade na determinação do criseno foi obtida utilizando o desvio-padrão (s_r) de dez medições consecutivas e nas mesmas condições experimentais de uma solução padrão deste analito. A fluorescência foi medida a partir de uma solução $1 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e as medições foram feitas através da substituição da solução medida por um novo volume tirado da mesma solução padrão adicionada à mesma cubeta. No caso da fosforescência, 11,4 ng de criseno (5 μL de uma solução de analito $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ adicionado ao substrato sólido) foram medidos. A fosforescência desta única solução foi medida consecutivamente. É importante ressaltar que apenas um substrato foi utilizado para estas medições de fosforescência uma vez que as medições utilizando diferentes substratos não iriam caracterizar o conceito de repetitividade devido à não-homogeneidade dos substratos em termos de sinal de fundo e pequenas variações na posição do analito frente à incidência de radiação de excitação (centro do substrato onde o analito é adicionado) para cada um dos substratos.

Em geral, o desvio padrão relativo (RSD) de medições consecutivas de fluorescência de soluções não ultrapassa 5%. Para a fosforimetria em temperatura ambiente (RTP), RSD com valores de até 20% podem ser esperados para as medições de sinal da mesma solução de analito adicionada em diferentes substratos. No entanto, esses valores podem ser menores dependendo da qualidade do papel de filtro (grau de variação do sinal de fundo do substrato) e da capacidade do analista em adicionar as soluções críticas nos diferentes substratos. Neste experimento utilizando sucessivas medições de fosforescência de soluções de criseno presentes em apenas um substrato, um valor de 6% para o RSD foi alcançado, enquanto que o RSD de medições de fluorescência de soluções de criseno foi de 2%. A repetitividade por SSRTP vista na Tabela 40 foi cerca de três ordens de grandeza superior à do método fluorimétrico em termos de concentração (mol L^{-1}). Esta diferença é esperada uma vez que a concentração das soluções utilizadas nestes experimentos (baseada na exigência característica de cada uma das técnicas) também difere em três ordens de grandeza.

6.1.2 Incerteza associada à reprodutibilidade interna (u_R).

A incerteza associada à reprodutibilidade na determinação do críseno foi obtida através de experimentos semelhantes aos realizados para a obtenção de repetitividade, porém utilizando dois conjuntos de dez medições ($n = 10$) para cada uma das técnicas fotoluminescentes. Cada conjunto de medições foi feito por um analista diferente (para SS RTP, dois grupos de 10 substratos para cada analista foram usados para uma mesma amostra). Foi então aplicado o teste de hipótese com comparação de médias entre os analistas. Como ferramenta de apoio, foi utilizado o programa do Excel (Microsoft Office), conforme descrito: ferramentas\análise de dados\ANOVA:fator único. A estimativa da incerteza da reprodutibilidade foi calculada pela soma dos quadrados dos desvios da repetitividade de cada analista " s_r " e entre os analistas " s_{entre} ", conforme Equações 23, 24 e 25 a seguir:

$$s_{entre}^2 = (MQ_{entre} - MQ_{dentro}) / n \quad (23)$$

$$s_r^2 = MQ_{dentro} \quad (24)$$

$$s_R^2 = (s_r^2 + s_{entre}^2) \quad (25)$$

" MQ_{entre} " é a soma dos mínimos quadrados entre os analistas, " MQ_{dentro} " é a soma dos mínimos quadrados de cada analista e " n " o número de replicatas (10, neste caso).

A incerteza associada à reprodutibilidade foi então calculada como:

$$u_R = \sqrt{s_R^2} \quad (26)$$

Avaliando os valores na Tabela 40, a reprodutibilidade interna foi ligeiramente superior aos valores de repetitividade obtidos por meio de fluorescência, indicando que o impacto da mudança de analistas não é relevante e, portanto, s_{entre} é muito baixa. Para SS RTP, u_R foi dez vezes superior a u_r indicando que, mesmo usando dois analistas qualificados e com comprovada

experiência em lidar com a análise da amostra em substratos sólidos, uma relevante dispersão dos resultados ainda é observada. Essa dispersão é proveniente da adição das soluções críticas no centro dos substratos sólidos e do posicionamento destes substratos no acessório para medição de substrato sólido antes das medições. Como o intervalo de tempo entre as medições feitas por cada um dos analistas era pequeno, o impacto das variações no instrumento (por exemplo, radiação de excitação, resposta do detector e, no caso de SSRTP, o tempo de purga e o fluxo de gás N₂ sobre o substrato) não foi considerado relevante.

6.1.3

Incerteza associada ao preparo das soluções (u_s).

A incerteza associada à preparação das soluções foi primeiramente avaliada através do preparo das soluções padrão através de ajuste de volume. No caso da fosforimetria, uma vez estabelecidas as condições robustas para induzir fosforescência usando sais de átomos pesados e surfactante, a influência de pequenas variações das massas de AgNO₃ e SDS no substrato pode ser ignorada. Em outras palavras, para a RTP, de todas as soluções, a única a ser considerada é a solução padrão do analito. Neste caso, as incertezas dos balões volumétricos (u_{vf}), em L, da balança (u_{bal}), em g, e das micropipetas (u_{mp}), em L, devem ser levados em consideração para obter o valor final de u_s , tal como indicado na Equação 27 abaixo, onde $u(x) = U(x)/k$ e $k = 2$:

$$u_s = \sqrt{(u_{vf})^2 + (u_{bal})^2 + (u_{mp})^2} \quad (27)$$

As variações de volume devido à oscilações de temperatura foram consideradas insignificantes, portanto, os valores u_{vf} e u_{mp} foram obtidos a partir de incertezas expandidas dos certificados de calibração dos aparatos volumétricos, U_{vf}/k e U_{mp}/k , onde $k = 2$. A pesagem do analito foi feita por diferença (massa_(balão volumétrico + analito) - massa_(balão volumétrico)) e, portanto, $u_{bal} = (u_{bal}'^2 + u_{bal}''^2)^{1/2}$, onde u_{bal}' e u_{bal}'' "são contribuições de cada etapa do procedimento de pesagem. As unidades para estes valores de incerteza (u_{vf} , u_{bal} e u_{mp}), devem ser convertidas em concentração (mol L⁻¹), a fim de se calcular a soma quadrática final para se obter a incerteza combinada. Essa transformação foi feita através da multiplicação do valor da incerteza, em massa ou em volume,

pelos coeficientes de sensibilidade ($\partial C/\partial m$ e $\partial C/\partial V$) onde $C = m/(MM \times V)$, $\partial C/\partial m = 1/(MM \times V)$ e $\partial C/\partial V = -m/(MM \times V^2)$ onde MM foi a massa molar do criseno em g mol^{-1} , m é a massa do criseno em gramas e V é o volume de solução em L.

A partir do valor calculado de u_s para a medição fluorimétrica ($7,69 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$), pode ser visto claramente que esta fonte tem o maior impacto sobre a incerteza combinada (u_c), sendo três ordens de grandeza superior à contribuição das outras fontes (Figura 82a). Este resultado indica que qualquer esforço feito para reduzir u_s teria um impacto significativo sobre a incerteza combinada no caso da fluorimetria. Em contrapartida, para SS RTP, o valor u_s era cerca da metade do valor da fonte de maior impacto (u_R) e, portanto, tem uma contribuição relativamente pequena na u_c para a medição fosforimétrica ($3,66 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), como pode ser visto na Figura 82b. Das quatro fontes de incerteza, a u_s é claramente uma das mais fáceis de ser melhorada, uma vez que as soluções podem ser preparadas pelo ajuste de massas ao invés de ser pelo ajuste de volume. A maior precisão de medição das massas de soluto e solvente deve ter um impacto maior na incerteza combinada da medição da fluorescência e praticamente nenhum impacto sobre as medições feitas por SS RTP.

Um novo cálculo da incerteza combinada para a medição fluorescente foi feito após o preparo das soluções por ajuste de massa, através da Equação 28:

$$u_s = (u_{m(\text{analito})}^2 + u_{m(\text{final_solução})}^2)^{1/2} \quad (28)$$

onde $u_{m(\text{analito})}^2$ foi a incerteza da massa de analito pesada e $u_{m(\text{final_solução})}^2$ foi a incerteza da massa da solução final (analito mais o sistema de solventes). Estes valores, em unidade de massa, foram retirados do certificado de calibração da balança ($k=2$, 95,45%). Como já descrito, o valor de u_s deve ser convertido em concentração (mol L^{-1}) para que o cálculo da soma quadrática para a incerteza combinada possa ser feito. A redução de u_s , neste caso, foi de quase quatro ordens de magnitude, como pode ser visto na Tabela 40. Neste caso, a influência da u_s passou a ser a que causou menor impacto na u_c , a qual tem agora um valor de $4,38 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$). Este valor de u_c é significativamente menor que o encontrado usando soluções de analito preparadas por medidas de volume.

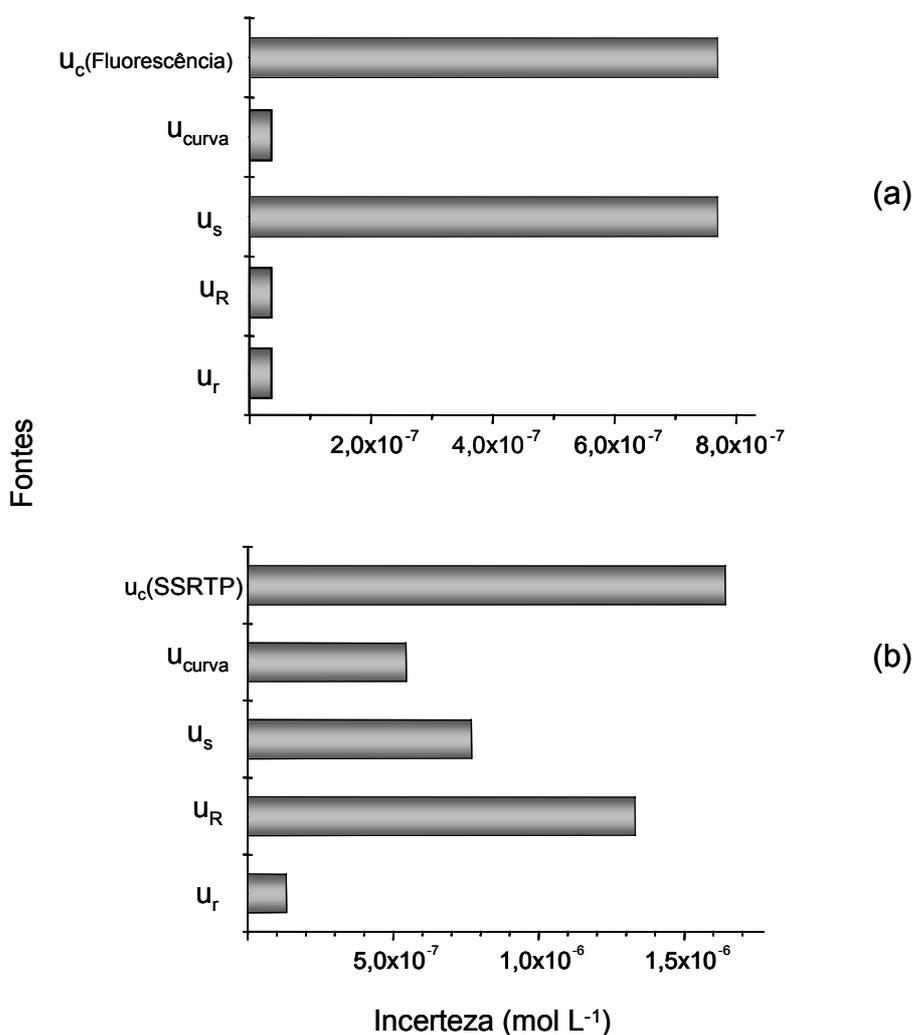


Figura 82: Contribuição relativa das fontes de incerteza na incerteza combinada (u_c) de medições luminescentes de criseno usando: (a) fluorimetria empregando solução de analito por avolumação e (b) fosforimetria em temperatura ambiente. Fontes: u_{curva} (curva analítica); u_s (preparo de soluções); u_R (reprodutibilidade interna); u_r (repetitividade).

6.1.4 Incerteza associada à curva analítica (u_{curva})

A fim de se obter a incerteza associada à curva analítica (usando uma curva analítica de quatro pontos dentro de sua faixa de resposta linear), os sinais fluorescentes ou fosforescentes do criseno foram medidos em triplicatas (para cada concentração, as medições eram feitas usando a mesma solução para a fluorimetria e o mesmo substrato contendo o analito para SSRTP). Para fluorimetria, quatro soluções de criseno em concentrações crescentes foram

preparadas e medidas diretamente na cubeta. Para RTP, o sinal foi medido usando papel de filtro contendo 5 μL de solução de criseno em concentrações crescentes. A partir das concentrações e de seus respectivos sinais luminescentes, o desvio padrão para o coeficiente angular (m) e o linear (b) destas curvas analíticas foram calculados a fim de se obter as suas respectivas incertezas u_m e u_b . Destes resultados, u_{curva} foi calculada usando a Equação (29):

$$u_{curva} = \sqrt{\left[(c_{ib}^2 \times s_b^2) + (c_{im}^2 \times s_m^2) + (2 \times c_{ib} \times c_{im} \times u_b \times u_m \times r) \right]} \quad (29)$$

onde, c_{im} e c_{ib} são os coeficientes de sensibilidade, s_b e s_m são os desvios padrões para os coeficientes linear e angular, respectivamente, e r é o coeficiente de correlação.

Considerando que o sinal luminescente (y) dentro de uma resposta analítica linear obedece a Equação 30:

$$y = mx + b \quad (30)$$

onde x é a concentração de criseno nas soluções analíticas ou a quantidade de criseno no substrato sólido (proveniente de soluções analíticas em uma dada concentração). Os valores de s_b e s_m podem ser obtidos das Equações 31 e 32:

$$s_b^2 = \frac{s^2 \times \sum x^2}{D} \quad (31)$$

$$s_m^2 = n \frac{s^2}{D} \quad (32)$$

onde os valores de x indicam cada uma das n concentrações ou quantidades de criseno usadas para construir a curva analítica contendo n pontos. Os símbolos s^2 e D são respectivamente a variância e o desvio da curva, que são dados pelas Equações 33 e 34:

$$D = (n \times \sum x^2) - (\sum x)^2 \quad (33)$$

$$s^2 = \frac{\sum \Delta^2}{n-2} \quad (34)$$

onde Δ é a diferença entre o valor teórico de x ($x_{teórico}$) no melhor ajuste da curva e o valor experimental de x ($x_{experimental}$). As incertezas u_b e u_m são calculadas de (Equações 35 e 36):

$$u_b = \sqrt{s_b^2} \quad (35)$$

$$u_m = \sqrt{s_m^2} \quad (36)$$

Os coeficientes de sensibilidade c_{ib} e c_{im} (Equações 37 e 38) são usados para uniformizar as unidades dimensionais das incertezas, permitindo assim o cálculo da soma quadrática.

$$c_b = \frac{\partial y}{\partial b} = -\frac{1}{m} \quad (37)$$

$$c_m = \frac{\partial y}{\partial m} = \frac{y-b}{m^2} \quad (38)$$

Finalmente, r é dado pela Equação 39:

$$r = -\frac{\sum x}{\sqrt{(n \times \sum x^2)}} \quad (39)$$

É interessante ressaltar que, reduzindo-se a incerteza da medição fluorescente pelo preparo das soluções padrão de analito usadas na construção da curva analítica, um enorme impacto sobre a incerteza da curva analítica deve ser observado. No entanto, esse impacto seria verdadeiro se a medição da replicata para cada um dos pontos da curva fosse feita utilizando-se replicatas autênticas (cada replicata feita utilizando uma solução de analito independente). No entanto, neste trabalho, replicatas para cada ponto da curva analítica foram feitas usando a mesma solução, o que reduz a dispersão dos valores medidos

para cada solução padrão. Os valores encontrados para a incerteza da curva (u_{curva}) em ambas as técnicas pode ser vista na Tabela 40.

6.1.5 Incertezas combinada (u_c) e expandida (U)

Como as fontes de incerteza já foram identificadas, quantificadas e comparadas graficamente na Figura 81ab, a incerteza combinada (u_c) foi calculada pela soma quadrática destas fontes (Equação 40):

$$u_c = \sqrt{(u_r^2 + u_R^2 + u_s^2 + u_{curve}^2)} \quad (40)$$

Como resultado, os valores de u_c para SSRTP e fluorimetria são muito próximos quando é considerado o preparo das soluções por ajuste de volume. Para SSRTP, $1,64 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ é um valor razoável, uma vez que corresponde à medição de 1,8 ng de criseno (14% da quantidade de criseno depositada no substrato). Em termos de fluorescência, a incerteza da medição igual a $7,69 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ não é adequada, já que a concentração de referência do criseno é de $1 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e concentrações de analitos na ordem de $1 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ podem ser facilmente medidas em soluções de PAH. Felizmente, um valor mais compatível para a u_c pode ser obtido para a fluorimetria usando a estratégia apropriada para o preparo das soluções (pesagem das soluções). Neste caso, a incerteza combinada de $1,06 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ (10,6% da concentração de referência para o criseno) foi encontrada. Essas conclusões também são verdadeiras para a incerteza expandida (usando $k=2$).

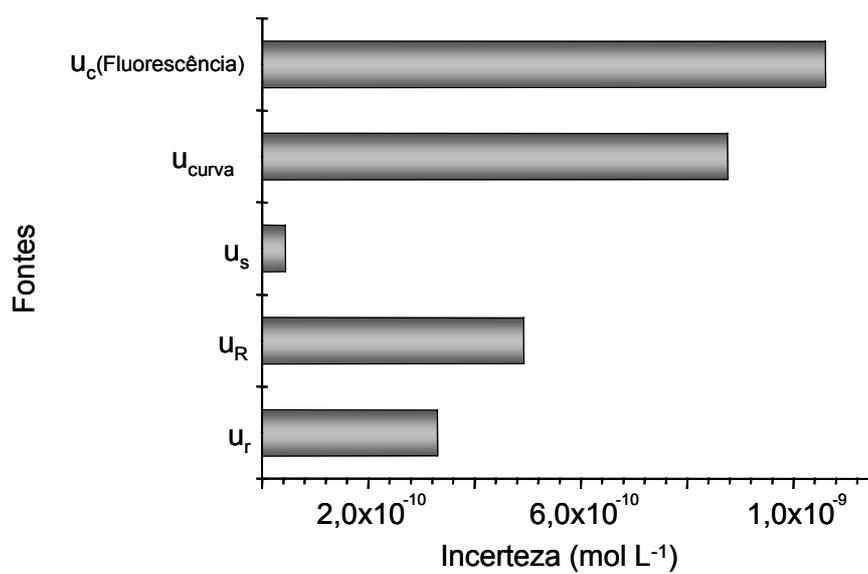


Figura 83: Contribuição relativa das fontes de incerteza na incerteza combinada (u_c) da medição fluorescente do crisenol empregando o preparo da solução por ajuste de massa. Fontes: u_{curva} (curva analítica); u_s (preparo de soluções); u_R (reprodutibilidade interna); u_r (repetitividade).

Tabela 40: Incertezas calculadas para as quatro fontes principais de incerteza associadas a medição da luminescência do criseno

Fontes de incerteza	Valores de incertezas		
	<i>SSRTP</i>	<i>Fluorimetria</i>	
<i>Repetitividade</i>			
u_r	$1,33 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$	$3,30 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$	
<i>Reprodutibilidade</i>			
u_R	$1,33 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	$4,92 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$	
<i>Curva analítica</i>			
Sensibilidade (u_a)	6,82	3,00	
Coefficiente linear (u_b)	$2,25 \times 10^5$	$3,00 \times 10^{-1}$	
u_{curva}	$5,44 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$	$8,76 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$	
<i>Preparo da Solução</i>			
	<i>Volume</i>		<i>Massa</i>
Balões volumétricos (10 mL) (u_{vf})	$1,38 \times 10^{-6} \text{ L}$	$1,38 \times 10^{-6} \text{ L}$	---
Micropipeta (200 μL) (u_{mp})	$3,45 \times 10^{-7} \text{ L}$	$3,45 \times 10^{-7} \text{ L}$	---
Micropipeta (5 μL) (u_{mp})	$2,16 \times 10^{-8} \text{ L}$	---	---
Balança (u_{bal})	$1,00 \times 10^{-5} \text{ mg}$	$1,00 \times 10^{-5} \text{ mg}$	$1,00 \times 10^{-5} \text{ mg}$
u_s	$*7,69 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$	$*7,69 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$	$**4,38 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$
<i>Combinada</i>			
u_c	$*1,64 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	$*7,69 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$	$**1,06 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$
<i>Expandida</i>			
U	$*3,27 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	$*1,54 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	$**2,12 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$

* Preparo da solução padrão do analito por avolumação e $k = 2$; 95% de nível de confiança

** Preparo da solução padrão do analito por ajuste de massa.