

3 Modelagem da curva de calibração

A calibração é muitas vezes considerada como uma maneira de estabelecer a exatidão de um sistema de medição, ou seja, o grau de concordância entre o resultado de uma medição e um *valor verdadeiro convencional* do mensurando (Vocabulário internacional de termos fundamentais e gerais de metrologia, 2000).

Na realidade, a calibração é um processo que compara valores de dois ou mais sistemas de medição. O primeiro é o sistema de referência, ou laboratório, e o segundo o sistema de medição que está sendo calibrado, por exemplo.

No procedimento de medição química a comparação pode ser feita usando medições obtidas do mesmo Material de Referência Certificado, MRC. Considera-se que cada quantidade do MRC utilizada é a mesma, pelo menos no que diz respeito às propriedades do analito, embora se saiba que existem incertezas até mesmo para duas quantidades de um mesmo material. Quando amostras são utilizadas para calibração, a homogeneidade é crítica e a contribuição da variabilidade do MRC deve ser declarada no resultado analítico do laboratório.

Utiliza-se a regressão estatística para avaliar o sistema de calibração e suas incertezas associadas.

O modelo de regressão assume que a variável aleatória x é conhecida e a variável dependente y é desconhecida. Através dos mínimos quadrados calcula-se as estimativas do coeficiente angular e do intercepto da curva de regressão resultante. Este modelo é utilizado para prever os valores de y a partir dos valores de x .

Já no procedimento de medição química, a calibração é mais complexa, pois os valores de y são utilizados para prever os valores de x , sendo assim denominada regressão inversa.

Os pressupostos na obtenção da curva de calibração são: linearidade do modelo; erro somente em y ; erros aleatórios e com variância homogênea; e erros com distribuição probabilística normal.

Neste capítulo serão abordadas: a avaliação dos pressupostos na modelagem da curva de calibração; o *mínimo valor detectável*; o *mínimo valor quantificável* e as incertezas decorrentes da obtenção e utilização da curva de calibração, como a primeira parte do processo de validação do método analítico.

3.1 Sinal observado e função de calibração

A *função de calibração* é definida como a relação funcional do procedimento de medições químicas que se refere ao valor esperado do sinal observado, y , ou variável resposta, $E(y)$, dada uma certa quantidade de analito x .

O gráfico correspondente é denominado de *curva de calibração* (ou *curva analítica*), para dados multivariados, *superfície de calibração*.

A *curva de calibração* é uma função monótona da resposta, y , determinada pelos métodos de estimação, com a pressuposição de que a variância da resposta seja constante para diferentes níveis de quantidade.

Para a *curva de calibração* linear, o sinal observado ou resposta, y , é dado por:

$$y = F(x) + e_y \quad (3.1)$$

Com

$$F(x) = B + Sn \quad (3.2)$$

Ou

$$F(x) = B + Ax \quad (3.3)$$

Onde:

Sn denota o sinal (puro sem ruído);

B , o sinal do branco;

x , quantidade de analito ou concentração;

A é chamado de sensibilidade; e

e_y é o erro aleatório, que segue uma distribuição normal com média zero e desvio-padrão σ , ou seja, $e_y \sim N(0, \sigma^2)$.

A estimativa do sinal é dada por:

$$\hat{B} \pm B_f S_B \quad (3.4)$$

De modo geral, a equação (3.1) abrangendo dados multivariados será:

$$\mathbf{y} = \mathbf{F}(\mathbf{x}) + \mathbf{e}_y \quad (3.5)$$

Com \mathbf{y} , \mathbf{x} e \mathbf{e}_y vetores, e com a função de calibração levando em consideração a relação multidimensional entre as respostas, analitos e interferências.

A função estimativa é a inversa da função calibração, em geral aplicando o operador inverso G , $G(F(x)) = G(E(y))$, isto é, para G inversa de F , o operador $G(F(x))$ retorna a concentração x . Desta forma, para uma função de calibração simples (reta),

$$\hat{x} = G(y) \quad (3.6)$$

$$\hat{x} = \frac{(y - \hat{B})}{\hat{A}} \quad (3.7)$$

Esse processo não é simples, devido à possibilidade de interferências e perdas, não-normalidade do erro aleatório e_y e não-linearidade da função F .

Para o caso geral da equação (3.5), trabalha-se com $G(F(x))$, sendo G a inversa generalizada de F . Se G for um operador linear derivado da função calibração, este será estimado pelos mínimos quadrados.

O cálculo da inversa, G , pode ser dificultado por problemas de multicolinearidade decorrentes da identificação do analito de interesse.

3.2

Faixa de trabalho e linearidade do método

A *faixa de trabalho* de um método é determinada pelo exame de amostras com diferentes concentrações de analito, e é definida como a faixa de concentração na qual podem ser alcançadas a exatidão² e precisão³ aceitáveis (INMETRO, 2000).

A região inferior da faixa de trabalho é delimitada pelos mínimos valores detectáveis e quantificáveis (abordados na seção 3.3), enquanto a região superior tem sua delimitação por vários efeitos, entre os quais o sistema de resposta do instrumento.

² Exatidão do método é a proximidade do valor obtido do analito em relação ao valor verdadeiro convencional.

³ Precisão do método é o grau de concordância entre os ensaios mutuamente independentes, sendo normalmente apresentada em forma de desvio-padrão.

A *faixa de trabalho* é determinada por regressão, utilizando-se o método dos mínimos quadrados; a quantidade ou concentração do analito pertencente a esta faixa deve ter uma relação linear com a resposta ou sinal. Sendo necessárias dez amostras independentes para pelo menos seis concentrações do material de referência (EURACHEM, 2000), para a determinação da *faixa de trabalho*.

A *linearidade* da *curva de calibração* (que servirá para relacionar a resposta ou sinal com a quantidade do analito), é determinada pelo ensaio de amostras que possuem concentrações de analito dentro da *faixa de trabalho* pretendida.

A *curva de calibração* usualmente é dada apenas pela faixa linear da curva que relaciona a resposta ou sinal com a quantidade ou concentração do analito, onde é maior a variação da resposta do instrumento de medição, obtendo-se melhor sensibilidade do método analítico. Além disso, se a *curva de calibração* não é linear, o valor da sensibilidade varia com a concentração do analito, enquanto que, trabalhando na faixa linear, o valor da sensibilidade fica constante em toda essa faixa. Isso possui várias vantagens, em particular no caso de aparelhos que convertem internamente e de maneira automática o sinal em quantidade ou concentração e trabalham com uma função linear, não admitindo outra forma de função. Por essas razões, o usual na prática, é trabalhar apenas na faixa linear.

Avalia-se a *linearidade* da *curva de calibração* pelo teste de ajustamento, que consiste em decompor a variância total em três componentes devida à regressão, ao modelo e aos resíduos (Neto, 2001; Seber 1977).

Considera-se que, em cada concentração j , o modelo gera n resíduos, um para cada medição; assim, para b concentrações, têm-se as seguintes somas de quadrados residuais:

Soma de quadrados dos resíduos (SQ_R) na concentração j :

$$(SQ_R)_j = \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \hat{y}_j)^2$$

Soma de quadrados residuais:

$$SQ_R = \sum_{j=1}^b (SQ_R)_j = \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \hat{y}_j)^2$$

Cada resíduo individual pode ser decomposto algebricamente na diferença de dois termos:

$$(y_{jk} - \hat{y}_j) = (y_{jk} - \bar{y}_j) - (\hat{y}_j - \bar{y}_j) \quad (3.8)$$

onde \bar{y}_j é a média das respostas observadas na concentração j .

Pode-se demonstrar que o somatório dos termos cruzados se anula quando se eleva a equação (3.8) ao quadrado, obtendo-se:

$$\sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \hat{y}_j)^2 = \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2 + \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n (\hat{y}_j - \bar{y}_j)^2 \quad (3.9)$$

O primeiro somatório do lado direito reflete apenas a dispersão do sinal (resposta), y_{jk} , em torno de suas média, \bar{y}_j , oferecendo uma medida do erro aleatório, e sendo, portanto, denominado de *Soma de Quadrados devido ao Erro Puro*, SQ_{EP} .

O segundo somatório decorre do modelo e sua magnitude depende do afastamento da estimativa da concentração, \hat{y}_j , da respectiva média, \bar{y}_j .

Esse termo fornece uma medida da falta de ajuste do modelo às respostas observadas, sendo chamado por isso de *Soma de Quadrados devido à Falta de Ajuste* - SQ_{Faj} .

Assim, com a decomposição da soma de quadrados obtém-se a Tabela de análise de variância, indicada na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Análise de variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo linear nos parâmetros (n = número de medições, b = número de concentrações e p = número de parâmetros do modelo).

Fonte De Variação	Graus De liberdade	SQ	QM	F
Regressão	p-1	SQ_{Reg}	$SQ_{Reg}/(p-1)$	QM_{Reg}/QM_r
Resíduo	nb-p	SQ_r	$SQ_r/(nb-p)$	
Falta de Ajuste	b-p	SQ_{Faj}	$SQ_{Faj}/(b-p)$	QM_{Faj}/QM_{EP}
Erro Puro	nb - b	SQ_{EP}	$SQ_{EP}/(nb-b)$	
Total	nb - 1	SQ_{Total}		
% variação explicada: SQ_{Reg}/SQ_{Total}				
% máxima de variação explicável : $(SQ_{Total} - SQ_{EP})/SQ_{Total}$				

3.3 Mínimo valor detectável e mínimo valor quantificável

As características de desempenho do procedimento de medições químicas são aquelas que servem para medir as capacidades de detecção e de quantificação.

As medidas de capacidade de detecção e quantificação são particularmente úteis quando as mensurações do analito ou de seus níveis são baixas, como por exemplo, em análise de elementos traço.

Para o propósito de validação de métodos analíticos é suficiente indicar em que concentração do analito a detecção é problemática. Assume-se que o branco acrescido de três desvios-padrão das medições é uma aproximação suficiente e usual desse limiar, pois em muitos casos o branco é difícil de ser obtido, de modo que seu desvio-padrão, na prática, é diferente de zero (EURACHEM, 1998).

Para uma análise mais rigorosa, as equações (3.1) a (3.7) fornecem a base dos conceitos de *mínimo valor detectável* e *mínimo valor quantificável* (tanto para o sinal como para a concentração) em análise química.

O *mínimo valor detectável* ou (*limite de detecção*) é baseado na teoria de teste estatístico de hipótese com as probabilidades de falso positiva, α , e falso negativa, β .

O *mínimo valor quantificável* (*limite de quantificação*) é expresso em termos de desvio-padrão relativo, denotado por DPR_Q , e pode ser definido como a mais baixa concentração do analito determinada, com nível de exatidão e repetitividade aceitáveis.

É importante enfatizar que esses parâmetros são características de desempenho do processo de medição química associados ao *valor verdadeiro convencional* da espécie de interesse, já que representam níveis cuja quantificação é impossível, sendo, portanto uma aproximação da incerteza na vizinhança do *mínimo valor detectável* (Currie, 1999; EURACHEM, 2000).

Assim, o valor crítico, L_C , é o menor valor tal que:

$$\Pr(\hat{L} > L_C | L = 0) \leq \alpha \quad (3.10)$$

O *mínimo valor detectável*, L_D , (limite de detecção) *referente à concentração*, x_D ou *senal*, y_D , é o menor valor tal que:

$$\Pr(\hat{L} \leq L_C | L = L_D) = \beta \quad (3.11)$$

O *mínimo valor quantificável*, L_Q , (limite de quantificação) é o menor valor cujo DPR_Q (desvio-padrão relativo, definido como σ_Q/V_Q , sendo V_Q *referente à concentração*, x_D ou *ao sinal*, y_D) é igual ao máximo tolerado.

De acordo com a ISO e a IUPAC, os valores convencionalmente para α e β são de 5% e o valor é de 10% para DPR_Q (Currie,1999).

Assim,

$$DPR_Q = \sigma_Q / L_Q = 0,1 \quad (3.12)$$

como $k_Q = 1 / DPR_Q$ e pela expressão (3.12) $k_Q = 10$; logo,

$$L_Q = 10\sigma_Q \quad (3.13)$$

Se \hat{L} é normalmente distribuída com variância conhecida $\sigma_0 = \sigma_D$, então:

$$L_C = z_{1-\alpha}\sigma_D \quad (3.14)$$

$$L_D = L_C + z_{1-\beta}\sigma_D \quad (3.15)$$

Onde $z_{1-\alpha}$ e $z_{1-\beta}$ representam valores críticos da distribuição normal padrão e σ_D é o desvio-padrão da quantidade estimada (senal ou concentração), sob a hipótese nula (ausência do analito).

Como a variância é constante entre $L = 0$ e $L = L_D$, então (3.15) se reduz a:

$$L_D = (z_{1-\alpha} + z_{1-\beta})\sigma_D \quad (3.16)$$

Considerando $\alpha = \beta = 5\%$, pode-se observar na Figura 3.1

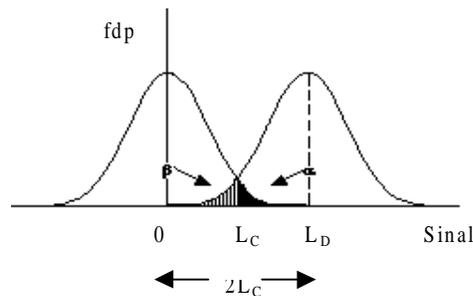


Figura 3.1. Relação entre o valor crítico e o mínimo valor detectável

$$L_D = 2z_{1-\alpha}\sigma_D \quad (3.17)$$

Ou seja:

$$L_D = 3,29\sigma_D \quad (3.18)$$

Se a função de calibração $F(x)$ for monótona, com as incertezas de seus parâmetros desprezíveis, o *mínimo valor detectável referente à concentração*, x_D , pode ser calculado a partir de $F^{-1}(y_D)$, onde y_D é *mínimo valor detectável referente ao sinal*, com

$$y_D = B + Sn_D \quad (3.19)$$

e Sn_D o *sinal de detecção*.

Para $F(x)$ linear (3.2), $F(x) = B + Ax$, x_D é obtido como:

$$x_D = \frac{Sn_D}{A} \quad (3.20)$$

$$x_D = \frac{y_D - B}{A} \quad (3.21)$$

Pressupondo normalidade e homogeneidade de variância, segue que:

$$x_D = \frac{2Sn_C}{A} \quad (3.22)$$

com Sn_C o *sinal crítico*.

Se $\alpha = 5\%$ e $\beta = 5\%$, tem-se que

$$x_D = \frac{3,29\sigma_D}{A} \quad (3.23)$$

Nas mesmas condições anteriormente mencionadas, o *mínimo valor quantificável referente à concentração*, x_Q , pode ser obtido por:

$$x_Q = \frac{10\sigma_D}{A} \quad (3.24)$$

3.4 Avaliação da curva de calibração

A curva de calibração representa a relação entre a concentração do analito ou valor apropriado e o sinal. Como visto em 3.2, ela só é definida na faixa em que essa relação é linear. Os cálculos da regressão são insuficientes para garantir a linearidade, por isso se utiliza a inspeção visual e testes de ajustamentos, os quais serão apresentados nas etapas que fazem parte do diagrama da Figura 3.2.

Quando várias séries são utilizadas para a obtenção da curva de calibração, deve-se conduzir a análise da resposta como função das concentrações e fazer uma análise de regressão para cada série individualmente. (Hubert *et al.*, 1999).

A análise e composição de duas séries de dados serão abordadas posteriormente (através de um exemplo), a fim de analisar a resposta a partir de duas séries de dados.

A seguir apresenta-se um procedimento em seis etapas para avaliação da curva de calibração, sintetizado no diagrama da Figura 3.2.

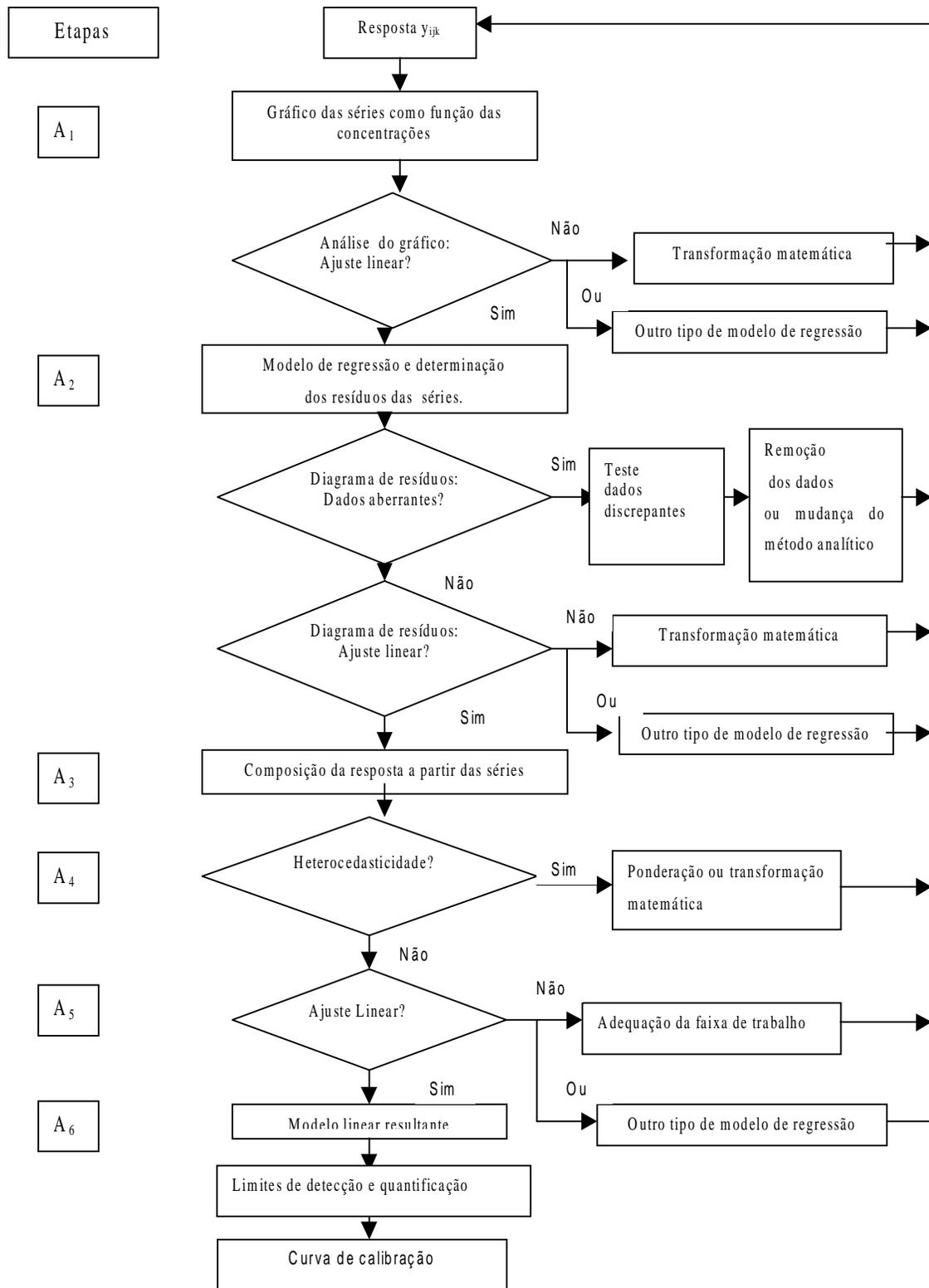


Figura 3.2. Determinação da função resposta (Adaptado de Hubert et al., 1999).

3.4.1

Etapa A₁ - Gráfico da resposta como função das concentrações

Faz-se um gráfico de resposta por concentração para visualizar desvios de linearidade, mostrando a necessidade de transformações matemáticas de modo a se obter funções monótonas e lineares, ou até mesmo, de realizar outro tipo de regressão (polinomial, quadrática, etc.).

Outra maneira, mais formal, de avaliar a linearidade da *curva de calibração* é através do teste de ajustamento que consiste em decompor a variância total do modelo de regressão em três componentes, como discutido no Capítulo 5 deste trabalho.

3.4.2

Etapa A₂ - Modelo de regressão e determinação dos resíduos

Se não há evidência de falta de ajuste linear, utiliza-se o modelo de regressão usual para obtenção dos valores previstos, e, conseqüentemente, dos resíduos, pela diferença entre os valores previstos e observados.

Dando prosseguimento à análise da resposta como função da concentração, testam-se a normalidade dos resíduos, a existência de *dados discrepantes* e a homogeneidade de variância.

3.4.2.1

Teste de normalidade dos resíduos

Como as análises nas etapas seguintes envolvem testes de hipóteses e construção de intervalos de confiança, desvios da normalidade afetam o nível de significância e, conseqüentemente, o poder do teste.

Após o ajuste do modelo, obtém-se um conjunto de resíduos, cujo comportamento em relação à normalidade deseja-se verificar.

Uma investigação grosseira é a construção de intervalos de $[-s, s]$ e $[-2s, 2s]$ que devem conter respectivamente cerca de 68% e 95% dos resíduos.

Uma avaliação da normalidade pode ser feita através do histograma dos resíduos. Se a pressuposição de normalidade é satisfeita, o gráfico deverá se parecer com o gráfico de uma amostra de distribuição normal centrada na origem. Entretanto, em pequenas amostras, flutuações consideráveis ocorrem com

freqüência, por isso o aparente afastamento da normalidade não implica necessariamente em uma violação séria desse pressuposto.

Outro procedimento para o teste de normalidade dos resíduos consiste na construção do diagrama de probabilidade normal, que é um gráfico das distribuições acumuladas (Montgomery, 1996).

Para construir o diagrama, os resíduos são postos em ordem crescente e relacionados com as respectivas probabilidades acumuladas P_k , obtidas pela expressão (3.25).

$$P_k = \frac{(k - \frac{1}{2})}{nb} \quad k=1,2,\dots,nb \quad (3.25)$$

No gráfico em questão, os resíduos são relacionados com o valor da distribuição padrão acumulada inversa. Assim:

$$x_k \rightarrow P_k \rightarrow \Phi^{-1}(P_k) \quad (3.26)$$

e

$$z_k = \Phi^{-1}(P_k) \quad (3.27)$$

Com $\Phi \sim N(0,1)$ acumulada.

Os pares (x_k, z_k) são relacionados no gráfico e se x_k tem distribuição normal, os pares formam uma linha aproximadamente reta (salvo flutuações aleatórias).

Um dos testes empregados para verificação de normalidade, também utilizando freqüências acumuladas é o teste do Anderson-Darling. É uma modificação do teste de Kolmogorov-Smirnov (K-s) (Shapiro, 1990) sendo um teste mais sensível. As hipóteses são:

H_0 : Os dados seguem uma distribuição normal.

H_1 : Os dados não seguem a distribuição normal

A estatística de teste é definida como:

$$A^{2*} = A^2 \left(1 + \frac{0,75}{n} + \frac{2,25}{n^2} \right) \quad (3.28)$$

onde

$$A^2 = - \frac{\sum_{k=1}^n (2k-1) [\ln(Z_k) + \ln(1-Z_{n+1-k})]}{n} - n \quad (3.29)$$

com Z_k sendo a função de distribuição acumulada da distribuição normal padrão.

Os valores críticos para o teste do Anderson-Darling são dependentes da distribuição que está sendo testada: normal, lognormal, exponencial, Weibull, logística. A hipótese nula é rejeitada se A_{α}^{2*} for maior do que o valor crítico.

A Tabela 3.2 fornece os valores críticos A_{α}^{2*} para distribuição normal, ao nível de significância de α .

Tabela 3.2. Os valores críticos A_{α}^{2*} para distribuição normal.

$\alpha\%$	25	20	15	10	5	2,5	1	0,6
A_{α}^{2*}	0,472	0,509	0,561	0,631	0,752	0,873	1,035	1,159

3.4.2.2

Dados discrepantes (outliers)

É freqüente, em análise química, aparecerem dados de medição cujo comportamento é bastante diferente dos demais; a estes dados de comportamento diferente dá-se o nome de *dados discrepantes (outliers)*. A existência desses dados pode provocar sérios problemas no resultado da análise, no ajuste do modelo e na estimação dos parâmetros. Por isso, é importante a avaliação desse tipo de dado, envolvendo três etapas bem definidas:

- i) identificação de possíveis *dados discrepantes*;
- ii) avaliação dos efeitos sobre os estimadores e previsões;
- iii) análise criteriosa para eliminação ou não dos mesmos.

Existem vários procedimentos para detectar *dados discrepantes*, que se baseiam no exame dos resíduos padronizados:

$$d_{jk} = \frac{e_{jk}}{\sqrt{QM_r}} \quad (3.30)$$

Onde:

e_{jk} é o k-ésimo resíduo da j-ésima concentração

QM_r é o quadrado médio do resíduo

Se os resíduos seguem aproximadamente uma distribuição normal, então, ao serem padronizados, devem se aproximar de uma distribuição normal com

média zero e variância um, $d_{jk} \sim N(0,1)$. Dessa forma, aproximadamente 68% dos resíduos padronizados pertencem ao intervalo de ± 1 , 95% pertencem ao intervalo de ± 2 e 99,73% ao intervalo de ± 3 . Assim, resíduos maiores em módulo que 3 ou 4 desvios-padrão são considerados *dados discrepantes* em potencial.

O teste utilizado nesse trabalho, baseado nos resíduos padronizados, é o teste de Grubbs. Este teste é um teste unilateral, no qual os dados são dispostos em ordem crescente, de modo a visualizar a discrepância de alguns dados quando comparadas com os demais. As estatísticas de teste são:

$$G_1 = \frac{\bar{y} - y_{\min}}{S} \quad (3.31)$$

$$G_2 = \frac{y_{\max} - \bar{y}}{S} \quad (3.32)$$

Onde:

y_{\min} e y_{\max} suspeitos de serem dados discrepantes,

\bar{y} é a média das observações amostrais;

S é o desvio-padrão amostral;

As estatísticas G_1 ou G_2 são comparadas com os valores críticos tabelados segundo o nível de significância e o tamanho da amostra.

3.4.2.3 Heterogeneidade da variância

A avaliação da heterogeneidade da variância pode ser feita pela análise do gráfico dos resíduos ou com um teste de hipótese formal.

Existem vários testes para este propósito. O mais utilizado é o teste de Bartlett. O procedimento envolve uma amostra de distribuição χ^2 , com $b-1$ graus de liberdade, quando as amostras aleatórias são oriundas de populações normais e independentes.

As hipóteses são:

$$\begin{cases} H_0 : \sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \dots = \sigma_b^2 \\ H_1 : \sigma_1^2 \neq \sigma_m^2, \quad \forall 1 \neq m \end{cases}$$

Com a estatística de teste:

$$\chi^2_{\text{Calculado}} = 2,3026 \frac{q}{c} \quad (3.33)$$

$$\text{com } q = (nb - b) \log_{10} S_c^2 - \sum_{j=1}^b (n_j - 1) \log_{10} S_j^2$$

$$c = 1 + \frac{1}{3(b-1)} \left(\sum_{ij=1}^b (n_j - 1)^{-1} - (nb - b)^{-1} \right) e \quad S_c^2 = \frac{\sum_{j=1}^b (n_j - 1) S_j^2}{nb - b}$$

Se $\chi^2_{\text{Calculado}} < \chi^2_{\text{Crítico}} = \chi^2_{5\%(b)}$ não se pode rejeitar H_0 , ou seja, as variâncias podem ser consideradas iguais

Vários estudos provam que o teste de Bartlett é muito sensível à pressuposição de normalidade e por isso não deve ser aplicado quando essa pressuposição é duvidosa (Montgomery, 1996).

Uma alternativa ao teste de Bartlett é o teste de Cochran, que é indicado pela ISO 5727 para comparar desempenhos interlaboratoriais. É um teste unilateral e pressupõe que as variâncias tenham sido obtidas de um mesmo número de amostras. Na comparação de desempenho interlaboratorial, é utilizado quando se deseja verificar se a variância dos resultados obtidos por um laboratório é excessiva em relação aos demais laboratórios.

As hipóteses são:

$$\begin{cases} H_0 : \sigma_{\text{Max}}^2 - \dots - \sigma_b^2 = 0 \\ H_1 : \sigma_{\text{Max}}^2 - \dots - \sigma_b^2 > 0 \end{cases}$$

O procedimento é o seguinte:

1. Calcula-se a soma de todas as b variâncias:

$$\sum_{j=1}^b S_j^2$$

Cada qual com o mesmo número de graus de liberdade ($v = n - 1$);

2. Obtém-se o coeficiente de Cochran como a razão entre a maior variância e a soma das variâncias:

$$C_{\text{Calculado}} = \frac{S_{\text{max}}^2}{\sum_{j=1}^b S_j^2}$$

3. Compara-se o valor $C_{\text{Calculado}}$ com um par de valores críticos

$$C_{\text{Crítico}} = C_{\alpha\% (b;v)}: (C_{1\% (b;v)}, C_{5\% (b;v)})$$

4. Toma-se a decisão:

- Se $C_{\text{Calculado}} < C_{(5\%)}$, aceita-se H_0 , a variância do laboratório não é excessiva;
- Se $C_{(5\%)} < C_{\text{Calculado}} < C_{(1\%)}$, nada se pode concluir;
- Se $C_{\text{Calculado}} > C_{(1\%)}$, rejeita-se H_0 , ou seja, a variância do laboratório é considerada excessiva.

3.4.2.4

Transformações que podem estabilizar a variância

Se existir uma relação entre a média e a variância, esta informação pode ser utilizada para se fazer uma transformação que estabilize a variância.

Se $E(y) = \mu$ é a média de y e supondo que a relação entre o desvio-padrão e a média de y seja da forma:

$$\sigma_y \propto \mu^a$$

Com $a > 0$, a transformação dos dados originais de y que torna sua variância constante é:

$$y^* = y^b \quad (3.34)$$

Pode ser mostrado que:

$$\sigma_{y^*} \propto \mu^{b+a-1} \quad (3.35)$$

Claramente, se $b = 1 - a$, a variância dos dados transformados y^* é constante.

As principais transformações que estabilizam a variância são apresentadas na Tabela 3.3 a seguir.

Tabela 3.3. Transformações que estabilizam a variância.

Relação entre σ_y e μ	α	$\lambda = 1 - \alpha$	Transformação
σ_y constante	0	1	Não existe transformação
$\sigma_y \propto \mu^{1/2}$	1/2	1/2	Raiz quadrada
$\sigma_y \propto \mu$	1	0	Log
$\sigma_y \propto \mu^{3/2}$	3/2	-1/2	Raiz quadrada
$\sigma_y \propto \mu^2$	2	-1	Raiz quadrada

3.5**Etapa A₃ - Composição da resposta a partir das séries**

As séries analisadas separadamente devem ser compostas em uma única série para os procedimentos das etapas seguintes.

3.6**Etapa A₄ - Heterogeneidade da variância**

A avaliação da heterogeneidade da variância (heterocedasticidade), pode ser feita pela análise (inspeção visual) dos gráficos dos resíduos, ou com um teste de hipótese formal como já descrito na etapa A₂ e detalhado no Exemplo Numérico 6.2.

3.7**Etapa A₅ - Avaliação da linearidade da curva composta para estabelecimento da faixa de trabalho**

Uma vez composta a série, a linearidade é avaliada, como proposto nos procedimentos da etapa A₁.

Nesta etapa é estabelecida a faixa de trabalho, com a região inferior desta delimitada pelo *mínimo valor detectável* ou *mínimo valor quantificável* (etapa A₆) e a superior pela descontinuidade da curva analítica, que geralmente depende do sistema de resposta do instrumento.

3.8 Etapa A₆ – Modelo linear resultante

Com o modelo resultante se estabelecem o *mínimo valor detectável* e o *mínimo valor quantificável*, conforme detalhado na Seção 3.2 deste trabalho.

Para perfeita compreensão, os procedimentos aqui descritos são ilustrados no Capítulo 6 com exemplos.

3.9 Incerteza da curva de calibração

O intervalo de confiança calculado para a reta de regressão, utilizando a distribuição t de *Student*, ao nível de confiança α e nb-2 graus de liberdade, é usualmente entendido como a incerteza da função calibração. A incerteza para qualquer ponto dentro da faixa de trabalho estudada para valores individuais pode ser expressa como:

$$u(y_i) = \pm t_{\alpha/2, (nb-2)} S_Y \quad (3.36)$$

Portanto, o intervalo de confiança para y_i , é dado por:

$$y_i \in [y_i \pm t_{(\alpha/2, nb-2)} S_Y] \quad (3.37)$$

Com

$$S_Y = \sqrt{\frac{QME}{nb} + S_B^2 + S_A^2 (x_o - \bar{x}_{..})^2} \quad (3.38)$$

e

$$S_A^2 = \frac{\sigma^2}{S_x^2} \quad (3.39)$$

$$S_B^2 = \frac{\sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n x_{jk}^2}{nb S_x^2} \sigma^2 \quad (3.40)$$

$$S_x^2 = \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n (x_{jk} - \bar{x}_{..})^2 \quad (3.41)$$

Para cada valor de y_i existe um intervalo cujos limites são estabelecidos por duas curvas hiperbólicas, definindo o limite superior e o limite inferior da curva média da regressão.

Na prática, quando se usa o método analítico o interesse é de obter a incerteza de x_i , que corresponde aos valores dos limites do intervalo de confiança de y_i .

O intervalo é conhecido como *intervalo fiducial* e está associado à incerteza dos valores obtidos nos eixos das abcissas (Chui *et al.*, 2001), o qual pode ser obtido pela expressão:

$$x_i \in \left[\frac{y_i - \hat{B}}{\hat{A}} \pm \frac{t_{(\alpha/2; nb-2)} S_Y}{\hat{A}} \right] \quad (3.42)$$

No entanto, a incerteza da curva de calibração é um problema de análise bivariada, pois não depende apenas das distribuições marginais do intercepto e do coeficiente angular.

É possível observar na Figura 3.3, que ao se considerar o intervalo de confiança para os parâmetros da *curva de calibração*, o ponto q pertence ao intervalo de confiança conjunto (representado pela elipse), mas não ao intervalo de confiança para B. Já o ponto p, não pertence ao intervalo conjunto, mas aos dois intervalos marginais.

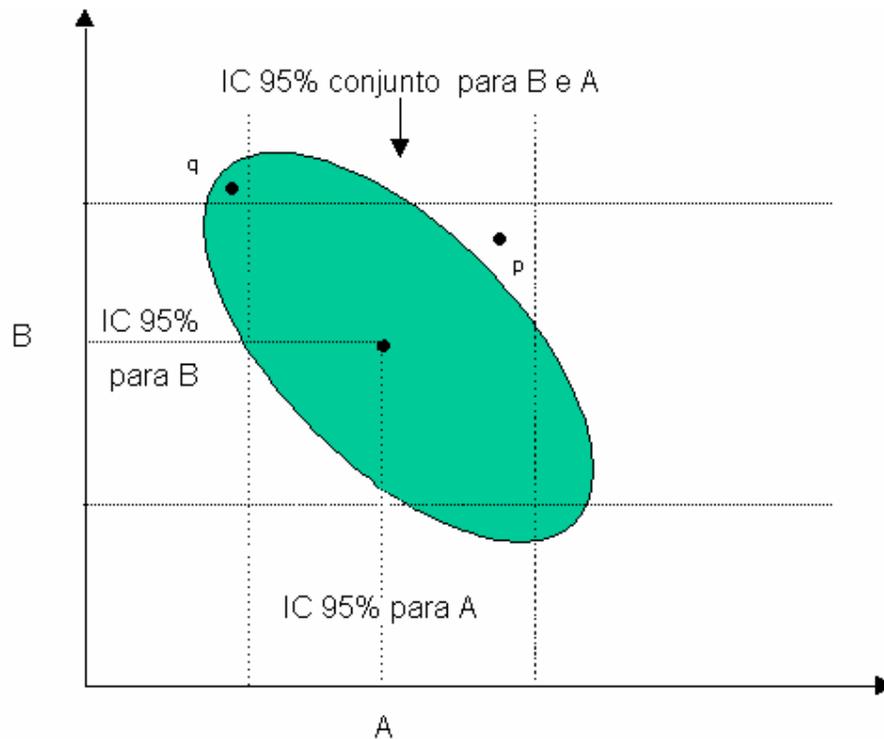


Figura 3.3. Incerteza dos parâmetros da curva de calibração (Adaptado de ASQ, 2001)

Para esta questão, não trivial, determina-se um intervalo conjunto para uma família de estimativas, uma família de confiança dos coeficientes com a verossimilhança que indique que todos os parâmetros estimados estejam corretos em repetidas amostragens. Isto envolve alguns ajustes nos intervalos de confiança convencionais.

Consideram-se os seguintes eventos:

$E_1 = \{ \text{a probabilidade do primeiro intervalo de confiança de não conter B} \};$

$E_2 = \{ \text{a probabilidade do segundo intervalo de confiança não conter A} \}.$

Assim:

$$P(E_1) = \alpha \text{ e } P(E_2) = \alpha \quad (3.43)$$

Sabe-se que:

$$P(E_1 \cup E_2) = P(E_1) + P(E_2) - P(E_1 \cap E_2) \quad (3.44)$$

Em termos de probabilidades complementares:

$$P(\bar{E}_1 \cup \bar{E}_2) = 1 - [P(E_1) + P(E_2) - P(E_1 \cap E_2)] \quad (3.45)$$

Como $P(E_1 \cap E_2) \geq 0$, pode-se encontrar a desigualdade de Bonferroni pela desigualdade:

$$P(E_1 \cap E_2) \geq 1 - P(E_1) - P(E_2) \quad (3.46)$$

Finalmente, se expressa a desigualdade de Bonferroni para o intervalo de confiança como:

$$P(E_1 \cap E_2) \geq 1 - \alpha - \alpha = 1 - 2\alpha \quad (3.47)$$

Desta forma, pode-se construir o intervalo de confiança conjunto, de $1 - \alpha$, para B e A. Se a amostra utilizada para medição foi obtida da mesma população (mesma quantidade, mesmos níveis para x), B e A devem pertencer ao intervalo conjunto denominado de *elipse de confiança* ao nível de confiança $1 - \alpha$.

O intervalo de confiança conjunto para as estimativas B e A é dado por:

$$\hat{B} \pm B_f S_B \quad (3.48)$$

$$\hat{A} \pm B_f S_A \quad (3.49)$$

$$B_f = t_{(1-\frac{\alpha}{4}; n-2)} \quad (3.50)$$

A desigualdade de Bonferroni é utilizada no desenvolvimento do teste de hipótese simultâneo:

$$\left\{ \begin{array}{l} H_0 : \begin{bmatrix} B \\ A \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} B^* \\ A^* \end{bmatrix} \\ H_1 : \begin{bmatrix} B \\ A \end{bmatrix} \neq \begin{bmatrix} B^* \\ A^* \end{bmatrix} \end{array} \right.$$

A estatística teste, F, modificada é obtida pela seguinte expressão:

$$F_{\text{Calculado}} = \frac{nb(B^* - B)^2 + 2\left(\sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n x_{jk}\right)(B^* - B)(A^* - A) + \left(\sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n x_{jk}^2\right)(A^* - A)^2}{2QME} \quad (3.51)$$

Com $F_{\text{Crítico}} = F_{1-\alpha}(2; nb-2)$. Se $F_{\text{Calculado}} > F_{\text{Crítico}}$, rejeita-se H_0 .

A incerteza da curva de calibração é calculada baseada no intervalo de confiança de Working-Hotelling. Nota-se que a estatística teste F permite 2 e nb-2 graus de liberdade de modo que pode ser utilizada para toda a faixa de trabalho da *curva de calibração* de x, e não apenas de x_0 .

Hunter *apud* ASQ (2001), menciona que o intervalo t é válido apenas para prever a resposta média de x_0 , enquanto o intervalo de Working-Hotelling que emprega F de Snédecor é válido para toda faixa de trabalho.

$$u(y_{iH}) = \pm W S_{YH} \quad (3.52)$$

Onde:

$$W^2 = 2F_{1-\alpha}(2; nb-2) \quad (3.53)$$

Com intervalo de confiança para y_{iH} , dado por:

$$y_{iH} \in [y_{iH} \pm W S_{YH}] \quad (3.54)$$

Sendo:

$$S_{YH} = \sqrt{QMr \left[\frac{1}{nb} + \frac{(x_H - \bar{x}_{..})^2}{S_x^2} \right]} \quad (3.55)$$

O *intervalo fiducial* obtido do intervalo de confiança de Working-Hotelling, associado à incerteza dos valores obtidos nos eixos das abcissas, pode ser obtido pela expressão:

$$x_{iH} \in \left[\frac{y_i - \hat{B}}{\hat{A}} \pm \frac{\sqrt{2F_{1-\alpha}(2; nb-2)} S_{YH}}{\hat{A}} \right] \quad (3.56)$$