

# MODELAÇÃO DO DESEMPENHO DE MÉTODOS ANALÍTICOS COMPLEXOS

## - ABORDAGEM DIFERENCIAL - UMA ABORDAGEM TRANSVERSAL -

---

Ricardo J. N. Bettencourt da Silva <sup>a</sup>, Júlia R. Santos <sup>a</sup>, M. Filomena G. F. C. Camões <sup>b</sup>

a – Laboratório de Resíduos de Pesticidas - Direcção-Geral de Protecção das Culturas

b – CECUL/DQB – Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

**Palavras-chave:** Metrologia química, Incerteza, Abordagem Diferencial, Resíduos de Pesticidas, Alimentos.

### Resumo

As diversas abordagens correntemente usadas para quantificação da incerteza da medição, designadamente as abordagens sub-analítica (“bottom-up”), supralaboratorial (“top-down”) e supra-analíticas (ex: abordagem da reconciliação) apresentam vantagens e desvantagens muitas vezes não coincidentes, *i.e.*, as vantagens de umas são as desvantagens de outras. Desta forma, estas abordagens são usadas em função da informação analítica disponível, quer seja sub-analítica, supralaboratorial ou supra-analítica, e da capacidade dessa informação produzir estimativas fidedignas da incerteza da medição.

Esta comunicação apresenta uma abordagem alternativa às enunciadas, *abordagem diferencial* [1, 2], capaz de reunir as vantagens mais relevantes de cada uma delas, designadamente a capacidade de estimar a contribuição das diversas etapas analíticas para a incerteza do resultado final, de estudar o desempenho de métodos analíticos complexos sem a necessidade de realizar estimativas do tipo B para descrever fontes de incerteza maioritárias, e de produzir estimativas de elevada qualidade da incerteza da medição, mesmo quando não estão disponíveis resultados de ensaios interlaboratoriais, ou métodos ou materiais de referência. Mais recentemente foi desenvolvida uma variante desta abordagem facilmente implementável em laboratórios de rotina, a qual envolve a realização de estimativas por excesso da incerteza da medição [3].

A *Abordagem Diferencial* baseia-se na divisão do método analítico em etapas analíticas simples, descritas por modelos bem estabelecidos, e complexas, com modelos de desempenho desconhecidos, e na comparação da precisão intermédia do método analítico com a combinação da incerteza associada às etapas analíticas simples que afectam a precisão estimada do método, com vista a estimar, por diferença, o desempenho das etapas analíticas complexas isoladamente. Posteriormente, as fontes de incerteza estudadas são combinadas com as fontes de incerteza não consideradas no estudo experimental recorrendo a modelos bem estabelecidos, produzindo um modelo detalhado do desempenho analítico. Tendo em conta que esta abordagem permite utilizar informação supra-analítica e sub-analítica para obter informação sub-analítica adicional sobre as etapas analíticas complexas, ou seja, o fluxo de informação atravessa o nível analítico nos dois sentidos, a mesma é classificada como uma *abordagem transversal*.

### 1. Introdução

Após a publicação do Guia de ISO para a expressão de resultados com incerteza [4], mais conhecido como GUM, foi publicado o Guia da Eurachem [5] para a

quantificação da incerteza da medição em ensaios químicos, que teve como objectivo apresentar a aplicação dos princípios do GUM [4] à metrologia química. No entanto, as dificuldades encontradas na aplicação do GUM [4] aos ensaios químicos resultaram numa revisão profunda deste guia. A última revisão do Guia da Eurachem [6] apresenta as três abordagens mais vulgarmente usadas para estimar a qualidade das medições químicas, designadamente a abordagem sub-analítica (abordagem “bottom-up”) descrita no GUM [4], a abordagem supralaboratorial (abordagem “top-down” baseada em informação interlaboratorial) [7] e a abordagem supra-analítica da reconciliação [8]. Todas estas abordagens têm desvantagens importantes que dificultam a sua aplicação generalizada. A abordagem sub-analítica não é aplicável a métodos analíticos que envolvam etapas analíticas com desempenho desconhecido (ex: extracções ou digestões); a abordagem supralaboratorial sobrestima as capacidades analíticas dos laboratórios e necessita de informação interlaboratorial dispendiosa e, muitas vezes, inexistente; e a abordagem da reconciliação não permite um conhecimento detalhado do desempenho analítico, designadamente a contribuição do desempenho das várias etapas analíticas para a qualidade da medição.

Este trabalho apresenta uma abordagem alternativa às desenvolvidas, *Abordagem Diferencial*, que reúne as vantagens mais relevantes destes. Esta abordagem é capaz de produzir modelos detalhados do desempenho analítico capazes de orientar a optimização do método, independentemente da sua complexidade, e de estimar o desempenho da globalidade do método analítico para itens com analito nativo, mesmo quando não estão disponíveis métodos de referência ou materiais de referência com analito nativo. Também foi desenvolvida uma variante desta abordagem aplicável a laboratórios de rotina com baixos índices de automação ou informatização [3].

## **2 Abordagem diferencial para a modelação do desempenho analítico**

A abordagem diferencial para a modelação do desempenho analítico permite a quantificação do desempenho das etapas analíticas complexas (*i.e.*, etapas não descritas por modelos baseados no conhecimento detalhado dos seus princípios) do método analítico com vista a combinar esta informação com todas as outras fontes de incerteza e assim construir modelos detalhados do desempenho do método ao longo de uma gama alargada de concentrações. Para tal, baseia-se na recolha de informação detalhada do desempenho do método a, pelo menos, um nível de concentração da gama analítica, e na avaliação da adequação do modelo desenvolvido para toda a gama de concentrações.

### **2.1 Etapas da abordagem diferencial**

A abordagem diferencial para a modelação do desempenho analítico envolve as seguintes etapas (Figura 1):

- 1. Definição da mensuranda [9]**

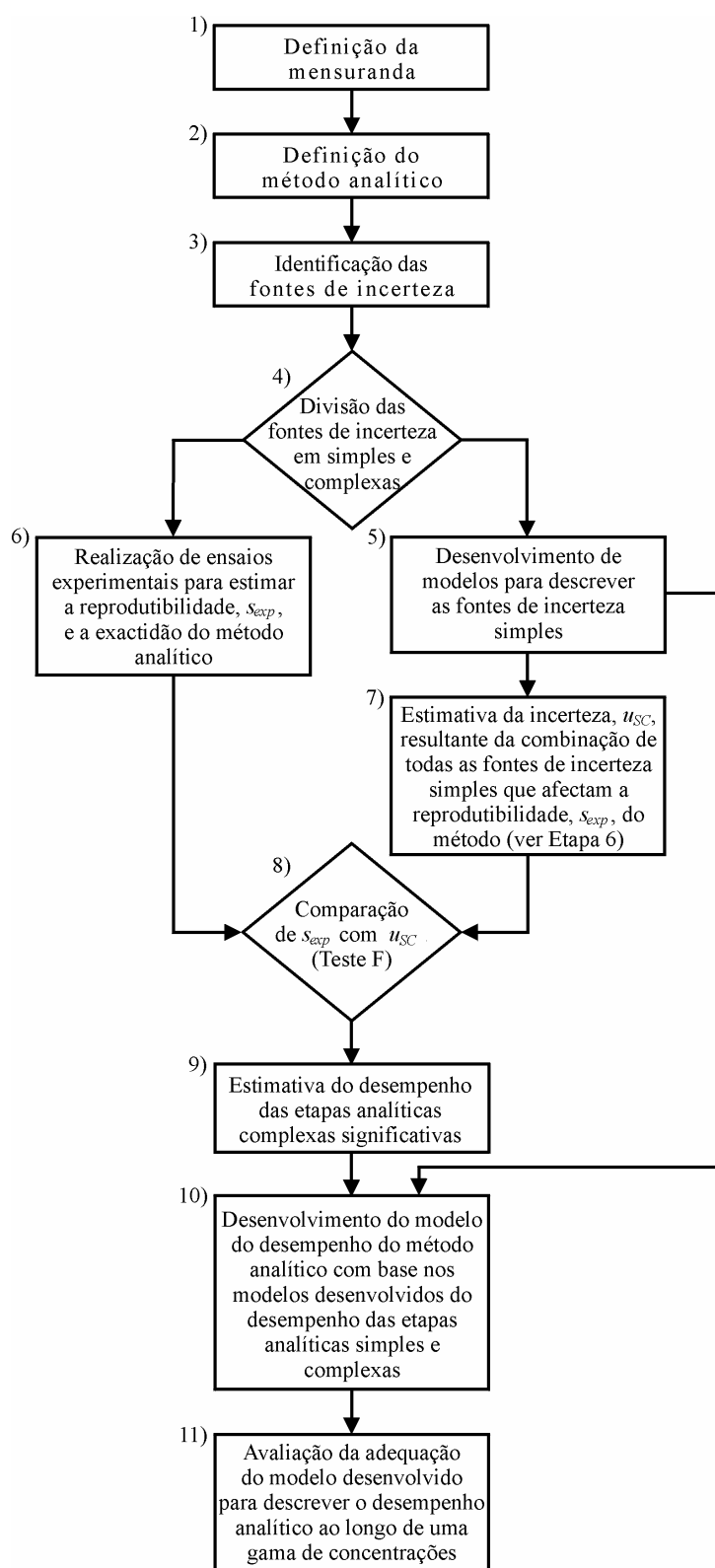
Definir de forma clara a quantidade sujeita à medição, incluindo a relação entre a mensuranda e os parâmetros de que esta depende (ex: quantidades medidas, constantes, etc.).

- 2. Definição do método analítico**

Definir as etapas unitárias a incluir na definição do método analítico concordantes com a definição da mensuranda estabelecida.

- 3. Identificação das fontes de incerteza**

Listar as fontes de incerteza do método analítico. Esta listagem deve incluir as fontes de incerteza associadas aos parâmetros contidos na definição da mensuranda (Etapa 1) e, se necessário, outras fontes de incerteza associadas aos pressupostos definidos durante o processo de medição.



**Figura 1.** Esquema das etapas da abordagem diferencial para modelação do desempenho de um método analítico complexo.

#### 4. Divisão das fontes de incerteza em simples e complexas

Dividir as fontes de incerteza em descritíveis com base no conhecimento detalhado dos seus princípios e designadas por simples, e naquelas que carecem de modelos descritivos devido à sua complexidade e, portanto, são designadas por complexas. As fontes de incerteza simples podem ser descritas com base na compreensão do seu mecanismo de funcionamento (ex: volumetrias, gravimetrias e outras medidas físicas) ou recorrendo a procedimentos capazes de estimar, objectivamente, o seu impacto analítico (ex: calibração multi-pontos de um método instrumental de análise).

É possível transformar uma etapa analítica complexa numa simples recorrendo a um procedimento analítico adequado. Por exemplo, na determinação de resíduos de pesticidas em alimentos sólidos por cromatografia em fase gasosa, recorrendo a uma extracção sólido-líquido, se o cromatógrafo for calibrado com padrões que sofrem todo o processo analítico, pode desenvolver-se um modelo empírico do desempenho do método que inclui todas as etapas analíticas, apesar de algumas destas possuírem orgânicas desconhecidas em detalhe.

#### 5. Desenvolvimento de modelos para descrever as fontes de incerteza simples

Desenvolver modelos capazes de descrever as fontes de incerteza simples baseados na compreensão do seu impacto na mensuranda. Esta etapa deverá ter em conta a incerteza associada aos pressupostos definidos na modelação.

#### 6. Realização de ensaios experimentais para estimar a reprodutibilidade e a exactidão do método analítico

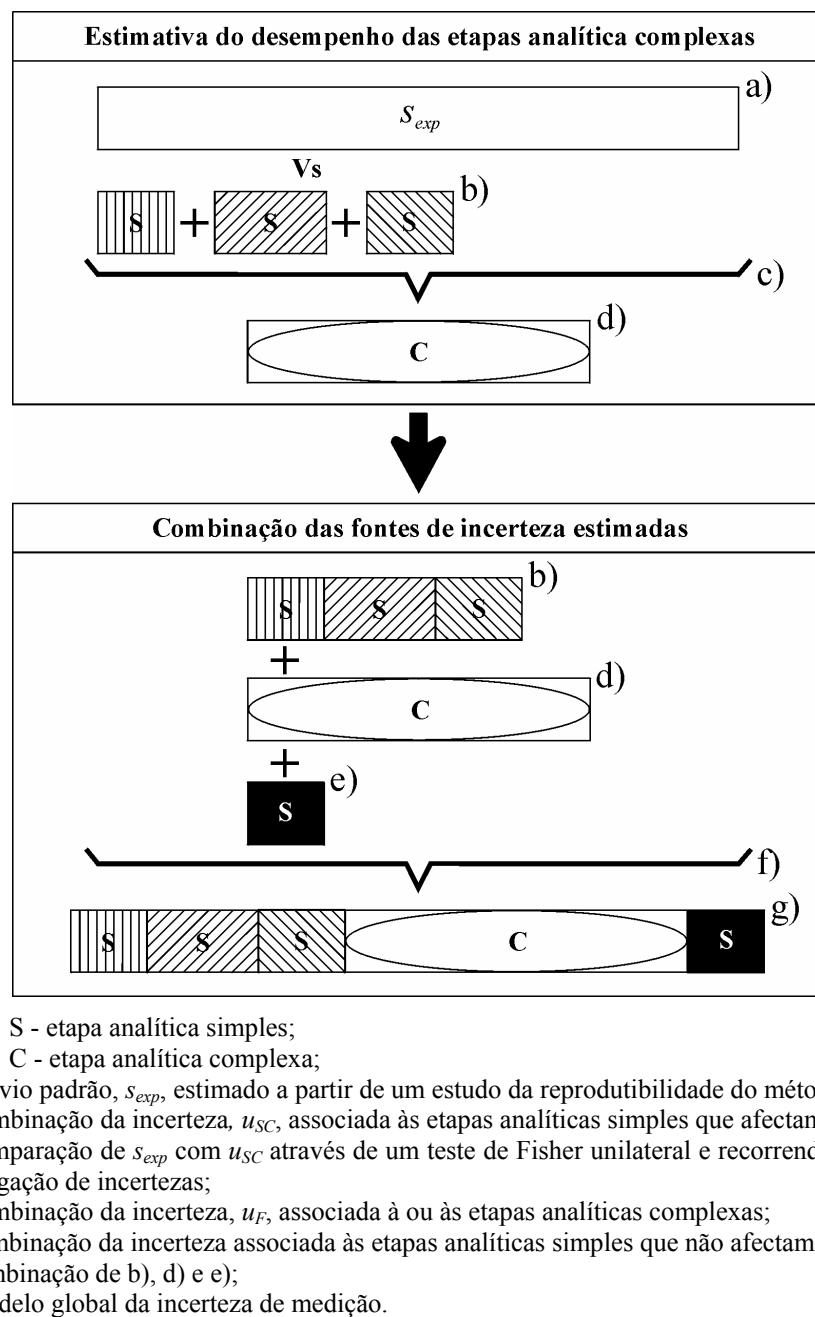
Analisar amostras com teor conhecido em replicado a um ou mais níveis de concentração envolvendo todas as etapas analíticas complexas definidas na Etapa 2. Estimativa da reprodutibilidade,  $s_{exp}$ , (a reprodutibilidade é representada pelo desvio padrão dos resultados dos ensaios) (Figura 2 a) e da exactidão do método analítico. Estes ensaios devem ser realizados num período de tempo suficientemente alargado e envolver todos os equipamentos e operadores disponíveis para o ensaio de forma a avaliar adequadamente a incerteza associada às etapas analíticas estudadas. O conceito de reprodutibilidade referido nesta alínea é equivalente ao conceito de precisão intermédia definido na Norma ISO 5725 [10].

#### 7. Estimativa da incerteza resultante da combinação de todas as fontes de incerteza simples que afectam a estimativa da reprodutibilidade do método

Estimar a incerteza,  $u_{SC}$ , resultante da combinação de todas as fontes de incerteza simples, listadas na Etapa 4 e modeladas na Etapa 5, que afectam a reprodutibilidade,  $s_{exp}$ , do método, estimada na sequência da Etapa 6 (Figura 2 b). A incerteza associada a cada uma das fontes de incerteza simples é estimada com base nos modelos desenvolvidos e recorrendo a dados relevantes dos ensaios experimentais (ex: toma analítica, classe de material volumétrico de vidro usado, leituras dos padrões e amostra em métodos instrumentais de análise, etc.). Estas incertezas são combinadas recorrendo à lei de propagação de incertezas.

#### 8. Comparação da reprodutibilidade do método com a incerteza resultante da combinação das fontes de incerteza simples envolvidas

Comparar a reprodutibilidade do método,  $s_{exp}$ , (Etapa 6) com a incerteza,  $u_{SC}$ , (Etapa 7) resultante da combinação das fontes de incerteza simples que afectam esta dispersão dos resultados (Figura 2 c). A comparação de  $s_{exp}$  com  $u_{SC}$  é efectuada através de um teste de Fisher unilateral para um nível de confiança de 95% com vista a avaliar se  $s_{exp}$  é significativamente maior que  $u_{SC}$ .



**Figura 2.** Representação esquemática da construção do modelo do desempenho do método analítico com base na abordagem diferencial.

#### 9. Estimativa do desempenho das etapas analíticas complexas significativas

Quando  $s_{exp}$  é estatisticamente maior que  $u_{SC}$ , estima-se, por diferença, a incerteza associada à combinação de todas as fontes de incerteza complexas,  $u_F$ , (Figura 2 d) recorrendo à lei de propagação de incertezas. Quando tal não se verifica, pode concluir-se que a combinação das fontes de incerteza simples é suficiente para descrever a dispersão experimental dos resultados e considera-se que todas as outras fontes de incerteza são desprezáveis. Quando existem evidências de que  $u_{SC}$  é estatisticamente maior que  $s_{exp}$  conclui-se que alguma fonte de incerteza simples

foi sobrestimada ou considerada, inadequadamente, como afectando a dispersão experimental dos resultados.

10. Desenvolvimento do modelo do desempenho do método analítico com base nos modelos desenvolvidos do desempenho das etapas analíticas simples e complexas

Definir o modelo do desempenho do método analítico (Figura 2 g) com base na combinação dos modelos desenvolvidos (Figura 2 f) para todas as fontes de incerteza simples (Figuras 2 b e 2 e) e complexas (Figura 2 d) relevantes. Considerar a correcção da exactidão do método analítico se a recuperação (razão entre os valores obtido e esperado) deste for significativamente diferente de 100 % (*teste-t*) e se a correcção da exactidão for concordante com a definição da mensuranda (Etapa 1).

11. Avaliação da adequação do modelo desenvolvido para descrever o desempenho do método analítico ao longo de uma gama de concentrações

Avaliar a adequação do modelo desenvolvido (Etapa 10) para descrever o desempenho do método analítico ao longo de uma gama alargada de concentrações. Esta etapa pode ser cumprida através da avaliação do sucesso da aplicação do referido modelo a ensaios únicos realizados ao longo de uma gama de concentrações ou/e através da comparação dos parâmetros do desempenho das etapas analíticas complexas, estimados a vários níveis de concentração, recorrendo a um *teste-t* e a um *teste-F* [2].

## 2.2 Estimativa da incerteza associada a etapas analíticas complexas significativas

Quando a ou as etapas analíticas complexas têm uma resposta proporcional à quantidade de analito (razão constante entre a resposta obtida e a esperada das etapas analíticas, *i.e.*, recuperação constante), a contribuição destas etapas para a definição da mensuranda pode ser representada pela seguinte expressão multiplicativa:

$$CSC = SC \times F \quad (1)$$

em que *CSC* representa o valor esperado da mensuranda, *SC* o valor estimado da mensuranda com base nos parâmetros associados às etapas analíticas simples que afectam directamente a mensuranda e *F* representa o factor de correcção da exactidão das etapas analíticas complexas. O termo *F* é o inverso da recuperação associada à ou às etapas analíticas complexas. Desta forma, tendo em conta o procedimento descrito na Alínea 2.1, quando a incerteza padrão,  $u_F$ , associada a *F* é significativa, é calculada pela seguinte equação:

$$u_F = F \times \sqrt{\left(\frac{s_{exp} \times F}{CSC}\right)^2 - \left(\frac{u_{SC}}{SC}\right)^2} \quad (2)$$

Esta equação resulta da aplicação da lei de propagação de incertezas à Equação 1, considerando que a incerteza padrão associada a *CSC* é igual à multiplicação do desvio padrão,  $s_{exp}$ , dos resultados dos ensaios replicados, não corrigidos em termos da exactidão das etapas analíticas complexas, pelo factor *F* de correcção da exactidão das mesmas etapas analíticas complexas.

Quando o desempenho das etapas analíticas complexas é descrito por um termo aditivo associado a  $SC$  (Equação 3), a incerteza padrão,  $u_F$ , associada a estas etapas analíticas é calculada pela Equação 4 [2].

$$CSC = SC + F \quad (3)$$

$$u_F = \sqrt{(s_{exp})^2 - (u_{SC})^2} \quad (4)$$

A selecção da Equação 1 ou 3 para descrever a contribuição das etapas analíticas complexas para a definição da mensuranda deve basear-se no conhecimento existente sobre a natureza das etapas analíticas em causa.

Quando as etapas analíticas envolvem sistemas que atingem ou caminham para o equilíbrio químico, é de esperar que a resposta destas seja proporcional à quantidade de analito (ex: extracções, digestões, complexações, oxidações, etc.), e portanto, deve recorrer-se à Equação 1.

Por outro lado, quando determinada etapa analítica tem um efeito claramente aditivo na definição da mensuranda (ex: adição de padrão a uma amostra para a integrar na gama analítica validada ou quantificação da amostra na presença de um interferente), deve recorrer-se às Equações 3 e 4.

Quando a equação seleccionada é significativamente inadequada, não é aplicável com sucesso a uma gama alargada de quantidade de analito e, portanto, o modelo de desempenho do método analítico só é aplicável a um domínio reduzido de quantidade de analito.

### 2.3 Vantagens da abordagem diferencial

A abordagem diferencial para a modelação do desempenho de um método analítico permite desenvolver modelos detalhados do desempenho de métodos bastante complexos aplicáveis numa gama alargada de analito. Desta forma, este modelo pode ser usado na análise de amostras cujo teor coincida com a gama analítica estudada, gama esta que pode ser alargada recorrendo a ensaios a outros níveis de analito.

A aplicação do referido modelo ao longo do tempo deve ser sempre acompanhada pela análise de amostras de controlo, de forma a assegurar a extrapolação das conclusões da validação ao longo do tempo.

A utilização da abordagem diferencial para avaliação do desempenho de determinada etapa analítica complexa crítica tem também diversas vantagens quando comparada com a realização de um estudo baseado numa análise de variâncias (ANOVA) clássica. Estas vantagens, baseiam-se no facto dos ensaios experimentais não terem de se restringir a um nível concentração e não terem de ser programados de forma pouco flexível para um período de tempo normalmente curto, e da significância da etapa analítica em causa poder ser avaliada com um número superior de graus de liberdade para o mesmo número de ensaios experimentais.

A abordagem diferencial permite assim aumentar consideravelmente a quantidade de informação extraída do trabalho experimental com benefícios óbvios para os custos e qualidade do trabalho analítico.

## 2.4 Desvantagens da abordagem diferencial

Apesar da abordagem diferencial envolver a comparação da incerteza padrão combinada,  $u_{SC}$ , com o desvio padrão de resultados de ensaios replicados,  $s_{exp}$ , através de um teste de Fisher, e assim permitir despistar alguns erros grosseiros na estimativa de  $u_{SC}$ , é necessário um empenho elevado no estabelecimento dos modelos associados às diversas fontes de incerteza combinadas em  $u_{SC}$ . Sempre que possível, estes modelos devem também ser controlados com ensaios experimentais (ex: análise de padrões de controlo em métodos instrumentais de análise).

O número de ensaios experimentais realizados com vista a estimar a reprodutibilidade do método analítico deve ser suficientemente elevado para permitir a avaliação da significância das etapas analíticas complexas com um número de graus de liberdade elevado. Esta condição é essencial à detecção e quantificação de todas as etapas analíticas complexas relevantes.

Devido à complexidade dos modelos desenvolvidos pela abordagem diferencial, a aplicação da sua versão detalhada em rotina requer a disponibilização de meios informáticos adequados.

## 3 Aplicação da Abordagem Diferencial à análise de resíduos de pesticidas em maçãs

A Tabela 1 apresenta um exemplo da aplicação da Abordagem Diferencial à análise de resíduos de pesticidas em maçãs. Pode observar-se que esta abordagem permite estimar a incerteza associada a diversas etapas analíticas complexas isoladamente necessária à optimização do método analítico.

## 4 Referências

- [1] – R. J. N. Bettencourt da Silva, M. J. Lino, J. R. Santos, M. F. G. F. C. Camões, *Analyst*, **125** (2000) 1459.
- [2] – R. J. N. Bettencourt da Silva, H. Figueiredo, J. R. Santos, M. F. G. F. C. Camões, *Anal. Chim. Acta*, **477** (2003) 169.
- [3] - R. J. N. Bettencourt da Silva, J. R. Santos, M. F. G. F. C. Camões, *Analyst*, **127** (2002) 957.
- [4] - International Organization for Standardization, *Guide to the expression of uncertainty in measurement*, Genève, Switzerland, 1995.
- [5] – Eurachem, *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, 1st Ed., 1995.
- [6] – Eurachem, CITAC, *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, 2nd Ed., 2000 (www.eurachem.ul.pt).
- [7] – Analytical Methods Committee, *Analyst*, **120** (1995) 2303.
- [8] – S. L. R. Ellison, V. J. Barwick, *Accred. Qual. Assur.*, **3** (1998) 101.
- [9] – Instituto Português da Qualidade, *Vocabulário Internacional de Metrologia – Termos fundamentais e gerais*, 2º Ed., 1996.
- [10] - ISO 5725-3:1994, *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method*, 1st Ed., ISO, Genève, Switzerland, 1994.



**Tabela 1.** Exemplos de incertezas padrão relativas (*Ru*) associadas a diversas etapas analíticas envolvidas na análise de resíduos de pesticidas em maçã.

Analito	Incerteza padrão relativa, <i>Ru</i> , associada a determinada etapa analítica (contribuição para a incerteza de medição excluindo a SS - %) <sup>a</sup>							Resultado ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) <sup>b</sup> ( <i>CRU</i> %)
	SP	SS	G	MTS	V	STD	IP	
$\gamma$ -Clordano	0,098 (89)	ns	$3 \times 10^4$ ( $8 \times 10^{-4}$ )	0,026 (6,1)	0,016 (2,4)	0,014 (1,9)	0,0068 (0,4)	11,1 $\pm$ 2,3 (21)
Deltametrina	0,10	ns	"	ns	"	0,0098	0,027	132 $\pm$ 28 (21)
Diclorano	ns	ns	"	0,064	"	0,014	0,017	8,0 $\pm$ 1,1 (14)
$\alpha$ -Endossulfão	0,10	ns	"	ns	"	0,011	0,012	13,1 $\pm$ 2,7 (21)
$\beta$ -Endossulfão	0,058	ns	"	ns	"	0,011	0,0071	17,1 $\pm$ 2,1 (12)
Endossulfão sulfato	0,13 (94)	ns	" ( $5 \times 10^{-4}$ )	0,026 (3,8)	" (1,5)	0,011 (0,7)	0,0062 (0,2)	24,7 $\pm$ 6,5 (26)
Fenclorfos	0,097 (83)	ns	" ( $8 \times 10^{-4}$ )	0,030 (8,1)	" (2,2)	0,011 (1,1)	0,026 (5,9)	19,5 $\pm$ 4,2 (21)
Fenvalerato	ns	ns	"	0,084	"	0,0098	0,021	123 $\pm$ 22 (18)
Iprodiona	0,092 (76)	ns	" ( $8 \times 10^{-4}$ )	0,040 (15)	" (2,3)	0,0096 (0,8)	0,025 (5,6)	214 $\pm$ 45 (21)
Permetrina	0,092 (72)	ns	" ( $8 \times 10^{-4}$ )	0,053 (24)	" (2,2)	0,0096 (0,8)	0,0053 (0,2)	249 $\pm$ 54 (22)
Tetradifão	0,080 (72)	ns	" ( $1 \times 10^{-3}$ )	0,042 (20)	" (2,8)	0,011 (1,4)	0,019 (4,0)	30,5 $\pm$ 5,8 (19)
Vinclozolina	ns	ns	"	0,067	"	0,011	0,013	20,1 $\pm$ 2,9 (14)
"	ns	ns	"	"	"	"	0,025	21,5 $\pm$ 3,2 (15)
"	ns	ns	"	"	"	"	0,026	227 $\pm$ 34 (15)
"	ns	ns	"	"	"	"	0,017	420 $\pm$ 60 (14)

<sup>a</sup> SS – sub-amostragem; SP – processamento da amostra; G – toma analítica; MTS – etapas de transferência de massa; V- combinação das volumetrias efectuadas sobre o extracto da amostra; STD – obtenção da solução de “stock” mais diluída usada na preparação dos padrões de calibração; IP – interpolação na curva de calibração; *CRU* – incerteza combinada expandida relativa; ns – não significativa; <sup>b</sup> Nível de confiança aproximadamente igual a 95 % (factor de cobertura igual a 2).