

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Exatas - ICEX
Programa de Pós-graduação em Estatística

Thiago Freitas Borgati

**IMPLEMENTAÇÃO DE MODELOS DE REGRESSÃO DEMING PARA
CURVAS DE CALIBRAÇÃO DE CONTAMINANTES EM ALIMENTOS
OBTIDAS POR HPLC-MS-MS**

Belo Horizonte
2022

Thiago Freitas Borgati

**IMPLEMENTAÇÃO DE MODELOS DE REGRESSÃO DEMING PARA
CURVAS DE CALIBRAÇÃO DE CONTAMINANTES EM ALIMENTOS
OBTIDAS POR HPLC-MS-MS**

Versão final

Monografia de Especialização
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Estatística da
Universidade Federal de Minas Gerais
como requisito parcial para obtenção do
título da Especialização em Estatística.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Lopes
de Oliveira

Belo Horizonte
2022

2022, Thiago Freitas Borgati.
Todos os direitos reservados

Borgati, Thiago Freitas.

B934i Implementação de modelos de regressão deming para curvas de calibração de contaminantes em alimentos obtidos por HPL-MS-MS [recurso eletrônico] / Thiago Freitas Borgati— 2022.

1 recurso online (49 f. il, color.): pdf.

Orientador: Guilherme Lopes de Oliveira.

Monografia (especialização) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Estatística.

Referências: 39-40.

1. Estatística. 2. Medição – Química. 3. Planilhas eletrônicas. 4. Análise de regressão. I. Oliveira, Guilherme Lopes de. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Estatística. III. Título.

CDU 519.2 (043)

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Belkiz Inez Rezende Costa
CRB 6/1510 Universidade Federal de Minas Gerais - ICEx

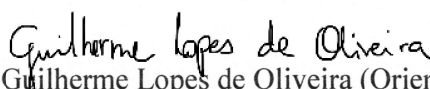


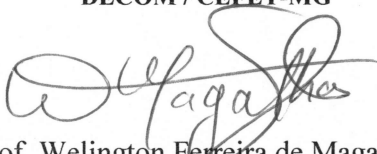
Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Estatística
Programa de Pós-Graduação / Especialização
Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha
31270-901 – Belo Horizonte – MG

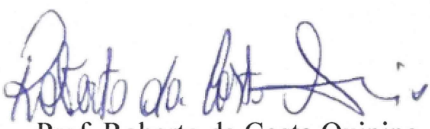
E-mail: pgest@ufmg.br
Tel: 3409-5923 – FAX: 3409-5924

ATA DO 262^a. TRABALHO DE FIM DE CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM ESTATÍSTICA DE THIAGO FREITAS BORGATI.

Aos quinze dias do mês de dezembro de 2022, às 14:00 horas, com utilização de recursos de videoconferência a distância, reuniram-se os professores abaixo relacionados, formando a Comissão Examinadora homologada pela Comissão do Curso de Especialização em Estatística, para julgar a apresentação do trabalho de fim de curso do aluno **Thiago Freitas Borgati**, intitulado: “Implementação de modelos de regressão Deming para curvas de calibração de contaminantes em alimentos obtidas por HPLC-MS-MS”, como requisito para obtenção do Grau de Especialista em Estatística. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Professor Guilherme Lopes de Oliveira – Orientador, após dar conhecimento aos presentes do teor das normas regulamentares, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa do candidato. Após a defesa, os membros da banca examinadora reuniram-se sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foi atribuída a seguinte indicação: o candidato foi considerado Aprovado condicional às modificações sugeridas pela banca examinadora no prazo de 30 dias a partir da data de hoje por unanimidade. O resultado final foi comunicado publicamente o candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente Ata, que será assinada por todos os membros participantes da banca examinadora. Belo Horizonte, 15 de dezembro de 2022.


Prof. Guilherme Lopes de Oliveira (Orientador)
DECOM / CEFET-MG


Prof. Wellington Ferreira de Magalhães
Departamento de Química / ICEX / UFMG


Prof. Roberto da Costa Quinino
Departamento de Estatística / ICEX / UFMG

Roberto da Costa
Quinino:80871291720
71291720

Assinado de forma digital por Roberto da Costa
Quinino:80871291720
Dados: 2022.12.19 09:52:48 -03'00'



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Estatística
Programa de Pós-Graduação / Especialização
Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha
31270-901 – Belo Horizonte – MG

E-mail: pgest@ufmg.br
Tel: 3409-5923 – FAX: 3409-5924

DECLARAÇÃO DE CUMPRIMENTO DE REQUISITOS PARA CONCLUSÃO DO CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM ESTATÍSTICA.

Declaro para os devidos fins que Thiago Freitas Borgati, número de registro 2021678649, cumpriu todos os requisitos necessários para conclusão do curso de Especialização em Estatística e que entregou para seu orientador, o professor Guilherme Lopes de Oliveira, que aprovou a versão final. O trabalho foi apresentado no dia 15 de dezembro de 2022 com o título “*Implementação de modelos de regressão Deming para curvas de calibração de contaminantes em alimentos por HPLC-MS-MS*”.

Belo Horizonte, 19 de janeiro de 2022

A handwritten signature in blue ink, reading "Roberto da Costa Quinino".

Prof. Roberto da Costa Quinino
Coordenador do curso de
Especialização em Estatística
Departamento de Estatística / UFMG

Resumo

Este trabalho descreve a construção de uma planilha automatizada de cálculo contendo seis modelos de regressão Deming empregados para se processar os dados de análise de um método empregado para se analisar medicamentos veterinários em urina de bovino, utilizando-se da técnica hifenada HPLC-MS-MS. Os modelos de regressão Deming diferem dos modelos de regressão linear usuais por levar em conta a variabilidade da variável independente na construção do modelo, além da variabilidade da variável resposta. Um fator importante nesse tipo de modelagem é denominado λ e representa a razão entre as variâncias da variável independente e da variável resposta. Os modelos ajustados foram divididos em dois grupos: homocedásticos e heterocedásticos. Em cada um dos casos foram utilizadas diferentes maneiras de se definir o valor de λ : regressão ortogonal ($\lambda = 1$); abordagem com λ estimado teoricamente (utilizando-se dos resultados obtidos via da regressão ortogonal); e outra abordagem com o λ estimado utilizando-se de dados experimentais (para a variável resposta foi utilizada a variabilidade da resposta instrumental e para a variável independente a variância foi estimada propagando-se a incerteza pela abordagem *bottom-up*). Avaliou-se, também, a contribuição da incerteza do material de referência certificado (MRC), empregado na construção da curva, ao resultado final. Todos os seis modelos ajustados foram comparados ao modelo univariado empregado atualmente na rotina do laboratório. A comparação foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis e não se observaram diferenças estatísticas ao nível de significância de 5%. Assim, atesta-se que a contribuição da variabilidade da variável independente na construção do modelo de regressão não é significativa e, portanto, pode-se continuar empregando o modelo univariado atualmente utilizado sem prejuízo metrológico. Adicionalmente, também se avaliou a contribuição da incerteza do MRC à construção dos modelos de regressão linear. Foi observado que, ainda que o desvio padrão da pureza do MRC alcance 100% do seu valor nominal, não se pode rejeitar a hipótese nula de igualdade dos resultados (para $\alpha = 5\%$) quando os mesmos são comparados ao caso em que a incerteza da pureza do MRC é tão pequena quanto 0,15%. Assim, conclui-se que a pureza do MRC não influencia na concentração final das amostras analisadas. Este trabalho avaliou dois problemas práticos de um laboratório acreditado na norma ISO 17025 e forneceu argumentos úteis a questionamentos de auditorias.

Palavras-chaves: análise de alimentos, HPLC-MS-MS, regressão Deming, MRC, incerteza.

Abstract

We describe the construction of a spreadsheet containing six bivariate (Deming) regression models used to analyze data on veterinary drugs in bovine urine detected using the tandem technique HPLC-MS-MS. Bivariate Deming models differ from usual regression models by also accounting for the variability of the independent variable in the construction of the model. The factor that takes into account this parcel is called λ which is given by the ratio of the variance of the independent variable to the response one. The models were divided into two groups: weighted and unweighted. Each of them was subdivided into orthogonal regression ($\lambda = 1$), two Deming regressions, one with λ theoretically estimated (using the orthogonal regression data) and another with λ estimated using experimental data (for the response variable, the variability of the instrumental response was used and for the independent variable the variance was estimated by propagating the uncertainty by the bottom-up approach). The contribution of the certified reference material (CRM) uncertainty, used in the construction of the curve, to the final result was also evaluated. All six bivariate models were compared to the univariate model used in the routine (weighted least squares method). The comparison was performed using the Kruskal-Wallis test and no statistical differences were observed among the results. Thus, it suggests that the contribution of the variability of the independent variable to the construction of the regression model is not significant for this data and, therefore, it is possible to remain using the univariate model without any metrological questioning. Additionally, the contribution of CRM uncertainty to the construction of the linear regression model was also evaluated. It was observed that, even though the standard deviation of the CRM purity reaches 100% of its nominal value, the null hypothesis of equality of results cannot be rejected when they are compared to the case in which the uncertainty of the CRM purity is as low as 0,15%. Thus, it was concluded that the CRM purity does not influence the final concentration of the analyzed sample. This work evaluated two practical problems of a laboratory accredited to the ISO 17025 and provided useful arguments for audit queries.

Keywords: food analysis, HPLC-MS-MS, Deming regression, CRM, uncertainty estimation.

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1: comparação entre três modelos distintos de regressão, um correspondendo à regressão usual, $y = f(x)$ (y on x), outro correspondendo à função inversa, $x = f(y)$ (x on y), e o caso bivariado (true).	21
Figura 2: Parâmetros do modelo de regressão Deming homocedástico com $\lambda = 4$, obtidos do manual do <i>software</i> NCSS.	30
Figura 3: Parâmetros do modelo de regressão Deming homocedástico, com $\lambda = 4$, obtidos na planilha Excel construída neste trabalho.	30
Figura 4: Parâmetros do modelo de regressão Deming heterocedástico, com $\lambda = 4$, obtidos do <i>software</i> NCSS.	30
Figura 5: Parâmetros do modelo de regressão Deming, heterocedástico, com $\lambda = 4$, obtidos na planilha Excel construída neste trabalho.	31

Lista de tabelas

	Pág.
Tabela 1: Resumo dos métodos Deming implementados.	24
Tabela 2: valores das variáveis independente e resposta provenientes do manual do software NCSS, que foram utilizadas na validação dos modelos homocedásticos.	25
Tabela 3: Valores das variáveis independente e resposta, provenientes da análise de rotina laboratorial, que foram utilizadas na validação dos modelos heterocedásticos.	26
Tabela 4: dados utilizados para se calcular λ a partir da estimativa dos valores “verdadeiros”.	27
Tabela 5: valores de λ para os seis diferentes modelos de regressão implementados.	28
Tabela 6: Valores estimados, desvio-padrão (sd) e intervalos de confiança (IC) de 95% para os interceptos (a) e inclinação (b) da equação da reta associada à resposta Y estimados a partir dos seis modelos de regressão Deming implementados.	32
Tabela 7: Valores das triplicatas dos três níveis de concentração empregados nas comparações dos modelos.	33
Tabela 8: Valores de concentração estimados para cada uma das concentrações da Tabela 7 em cada um dos modelos de regressão avaliados. As concentrações foram calculadas considerando-se as inclinações e interceptos, ainda que este último não seja significativo.	33
Tabela 9: Valores de concentração estimados para cada uma das concentrações da Tabela 7 em cada um dos modelos de regressão avaliados. As concentrações foram calculadas considerando-se somente a inclinação, uma vez que o intercepto foi considerado não significativo.	34
Tabela 10: Valores calculados para as concentrações de três replicatas, em três níveis diferentes de concentração, variando-se a pureza do MRC de 0,15% a 100%.	36
Tabela 11: estimativa da incerteza, pela abordagem <i>bottom-up</i> , da concentração intermediária das abcissas.	45
Tabela 12: Avaliação dos modelos de regressão linear construídos com a simplificação da abordagem de estimativa de incerteza.	47

Sumário

	Pág.
I Introdução	11
I.1 Descrição do problema a ser abordado	11
I.2 Objetivo do trabalho	11
I.3 Justificativa para realização do trabalho	12
II Revisão da literatura	13
II.1 Análise de resíduos e contaminantes em alimentos	13
II.2 Curvas de calibração	16
II.3 O processo de mensuração e a estimativa da incerteza	16
III Metodologia	20
III.1 Regressão Deming	20
III.2 Bases de dados	24
IV Resultados e discussões	27
IV.1 Definição dos valores de λ	27
IV.2 Validação dos modelos implementados	28
IV.3 Comparação dos ajustes gerados pelos modelos	31
IV.4 Avaliação da incerteza do material de referência certificado	35
V Considerações finais	37
Referências	39
Apêndice A - Métodos de propagação de incertezas de curva de calibração	41
Apêndice B - Equações empregadas na construção dos modelos de regressão via MMQO e MMQP	48

I Introdução

I.1 Descrição do problema a ser abordado

Em qualquer trabalho de medição é fundamental que a expressão do resultado final seja acompanhada de uma incerteza estimada, levando-se em conta todas as contribuições de variabilidade das medidas que impactam diretamente no mensurando. Quanto mais complexa a medição, mais numerosas serão as fontes de incerteza e, portanto, mais elaboradas devem ser as estratégias empregadas em suas estimativas.

Este trabalho aborda a análise de resíduos e contaminantes em alimentos, mais especificamente a prospecção de drogas veterinárias usadas como hormônios promotores de crescimento animal. Na análise de resíduos em alimentos, utilizando-se da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial, é imperativo se avaliar a contribuição da variabilidade (incerteza) da variável independente do modelo de regressão, que é utilizado para se estimar a concentração do resíduo ou contaminante. Adicionalmente, como uma das fontes de contribuição à incerteza da variável independente, é importante se avaliar o impacto da incerteza da pureza de um material de referência certificado na resposta do mensurando, já que isso pode ser empregado como uma avaliação crítica da qualidade de um determinado padrão.

I.2 Objetivo do trabalho

Este trabalho é o aprimoramento de um trabalho anterior que teve por objetivo a elaboração de planilhas eletrônicas em Excel que serão usadas para se obter estimativas de incertezas por meio das abordagens *top-down* e *bottom-up* empregadas nas análises de rotina de um laboratório de análise de alimentos. Mais especificamente, o problema prático abordado tratará do estudo da relação entre a concentração de um medicamento veterinário (dietilestilbestrol) e a resposta instrumental de um espectrômetro de massas, empregado na análise desse composto em amostras de urina de bovino.

Propõe-se o refinamento do tipo de técnica de regressão empregada atualmente no laboratório, utilizando-se dos modelos bivariados (que computam as fontes de variabilidade tanto da variável independente quanto da variável resposta), e a avaliação da contribuição da incerteza do material de referência certificado à curva de calibração.

I.3 Justificativa para a realização do trabalho

Apesar de haver vasta literatura sobre o tema regressão linear, o uso dessa abordagem ainda é desafiador quando se trabalha com algum processo complexo, como é o caso das técnicas acopladas de cromatografia líquida e espectrometria de massas. Neste contexto, há uma grande demanda pela elaboração de planilhas automatizadas de regressão linear, associadas à estimativa de incerteza, a fim de se nortear o processo de tomada de decisão de laboratórios. Adicionalmente, para laboratórios que são acreditados na norma de qualidade ISO 17025, alguns detalhes precisam ser mais refinadamente considerados, como a consideração da variabilidade da variável independente à regressão, valendo-se de um método bivariado, e o critério para se empregar um material de referência certificado. Assim, a planilha que será o produto deste trabalho, que é um aprimoramento de um trabalho anterior (BORGATI, 2018), atenderá à uma demanda objetiva de qualidade laboratorial, segundo os requisitos da norma ISO 17025, assegurando a manutenção da acreditação do laboratório nesta norma, com o objetivo final de se manter acordos comerciais firmados.

II Revisão da literatura

II.1 Análise de resíduos e contaminantes em alimentos

Devido à crescente pressão global pelo aumento da produtividade do setor agropecuário, a indústria química vem intensificando o desenvolvimento de novas substâncias promotoras de crescimento animal. Dentre elas destacam-se os esteróides com atividades estrogênicas, androgênicas e progesterônicas. Essas substâncias com atividade hormonal (anabolizantes) são representadas por diferentes classes (estilbenos, tireostáticos, esteróides, corticosteróides e lactonas do ácido resorcílico) e são utilizadas com o objetivo de se melhorar a eficiência da conversão alimentar, aumentando a massa muscular em detrimento do conteúdo de gordura. O uso desses compostos é muito difundido na pecuária de corte e pode deixar resíduos nos tecidos dos animais que são utilizados como alimentos pelos seres humanos.

Os hormônios esteróides fazem parte do grupo de compostos EDC (*endocrine disrupting compounds*) que interferem na saúde humana e animal. Dentre os problemas causados à saúde humana por esses compostos destacam-se a incidência de determinados tipos de câncer como o de próstata, o de testículo e o de mama (BALABANIC *et al.*, 2017), além de doenças relacionadas ao metabolismo (obesidade), à reprodução humana, à tireóide, problemas cardiovasculares e doenças do sistema neuroendocrinológico (TAPIA-OROZCO *et al.*, 2017). Assim, devido à toxicidade desses compostos para os seres humanos, seu uso é controlado em diversos países, como, por exemplo, nos países da União Europeia, onde os anabolizantes são classificados como pertencentes ao Grupo A (Anexo I da Diretiva 96/22/CE), ou seja, compostos de uso proibido. No Brasil, o uso de substâncias com ação anabolizante é proibido em animais de abate desde a década de 1980 e o controle desses, e de outros contaminantes, é realizado com base nas diretrizes do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), criado pela Instrução Normativa N° 42 de 20/12/1999, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Dessa forma, justifica-se o investimento crescente, no setor agropecuário, em tecnologias de monitoramento mais eficientes e sensíveis, capazes de detectar vestígios de contaminantes em alimentos a nível de traços (até partes por quintilhão). Dentre as técnicas com performance adequada para atender essa nova exigência, destacam-se as cromatografias gasosa e líquida acopladas à espectrometria de massas (ROCHA *et al.*, 2017a; ROCHA *et al.*, 2017b; CALDEIRA *et al.*, 2017).

A cromatografia é uma técnica físico-química de separação de compostos que se baseia na migração diferencial dos constituintes de uma mistura devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, uma móvel e outra estacionária. Atualmente, existe grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias, tornando essa técnica muito versátil. Os seus principais usos são para caracterizar e quantificar compostos (comparando-os a padrões), e para a purificação (ou separação) de compostos de uma mistura. Uma das técnicas cromatográficas de grande aplicação atualmente é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC, sigla para *High Performance Liquid Chromatography*, CASS e CASSIANO, 2015; COLLINS *et al.*, 1993).

De todas as técnicas empregadas na análise de resíduos (artificiais) e contaminantes (naturais) em alimentos a espectrometria de massas é a mais indicada para se monitorar níveis de traço. Além de se alcançarem limites de detecção muito baixos, a análise química por essa técnica é relativamente rápida, tornando-a apropriada a uma infinidade de aplicações, como o monitoramento de fármacos nas mais diversas matrizes, além da prospecção por drogas veterinárias, pesticidas, metais, e vários outros resíduos e contaminantes presentes nos alimentos (HOFFMANN e STROOBANT, 2007). Poder-se-ia pensar que o analisador de massas dispensa a cromatografia, já que ele é mais sensível. Contudo, realiza-se o acoplamento entre a cromatografia e a espectrometria de massas de tal maneira a se obter uma técnica ainda mais sensível e seletiva (BORGATI, 2018). Outra justificativa ao uso da cromatografia se dá pelo fato da espectrometria de massas não possibilitar a discriminação de enantiômeros.

Adicionalmente, como aplicável para todas as medições metrológicas, é importante que as incertezas envolvidas no processo de análises sobre as quantidades de resíduos e contaminantes sejam estimadas a fim de se nortear as tomadas de decisões com base nos resultados (MGQA, 2011). Neste trabalho, objetivou-se aplicar algumas técnicas de regressão linear multivariada (ortogonal e Deming, ordinárias e ponderadas), algumas delas dependentes de algum tipo de estimativa de incerteza, a fim de se refinar a técnica de regressão linear empregada na estimação de tais quantidades, atendendo a uma demanda de qualidade da norma ISO 17025.

A norma de qualidade ISO 17025 (2017) enumera um conjunto de práticas (de gestão e técnicas) que são necessárias para se assegurar que um laboratório tenha competência na execução de ensaios e calibração. Acordos comerciais de reconhecimento de competência demandam tal norma a fim de que seus produtos ofertados sejam adequadamente produzidos e/ou inspecionados. Para o Brasil, um dos maiores produtores e exportadores de alimentos, o

reconhecimento de uma rede de laboratórios em análise de alimentos, acreditada na ISO 17025, é fundamental para a manutenção desses acordos (rede LFDA – Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária). Assim, é imperativo o atendimento a todos os requisitos desta norma.

Dentre os requisitos dispostos na ISO 17025 (2017), tem-se a demanda pela identificação de todas as contribuições à incerteza do mensurando (item 7.6.1). Isso inclui, mas não se limita, a computar as contribuições advindas da curva de calibração empregada, que é definida pelo VIM (2012) como sendo a expressão da relação entre um valor estimado e o valor medido correspondente. Adicionalmente, a mesma referida norma, no seu requisito 6.5.2.a, também demanda que, à medida do possível, ou seja, havendo a disponibilidade comercial, um material de referência certificado deve ser empregado nas análises para se assegurar que os resultados sejam rastreáveis ao Sistema Internacional de Unidades (SI). Um material de referência certificado (MRC) é definido, também pelo VIM, como sendo todo aquele que é acompanhado de uma documentação emitida por uma entidade reconhecida, a qual fornece um ou mais valores de propriedades especificadas com as incertezas e as rastreabilidades associadas, utilizando-se de procedimentos válidos. Assim, um MRC de medicamentos veterinários, por exemplo, seria todo aquele produzido de acordo com a norma ISO 17034, que discorre sobre todos os testes que devem ser realizados para se levantar as contribuições à incerteza (estabilidade, homogeneidade, dentre outros), além de demais requisitos.

Portanto, dentre outras contribuições à incerteza final do mensurando, é preciso se atentar para a contribuição da incerteza do MRC. Essa incerteza também é fundamental para se obter o modelo de regressão, quando se faz uso da abordagem bivariada. Todavia, ainda que haja vasta literatura sobre abordagens de estimativa de incerteza (MAGALHÃES, 2020; MGQA, 2011; ALBERTAZZI e SOUSA, 2018; GUM 2008), poucos trabalhos se detêm na discussão da contribuição da incerteza da variável independente à composição da incerteza do mensurando (MAGALHÃES, 2021). Por isso mesmo, se utiliza da regressão bivariada, em que tanto a variável resposta quanto a variável independente são tratadas como variáveis aleatórias, para se alcançar tal objetivo, mas antes de entrar nesse tópico é preciso contextualizar o problema dos tipos de curva de calibração empregados e das abordagens mais usuais para se estimar a incerteza de calibração.

II.2 Curvas de calibração

Para se quantificar um composto químico, idealmente, deve-se utilizar de uma curva de calibração. A curva é obtida preparando-se soluções de concentrações crescentes, e conhecidas, e obtendo-se uma resposta instrumental. Essa resposta pode ser referente a diversos tipos de equipamentos, como o analisador de massas, por exemplo. Tendo-se feito isso, tratam-se os dados estatisticamente a fim de se ajustar uma função, como uma reta, por exemplo.

Existem basicamente três tipos de curvas: a curva de calibração do analito em solução (CCAS), a curva de calibração da matriz branca fortificada (CCMBF) e curva de calibração do extrato da matriz branca fortificado (CCEMBF). No primeiro caso, o analito é dissolvido em um solvente apropriado e, com a resposta instrumental para as amostras, obtém-se, por interpolação e manipulação algébrica (considerando-se todas as etapas de preparo de amostra), a concentração do analito nas mesmas. No terceiro caso, o analito é dissolvido em um extrato da matriz branca (ou seja, uma matriz sem qualquer traço do analito alvo) e o processo de obtenção da concentração do analito na amostra é o mesmo explicado para o primeiro caso. Já para o segundo caso, CCMBF, a curva é preparada diretamente em uma amostra branca, seguindo-se exatamente todos os passos de preparo das amostras: diluições, concentrações, extrações, dentre outras (MGQA, 2011). Ou seja, nesta abordagem, a concentração prevista para o analito na curva já é a concentração final a ser reportada. Assim, interpolando-se a resposta instrumental das amostras nesta última curva de calibração se obtém de imediato, sem qualquer manipulação posterior, a concentração do analito.

Essas diferentes técnicas de elaboração da curva de calibração se fazem necessárias, pois pode haver um efeito de matriz, ou seja, algum composto espúrio presente na matriz pode apresentar resposta instrumental semelhante, o que pode retornar uma variabilidade que não é a real do processo. A abordagem CCEMBF de construção da curva de calibração é a que será adotada neste trabalho. A diferença entre as curvas afeta a função de medição, que é a equação que correlaciona as grandezas de entrada, retornando o valor estimado da grandeza de saída (VIM, 2012). Portanto, somente após se definir o tipo de curva empregada é que se pode começar o planejamento da estimativa da incerteza.

II.3 O processo de mensuração e a estimativa da incerteza

A medição pode ser definida como o processo de se obter experimentalmente o valor de uma quantidade (mensurando). Em química, o mensurando geralmente é o conteúdo

(concentração) de alguma entidade química (molécula, elemento, íon, dentre outros) em alguma amostra. A entidade química que se pretende determinar é chamada de analito. Alguns exemplos de medidas em química são: a concentração de chumbo em uma amostra de água, o teor de anabolizantes em uma amostra de carne ou a porcentagem de gordura em uma garrafa de leite.

Na menção anterior, o chumbo (elemento), os anabolizantes (moléculas) e a gordura (grupo de moléculas diferentes) são os analitos. Água, carne e leite são as amostras (HARRIS, 2012). Em princípio, o objetivo de uma medição é obter o valor verdadeiro do mensurando, sendo todo esforço despendido para se otimizar o procedimento de medição. Contudo, para se alcançar tal resultado, seria necessário um número infinito de medições (VIM 2012) o que, obviamente, não é possível. Sendo assim, o resultado da medição será apenas uma estimativa do valor verdadeiro. Portanto, não é possível saber exatamente quão próximo o valor medido estará do valor verdadeiro, já que sempre haverá uma incerteza associada a ele (ALBERTAZZI e SOUSA, 2018).

A diferença entre o valor medido e o valor verdadeiro é denominada de erro sistemático. Essa diferença pode assumir valores positivos ou negativos. Já o erro máximo pode ser considerado como uma combinação de duas componentes, sendo uma aleatória e outra sistemática. Como o valor verdadeiro não é conhecido, o erro máximo também não o será. Portanto, o mesmo não pode ser usado na prática para caracterizar a qualidade de um resultado de medição, ao se avaliar sua concordância com o valor verdadeiro. Já a qualidade do resultado da medição, sua precisão, é caracterizada pela incerteza de medição (erro aleatório ou, simplesmente, incerteza), que define um intervalo em torno do valor medido em que o valor verdadeiro se encontra com alguma probabilidade.

A incerteza de medição pode ser definida como a metade da largura de tal intervalo, e é sempre positiva. Além disso, ela está associada a alguma probabilidade sendo que não é possível definir o intervalo de incerteza de tal forma que o valor verdadeiro esteja dentro dele com 100% de probabilidade (MONTGOMERY e RUNGER, 2016). Concluindo, a incerteza de medição é diferente do erro sistemático, pois não expressa uma diferença entre dois valores e não possui um sinal. Sendo assim, ela não pode ser usada para se corrigir o resultado de medição, já que é considerada uma estimativa do erro aleatório (MONTGOMERY e RUNGER, 2016; VIM 2012).

Se o procedimento de medição utilizado for bem conhecido, as fontes de incerteza mais importantes são, geralmente, também conhecidas. Esforços devem ser feitos para minimizar

essas fontes a fim de se otimizar o procedimento de medição. As fontes de incerteza que não puderem ser eliminadas (e nunca é possível eliminar todas as fontes de incerteza) devem ser levadas em conta na estimativa de incerteza. Contudo, as magnitudes reais dos desvios causados pelas fontes de incerteza, em muitos casos, não podem ser conhecidas e, por isso, elas geralmente são estimadas.

Simplificadamente, as fontes de incerteza podem ser divididas em efeitos aleatórios e efeitos sistemáticos. Todavia, essa distinção não é tão simples haja visto a dependência temporal dessa classificação (uma variável tida como sistemática em um pequeno intervalo de tempo pode se tornar aleatória se mais medições, em um intervalo de tempo maior, forem realizadas). De qualquer forma, neste trabalho essa distinção não será realizada e todas as fontes de incerteza, independente da sua natureza, serão tratadas da mesma maneira, ou seja, serão consideradas como aleatórias.

Se for possível estimar as magnitudes de todas as fontes importantes de incerteza, é possível combiná-las e obter a estimativa da incerteza de medição, que nesse caso será chamada de incerteza de medição combinada. A incerteza combinada, neste trabalho, será dada pela raiz quadrada da soma de cada contribuição ao quadrado. Considerando-se a função de distribuição de probabilidade do mensurando, pode-se aplicar um fator de abrangência à incerteza combinada obtida a fim de se expressar a incerteza expandida desejada, a qual considera a probabilidade de ocorrência do resultado em uma região que depende da abrangência, expressa em porcentagem.

Duas das estratégias mais simples para se estimar as incertezas de medições indiretas são as abordagens *bottom-up* e a *top-down* (ISO GUM 2008; NORDTEST, 2012). Enquanto a primeira demanda um profundo conhecimento de todas as fontes de incerteza e leva em conta as contribuições individuais de cada variável, bem como suas eventuais correlações (ALBERTAZZI e SOUSA, 2018), a segunda não objetiva quantificar todas as contribuições, mas sim utilizar um menor número de variáveis, e todas as suas fontes de incerteza. A maioria dessas variáveis advém da validação dos métodos analíticos (MGQA, 2011; NORDTEST, 2012).

Neste trabalho, será utilizada a estimativa de incerteza utilizando-se da técnica *bottom-up* para se estimar a incerteza de medição da variável independente (concentração do analito), empregada na construção do modelo de regressão Deming. Dessa forma, todas as contribuições à variabilidade da concentração dos pontos da curva, incluindo o desvio padrão (incerteza) da pureza do MRC, serão computadas. Com isso, poder-se-á estimar a razão entre a variabilidade

das variáveis independente e resposta do modelo de regressão. Isso se faz necessário, pois se avaliará dois tipos de modelos Deming: o modelo ortogonal, que é construído pressupondo-se iguais variâncias entre as duas variáveis, e o modelo não-ortogonal, que pressupõe que essas variâncias não são iguais. Por isso, faz-se necessário estimar a razão entre elas e uma das formas empregadas neste trabalho para isso foi realizar a propagação de incerteza, conforme será descrito no Apêndice A.

III Metodologia

III.1 Regressão Deming

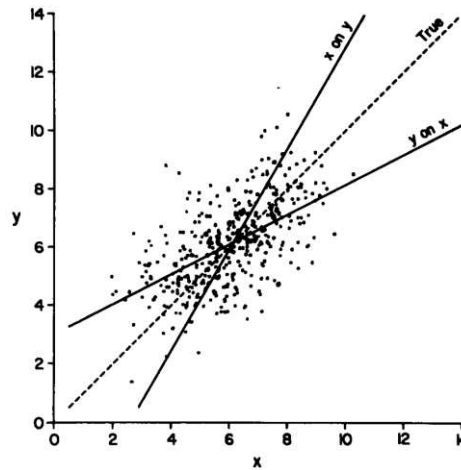
Para se estimar a relação entre uma variável independente e outra resposta, pode-se utilizar de uma estratégia de regressão linear. O modelo de regressão linear simples univariado assume que apenas a variável resposta Y é passível de erro aleatório, e a variável explicativa X é completamente observada e fixada, tal que:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_i + \varepsilon_i \quad (1)$$

onde o erro aleatório é assumido como independente, com distribuição normal com média 0 e variância constante σ^2 . A grande desvantagem dos métodos univariados, dado na Equação (1), é que eles negligenciam a incerteza da variável independente. Em alguns casos práticos isso pode até ser aceitável, uma vez que a incerteza da variável independente pode impactar muito pouco na variável final (MAGALHÃES, 2021). Contudo, não se pode assumir isso de antemão, baseado em um trabalho diferente já que, como toda suposição, é preciso verificar se a mesma é adequada e, para isso, é necessário, em uma das abordagens de teste, construir o modelo sem simplificações.

Quando se aplica uma regressão linear univariada no caso em que ambas as variáveis contêm algum erro aleatório de medição, a estimativa da inclinação fica subestimada. Ainda que houvesse uma troca, para fins de modelagem matemática, entre as variáveis resposta e independente, essa estimativa ficaria superestimada (Figura 1). Qualquer modelo que tente computar a incerteza nas duas variáveis retornará curvas entre esses dois extremos (RIGGS *et al.*, 1978). Adicionalmente, se somente a variável resposta apresentasse alguma fonte de erro aleatório, ou incerteza de medição, seriam observados pontos espalhados acima e abaixo da reta proposta para a regressão linear, para cada valor da variável independente. Contudo, para o caso em que as duas variáveis possuem incertezas de medição, esses pontos ficam espalhados ao longo de uma região bidimensional, como é o caso ilustrado na Figura 1. De toda forma, é importante ressaltar que, independente da função empregada (direta ou inversa) a incerteza de medição sempre seria subestimada.

Figura 1: comparação entre três modelos distintos de regressão, um correspondendo à regressão usual, $y = f(x)$ (y on x), outro correspondendo à função inversa, $x = f(y)$ (x on y), e o caso bivariado (true).



Fonte: RIGGS *et al.*, 1978.

A abordagem Deming para a construção de um modelo de regressão foi originalmente proposta por W. Edward Deming em 1948. Nesta abordagem, ambas as variáveis (resposta e independente) apresentam um erro aleatório (incerteza). Assim, as medidas (x_i, y_i) se relacionam aos seus respectivos valores verdadeiros (X_i', Y_i') da seguinte forma:

$$x_i = X_i' + \varepsilon_i \quad (2)$$

$$y_i = Y_i' + \delta_i \quad (3)$$

$$\lambda = V(\varepsilon_i) / V(\delta_i) \quad (4)$$

$$Y_i' = \beta_0 + \beta_1 \cdot X_i' \quad (5)$$

A soma dos quadrados dos resíduos a ser minimizada é dada por:

$$SS = \sum_{i=1}^N [(x_i - X_i')^2 + \lambda \cdot (y_i - \beta_0 - \beta_1 \cdot X_i')^2] \quad (6)$$

Para o caso ponderado, ainda é preciso inserir o fator de ponderação w_i . Esse fator é um componente matemático de ajuste que privilegia os pontos de menor concentração:

$$w_i = \frac{1}{\left[\frac{x_i + \lambda y_i}{1 + \lambda} \right]^2} \quad (7)$$

$$SSw = \sum_{i=1}^N w_i [(x_i - X_i')^2 + \lambda (y_i - \beta_0 - \beta_1 \cdot X_i')^2] \quad (8)$$

Os erros aleatórios de x e y são supostos normalmente distribuídos (ainda que essa condição não seja essencial) e independentes com média zero, havendo a possibilidade de estimação dos parâmetros no caso homocedástico (σ_x e σ_y constantes para todos os níveis) e heterocedástico (σ_x e σ_y não constantes para os diferentes níveis), o que é feito, respectivamente, pelo Método de Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO) e pelo Método de Mínimos Quadrados Ponderados (MMQP).

O aspecto principal que diferencia a regressão Deming de outro processo é o fator λ , que é computado no modelo (Jensen, 2007; NCSS, 2022). Ele é a razão entre as variâncias das incertezas de x e y , e pode ser suposto constante. Ainda que o primeiro método desenvolvido para lidar com essa situação tenha sido publicado em 1877 (AL-SHARADQAH et. al, 2013, VAN HUFFEL e LEMMERLING, 2002), vários outros foram propostos ao longo dos anos, o que forneceu uma vasta gama de opções, cada uma com seus pontos fortes e fracos.

As abordagens utilizadas neste trabalho para se estimar o valor de λ são descritas a seguir:

1) Abordagem 1:

Quando as variâncias são supostas iguais, o modelo de regressão de Deming torna-se uma regressão ortogonal: ela minimiza a soma das distâncias quadradas perpendiculares dos pontos à linha de regressão. Este é um método razoável quando o método de medição para X e Y for o mesmo. Contudo, em casos gerais, a igualdade das variâncias seria uma suposição que precisaria ser verificada para se atestar que a regressão fora executada de maneira adequada. O modelo Deming ortogonal, isto é, assumindo $\lambda=1$, foi construído neste trabalho para fins de comparação.

2) Abordagem 2:

Uma vez que a regressão Deming ortogonal fornece bons estimadores para as variâncias de X_i e Y_i , propôs-se se utilizar das variâncias estimadas obtidas após a aplicação do caso ortogonal. Isto é, neste caso, o valor de λ foi calculado como sendo a razão entre as variâncias estimadas obtidas através da Abordagem 1.

3) Abordagem 3:

Outra abordagem para se obter o valor de λ foi estimar a incerteza das respostas experimentais. Para Y, utilizaram-se das respostas instrumentais para se estimar a variância (o equipamento lê três vezes a mesma amostra, ou uma vez três amostras independentes, e, após isso, a variância é calculada). Para X, a situação foi um pouco mais complexa, sendo necessário se estimar a incerteza de preparo da curva de calibração por meio da propagação de incerteza usando o método bottom-up. A razão entre os valores estimados da variância de X e Y foi usado como valor de λ . Detalhes sobre o método de propagação da incerteza (bottom-up) estão disponíveis no Apêndice A.

Neste trabalho, serão consideradas diferentes especificações do modelo de regressão Deming, variando o critério usado para se estimar o valor de λ (entre as Abordagens 1, 2 e 3) e o método de estimação (entre o MMQO e o MMQP). As expressões da função a ser minimizada na estimação via MMQO e MMQP, bem como as equações resultantes para os estimadores pontuais em cada caso são apresentadas no Apêndice B. Um resumo dos modelos considerados na produção das planilhas eletrônicas está descrito na Tabela 1.

Tabela 1: Resumo dos métodos Deming implementados.

Modelo	Definição de λ	Método de estimação	Observações
1. Deming ortogonal homocedástico	Assumidos $\sigma_\varepsilon^2 = \sigma_\delta^2$ $\lambda = 1$ (Abordagem 1)	MMQO	-
2. Deming não ortogonal homocedástico I	σ_ε e σ_δ obtidos a partir da Deming ortogonal (Abordagem 2)	MMQO	A Deming ortogonal estima os valores de x e y. A partir deles, se obtém as respectivas variâncias. A variância de y é obtida a partir das respostas instrumentais e a variância de x é obtida propagando-se a incerteza (<i>bottom-up</i>).
3. Deming não ortogonal homocedástico II	σ_ε e σ_δ estimados experimentalmente (Abordagem 3)	MMQO	A variância de y é obtida a partir das respostas instrumentais e a variância de x é obtida propagando-se a incerteza (<i>bottom-up</i>).
4. Deming ortogonal heterocedástico	Assumidos $\sigma_\varepsilon^2 = \sigma_\delta^2$ $\lambda = 1$ (Abordagem 1)	MMQP	O peso w_i é dado pela Equação 7.
5. Deming não ortogonal heterocedástico I	σ_ε e σ_δ obtidos a partir da Deming ortogonal (Abordagem 2)	MMQP	A Deming ortogonal estima os valores de x e y. A partir deles, se obtém as respectivas variâncias. O peso w_i é dado pela Equação 7.
6. Deming não ortogonal heterocedástico II	σ_ε e σ_δ estimados experimentalmente (Abordagem 3)	MMQP	A variância de y é obtida a partir das respostas instrumentais e a variância de x é obtida propagando-se a incerteza (<i>bottom-up</i>). O peso w_i é dado pela Equação 7.

Fonte: Elaborado pelo autor.

III.2 Bases de dados

Todos os modelos descritos na Tabela 1 serão implementados em Excel e aplicados aos conjuntos de dados apresentados nas Tabelas 2 e 3.

Os dados da Tabela 2 são provenientes do manual de instruções do software NCSS (link nas referências). Os pares ordenados (x,y) desse conjunto não têm qualquer sentido químico e, portanto, são adimensionais. Eles foram propostos somente para se exemplificar a execução da aplicação. Eles foram considerados para fins de validação da implementação realizada para os modelos de regressão Deming homocedásticos: ortogonal homocedástico (Modelo 1), não-ortogonal homocedástico I (Modelo 2) e não-ortogonal homocedástico II (Modelo 3). Para tal, os resultados obtidos com a aplicação destes modelos através da planilha Excel foram

comparados com os resultados constantes no manual do software NCSS, os quais foram obtidos valendo-se do mesmo procedimento.

Tabela 2: valores das variáveis independente e resposta provenientes do manual do software NCSS, que foram utilizadas na validação dos modelos homocedásticos.

x	y
7,0	7,9
8,3	8,2
10,5	9,6
9,0	9,0
5,1	6,5
8,2	7,3
10,2	10,2
10,3	10,6
7,1	6,3
5,9	5,2

Fonte: *NCSS Statistical Software manual*.

Já os dados da Tabela 3 são dados da rotina provenientes de análises fiscais reais, sendo que X representa a concentração e Y representa a resposta instrumental obtida no espectrômetro de massas, que é a razão entre a área do sinal do analito e a área do padrão interno do mesmo analito, porém deuterado. Assim, as ordenadas são adimensionais. Esses foram considerados para fins de validação da implementação realizada para os modelos de regressão Deming heterocedásticos: ortogonal heterocedástico (Modelo 4), não-ortogonal heterocedástico I (Modelo 5) e não-ortogonal heterocedástico II (Modelo 6). Para tal, os resultados obtidos com a aplicação destes modelos através da planilha implementada no Excel foram comparados com os resultados obtidos após a aplicação de tais modelos no software NCSS. Foi utilizada licença gratuita temporária de 30 dias para a obtenção dos resultados através do software.

Tabela 3: Valores das variáveis independente e resposta, provenientes da análise de rotina laboratorial, que foram utilizadas na validação dos modelos heterocedásticos.

x (ppb)	y (adimensional)
0,5	0,25
0,5	0,25
0,5	0,18
0,75	0,35
0,75	0,38
0,75	0,27
1	0,41
1	0,44
1	0,47
1,25	0,52
1,25	0,52
1,25	0,58
1,5	0,68
1,5	0,73
1,5	0,64
2	1
2	0,94
2	0,9

Fonte: Elaborado pelo autor.

IV Resultados

IV.1 Definição dos valores de λ

Como mencionado anteriormente, para se construir o modelo de regressão é preciso se estimar o valor de λ (Equação 4). Para o modelo de regressão Deming ortogonal, Modelo 1, esse valor é suposto como sendo um (Abordagem 1), ou seja, as variâncias das variáveis resposta e independente são iguais. Já para os modelos Deming não-ortogonais, tal parâmetro precisa ser estimado. Isso foi feito de duas maneiras diferentes (Abordagens 2 e 3), conforme resumido na Tabela 1. Para a Abordagem 2, foram utilizadas as equações 29 e 30, do Apêndice B, para se estimar os valores de x e de y (estimativa dos valores “verdadeiros”) e, conseqüentemente, os resíduos e suas variâncias, a partir da regressão ortogonal. A variância é obtida como o quadrado do desvio padrão que, por sua vez, é calculado como o somatório da diferença entre as medidas e a média, diferença essa elevada ao quadrado. Em seguida, divide-se por $N-1$, em que N é o número de medidas, e, por fim, extrai-se a raiz quadrada.

Tabela 4: dados utilizados para se calcular λ a partir da estimativa dos valores “verdadeiros”.

Xi	Yi	Xi' estim.	Yi' estim.
7,0	7,9	7,784545864	7,704097486
8,3	8,2	8,283877803	8,204025742
10,5	9,6	9,842235905	9,764244878
9,0	9,0	9,06315221	8,98423078
5,1	6,5	6,286073267	6,203835371
8,2	7,3	7,54443171	7,463696581
10,2	10,2	10,26200657	10,18451685
10,3	10,6	10,60173919	10,52465518
7,1	6,3	6,525424573	6,443472518
5,9	5,2	5,406512906	5,323224615

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a Abordagem 2, modelo construído após a aplicação da abordagem Deming ortogonal, os valores empregados para as variâncias de X e de Y foram $0,000294 \text{ ppb}^2$ e $0,000068$ (adimensional), respectivamente, para o caso homocedástico. A unidade de λ ,

portanto, é ppb^2 , contudo a unidade foi suprimida nas representações para não poluir a representação, dado que esse parâmetro não tem sentido químico. Assim, o valor de λ foi fixado como sendo 4,32, neste caso. Já para o caso heterocedástico, o valor de λ obtido foi 4,70.

Para a Abordagem 3, o cálculo de λ foi realizado propagando-se a incerteza de medição da concentração dos pontos da curva de calibração por meio da metodologia bottom-up (detalhes a respeito da técnica são apresentados no Apêndice A). O desvio-padrão de X foi estimado como sendo 0,00237149 ppb. Assim, a variância vale 0,000005624 ppb^2 . Para Y, obteve-se uma variância de 0,03179 (adimensional) ao quadrado, o que implica em $\lambda = 0,0001769$.

A Tabela 5 traz um resumo dos valores de λ empregados nos modelos de regressão. Somente sob a Abordagem 2 (cálculo de λ usando o modelo ortogonal para estimar as variâncias de X e Y) é que o valor de λ diverge entre os casos homocedástico e heterocedástico. Para as outras duas abordagens, ou λ é fixado igual a 1 ou é calculado com base nos dados experimentais e, portanto, não é influenciado pelos dados de regressão. A razão (λ) das estimativas de variância foram utilizadas nas planilhas implementadas e no software NCSS.

Tabela 5: valores de λ para os seis diferentes modelos de regressão implementados.

Modelo	λ
Deming Ortogonal (homocedástico e heterocedástico): variâncias iguais	1
Deming não-ortogonal I (homocedástico): variâncias calculadas considerando-se a estimativa obtida sob o modelo ortogonal	4,32
Deming não-ortogonal I (heterocedástico): variâncias calculadas considerando-se a estimativa obtida sob o modelo ortogonal	4,70
Deming não-ortogonal II (homocedástico e heterocedástico): variâncias calculadas por propagação de incertezas	0,00018

Fonte: Elaborado pelo autor.

IV.2 Validação dos modelos implementados

Após estimar os diferentes valores de λ , procedeu-se à validação dos modelos implementados em Excel. Essa atividade consistiu na comparação dos valores obtidos na planilha do Excel construída neste trabalho com aqueles obtidos no *software* comercial NCSS. Para o caso homocedástico, o valor obtido na planilha foi comparado com resultados que já

constavam no manual do NCSS 2022 e, para o caso heterocedástico, procedeu-se à comparação com o valor obtido após a aplicação no *software* diretamente (disponibilizado por um mês para avaliação gratuita).

O que diferenciava a construção de um modelo do outro era apenas o valor de λ . Então, para fins de comparação com o manual do *software*, a validação ocorreu para $\lambda = 4$ (valor utilizado na instrução de uso do *software*). Os resultados obtidos no *software* NCSS e os resultados obtidos na planilha implementada em Excel são apresentados, respectivamente, nas Figuras 2 e 3 para o caso homocedástico e nas Figuras 4 e 5 para o caso heterocedástico. Como é possível observar, os valores estimados para as inclinações e interceptos, e dos seus respectivos erros padrões, foram semelhantes. Somente para o caso heterocedástico é que se observou uma diferença entre eles, sendo a maior delas inferior a 1%. Isso pode ser justificado, provavelmente, à alguma diferença de abordagem numérica empregada no NCSS e no Excel. Talvez, as séries empregadas para se realizar os cálculos foram truncadas com um número de termos diferentes e, como o modelo heterocedástico envolveu mais etapas de cálculo, provavelmente houve uma maior propagação das diferenças numéricas, o que gerou essa pequena discrepância entre os modelos. De toda forma, ainda assim, tanto os modelos de regressão Deming homocedásticos quanto os heterocedásticos implementados foram considerados satisfatoriamente validados.

Poder-se-ia questionar qual é o ganho de se desenvolver uma planilha que faz o mesmo que um software já programado para executar. Primeiramente, há o fator custo, dado que os softwares que realizam esse tratamento ou são pagos ou não estão acessíveis no Brasil (CCC do Instituto de Metrologia da Itália ou o XLGENLINE do NPL do Reino Unido, por exemplo). Em segundo lugar, o objetivo deste trabalho é desenvolver um produto que efetivamente seja aplicado à uma rotina laboratorial. Nesse caso, devido à elevada carga de trabalho, sempre que possível é desejável que as ações sejam automatizadas e que elas sejam o mais simples possíveis. O laboratório para o qual a planilha está sendo desenvolvida já tem a capacidade de integrar os seus equipamentos à alimentação dos dados em uma planilha de excel de maneira automática. Assim, processando-se os dados nessa planilha, sem qualquer intervenção do usuário, se ganha tempo de análise, propriamente. Dessa forma, toda a etapa de aquisição de dados, compilação, processamento, cálculo dos resultados e reportagem ficam independentes do operador. Outra vantagem dessa abordagem é que se eliminam os eventuais erros de transcrição de dados nas etapas mencionadas.

Figura 2: Parâmetros do modelo de regressão Deming homocedástico com $\lambda = 4$, obtidos do manual do *software* NCSS.

Regression Coefficient Estimation Report

Regression Coefficient Estimation					
Parameter	Regression Coefficient b(i)	Jackknife Standard Error SE[b(i)]	DF	Lower 95% Conf. Limit of $\beta(i)$	Upper 95% Conf. Limit of $\beta(i)$
Intercept	-0.08974	1.72199	8	-4.06065	3.88117
Slope (X)	1.00119	0.18718	8	0.56956	1.43283

The T-value used to calculate the confidence limits was 2.30600, with N-2 = 8 degrees of freedom.

Estimated Model
 $Y = -0.0897448990070444 + 1.00119422781949 * X$

Fonte: *NCSS Statistical Software manual*.

Figura 3: Parâmetros do modelo de regressão Deming homocedástico, com $\lambda = 4$, obtidos na planilha Excel construída neste trabalho.

Cálculo dos SE's para as regressões Deming e ortogonal não ponderadas						
	$\lambda =$	$b =$	$a =$	Escolha		média teta b 0,99766486
1 - Ortogonal	4	1,00119423	-0,0897449	$\lambda = 4$		v b 0,35035249
2 - Deming 1	0,99761582	0,94217703	0,39183542	b = 1,00119423		SE b 0,18717705
3 - Deming 2	1,004E-06	0,86162352	1,04915209	a = -0,0897449		média teta a -0,094738
						v a 29,6551767
						SE a 1,72206785

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4: Parâmetros do modelo de regressão Deming heterocedástico, com $\lambda = 4$, obtidos do *software* NCSS.

The screenshot displays the NCSS 2022 interface with a 'Deming Regression Report' window open. The report shows the following key data:

- Dataset:** Untitled
- Data Reg. Type:** Weighted
- Descriptive Statistics:**

Variable(s)	N	Mean	Error SD	Error Variance	Error COV
Y: C2	10	8.08	1.00000	1.00000	0.12376
X: C1	10	8.16	2.00000	4.00000	0.24510
- Error Variance Ratio:** Error Variance Ratio (λ) = 4.00000
- Regression Coefficient Estimation:**

Parameter	Regression Coefficient b(i)	Jackknife Standard Error SE[b(i)]	DF	Lower 95% Conf. Limit of $\beta(i)$	Upper 95% Conf. Limit of $\beta(i)$
Intercept	-0.32838	1.97434	8	-4.88121	4.22446
Slope (C1)	1.03123	0.22020	8	0.52344	1.53902
- Estimated Model:** $Y = -0.328376138786767 + 1.03122798996277 * X$
- Hypothesis Test of $Y = X$:** The T-value used to calculate the confidence limits was 2.30600, with N - 2 = 8 degrees of freedom.

Fonte: *NCSS Statistical Software*.

Figura 5: Parâmetros do modelo de regressão Deming, heterocedástico, com $\lambda = 4$, obtidos na planilha Excel construída neste trabalho.

Cálculo dos SE's para as regressões Deming e ortogonal não ponderadas									
	$\lambda =$	$b =$	$a =$					média teta bi	1,05629881
4 - Ortogonal	4	1,03092733	-0,3251205	Escolha	4			v b	0,47926805
5 - Deming 1	0,94090093	0,9226275	0,54507707	$\lambda =$	4			SE b	0,21892192
6 - Deming 2	1,004E-06	0,78144069	1,6849625	$b =$	1,03092733			média teta ai	-0,5316531
				$a =$	-0,3251205			v a	38,4514624
								SE a	1,96090444

Fonte: Elaborado pelo autor.

IV.3 Comparação dos ajustes gerados pelos modelos

Os seis modelos de regressão descritos na Tabela 1 foram comparados entre si e com o modelo atualmente já utilizado na rotina do laboratório, que é um modelo heterocedástico, em que os pesos são definidos como sendo o inverso da variância das respostas instrumentais.

Inicialmente, a comparação foi feita considerando-se as estimativas pontuais e os intervalos de confiança (IC) de 95% obtidos para os interceptos e inclinações das equações das retas estimadas para a resposta Y a partir de cada um dos modelos. Os resultados dessa comparação inicial são apresentados na Tabela 6. Os dados empregados para todos os modelos são os dados experimentais apresentados na Tabela 3. O valor de $t_{1-\alpha, N-2}$ utilizado para se estimar os intervalos de confiança dos interceptos e das inclinações é $t_{0,95; 16} = 2,12$, a um nível de significância de 5%. Assim, os intervalos de confiança foram construídos da seguinte maneira:

$$\phi \pm t_{1-\alpha, N-2} \cdot SE(\phi) \quad (9)$$

$$\phi \pm 2,12 \cdot SE(\phi)$$

em que o desvio-padrão $SE(\phi)$ é estimado utilizando-se do método de Jackknife (Equação 42 do Apêndice B).

Observando-se os ICs apresentados na Tabela 6 fica claro que eles não diferem estatisticamente para um nível de significância de 5%, comparação essa feita para os conjuntos de inclinação e intercepto separadamente. Além disso, também é possível observar que os intervalos de confiança para o intercepto contêm o valor zero, ou seja, para $\alpha = 5\%$, a hipótese nula h_0 ($b_i = 0$) não pode ser rejeitada. Assim, o intercepto não é significativo nos modelos avaliados. Por outro lado, analisando-se os intervalos de confiança das inclinações, é possível observar que nenhum deles contêm o valor zero e, portanto, a hipótese nula de que eles seriam

iguais a zero pode ser descartada. Essa também é uma outra maneira de se avaliar a linearidade de um modelo de regressão linear.

Tabela 6: Valores estimados, desvio-padrão (sd) e intervalos de confiança (IC) de 95% para os interceptos (a) e inclinação (b) da equação da reta associada à resposta Y estimados a partir dos seis modelos de regressão Deming implementados.

Modelo	Interc. (a)	sd (a)	IC para o intercepto (a)	Inclin. (b)	sd (b)	IC para a inclinação (b)
0. Heterocedástico (já utilizado na rotina)	-0,029	0,046	[-0,127; 0,068]	0,474	0,038	[0,393; 0,555]
1. Deming ortogonal homocedástico	-0,033	0,039	[-0,115; 0,049]	0,481	0,033	[0,412; 0,550]
2. Deming não ortogonal homocedástico I	-0,038	0,040	[-0,122; 0,046]	0,486	0,033	[0,415; 0,556]
3. Deming não ortogonal homocedástico II	-0,030	0,038	[-0,111; 0,051]	0,479	0,032	[0,411; 0,547]
4. Deming ortogonal heterocedástico	-0,013	0,047	[-0,113; 0,088]	0,461	0,038	[0,381; 0,542]
5. Deming não ortogonal heterocedástico I	-0,025	0,051	[-0,131; 0,082]	0,472	0,041	[0,386; 0,558]
6. Deming não ortogonal heterocedástico II	-0,006	0,044	[-0,098; 0,087]	0,456	0,035	[0,383; 0,528]

Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a construção dos modelos e a avaliação de suas linearidades, é preciso avaliar se as respostas estimadas para a concentração de uma amostra são equivalentes sob todas as abordagens. Para isso, avaliaram-se as respostas em triplicata e em três níveis diferentes: no início da curva de calibração, no ponto intermediário (que equivale ao limite de tomada de decisão) e no ponto extremo superior da curva. Nos estudos de validação realizados, em que se avaliaram 20 respostas instrumentais em cada nível, verificou-se que os resultados são normalmente distribuídos, ou seja, poder-se-ia comparar os resultados utilizando-se de testes paramétricos (ainda que para se obter a regressão a normalidade dos resíduos não seja uma condição fundamental). Contudo, as comparações das estimativas das médias serão realizadas valendo-se de abordagens não-paramétricas, já que serão utilizadas apenas três observações dentro de cada nível de comparação. Os dados empregados nesta avaliação são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Valores das triplicatas dos três níveis de concentração empregados nas comparações dos modelos.

Replicata	Resposta instrumental
Nível 1 - a	0,25
Nível 1 - b	0,20
Nível 1 - c	0,18
Nível 2 - a	0,41
Nível 2 - b	0,43
Nível 2 - c	0,48
Nível 3 - a	0,89
Nível 3 - b	0,99
Nível 3 - c	0,92

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os dados foram processados em cada uma das sete curvas de calibração, ou seja, sob os sete modelos descritos na Tabela 6, considerando-se dois casos: com o intercepto e sem ele. Os respectivos valores para as concentrações das replicatas são apresentados nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8: Valores de concentração estimados para cada uma das concentrações da Tabela 7 em cada um dos modelos de regressão avaliados. As concentrações foram calculadas considerando-se as inclinações e interceptos, ainda que este último não seja significativo.

	0. Heterocedástico	1. Deming ortogonal homocedástico	2. Deming não ortogonal homocedástico I	3. Deming não ortogonal homocedástico II	4. Deming ortogonal heterocedástico	5. Deming não ortogonal heterocedástico I	6. Deming não ortogonal heterocedástico II
Nível 1 - a	0,589	0,588	0,593	0,585	0,570	0,582	0,561
Nível 1 - b	0,483	0,485	0,490	0,481	0,461	0,476	0,451
Nível 1 - c	0,441	0,443	0,449	0,439	0,418	0,434	0,407
Nível 2 - a	0,926	0,921	0,923	0,920	0,917	0,921	0,912
Nível 2 - b	0,968	0,962	0,964	0,961	0,960	0,963	0,956
Nível 2 - c	1,074	1,066	1,067	1,066	1,068	1,069	1,066
Nível 3 - a	1,939	1,918	1,912	1,922	1,957	1,938	1,966
Nível 3 - b	2,149	2,126	2,118	2,131	2,174	2,150	2,185
Nível 3 - c	2,002	1,980	1,973	1,985	2,022	2,002	2,031

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 9: Valores de concentração estimados para cada uma das concentrações da Tabela 7 em cada um dos modelos de regressão avaliados. As concentrações foram calculadas considerando-se somente a inclinação, uma vez que o intercepto foi considerado não significativo.

	0. Heterocedástico	1. Deming ortogonal homocedástico	2. Deming não ortogonal homocedástico I	3. Deming não ortogonal homocedástico II	4. Deming ortogonal heterocedástico	5. Deming não ortogonal heterocedástico I	6. Deming não ortogonal heterocedástico II
Nível 1 - a	0,527	0,519	0,515	0,522	0,542	0,530	0,549
Nível 1 - b	0,422	0,416	0,412	0,418	0,433	0,424	0,439
Nível 1 - c	0,380	0,374	0,371	0,376	0,390	0,381	0,395
Nível 2 - a	0,865	0,852	0,844	0,856	0,889	0,869	0,900
Nível 2 - b	0,907	0,893	0,886	0,898	0,932	0,911	0,944
Nível 2 - c	1,012	0,997	0,989	1,002	1,040	1,017	1,053
Nível 3 - a	1,877	1,849	1,833	1,859	1,929	1,886	1,953
Nível 3 - b	2,088	2,057	2,039	2,067	2,146	2,098	2,173
Nível 3 - c	1,940	1,911	1,895	1,921	1,994	1,950	2,019

Fonte: Elaborado pelo autor.

Inicialmente, compararam-se os valores de concentrações estimados nas Tabelas 8 e 9, a fim de se avaliar se a exclusão do intercepto (realizada devido à presença do valor zero no IC, ao nível de significância de 5%) impactaria nos resultados. Os valores estimados por estas duas abordagens foram comparados utilizando-se do teste não paramétrico de Wilcoxon/Mann-Whitney para a igualdade de médias. Nenhuma das comparações, para cada um dos três níveis de concentração, se mostrou diferente quando os resultados foram gerados utilizando-se das curvas de calibração com o intercepto e sem ele. Assim, para as avaliações posteriores, serão utilizadas as curvas sem os interceptos.

A análise de equivalência entre as respostas estimadas sob todas as sete abordagens envolve a comparação entre mais de dois grupos. As suposições necessárias para que a ANOVA (paramétrica) pudesse ser aplicada foram de que os valores avaliados fossem independentes, normalmente distribuídos e que as variâncias fossem constantes e comuns para cada nível do fator estudado. Para se avaliar isso, poder-se-ia se utilizar dos testes de Durbin-Watson, Shapiro-Wilk e Levene. Contudo, como se utilizou somente de triplicatas, os resultados poderiam ficar comprometidos.

Sem considerar a validade de tais suposições, os valores foram comparados utilizando-se do teste de Kruskal-Wallis, que é um teste não-paramétrico para comparação de $k > 2$ amostras não-pareadas. Para as comparações nos três níveis de concentração não se observaram

diferenças estatísticas, ao nível de 5%, uma vez que todos os p-valores para a comparação das concentrações foram superiores a esse percentual. Assim, a hipótese nula de que as concentrações obtidas nos sete modelos geram estimativas de concentração das amostras similares não pode ser rejeitada para nenhum dos três níveis de concentração avaliados.

Portanto, uma vez que as concentrações reportadas nos três níveis não diferiram estaticamente, a um nível de significância de 5%, nos sete modelos de regressão avaliados, pode-se afirmar que para os dados empregados neste estudo a consideração da incerteza da variável independente na construção dos modelos de regressão não impactou no resultado final. Isso é um indicativo de que se pode utilizar qualquer um dos métodos de regressão para a obtenção da concentração das amostras, podendo-se, inclusive, continuar se utilizando do modelo atual (o qual assume incerteza apenas para a variável Y) fazendo-se as estimativas através do método dos mínimos quadrados ponderados para a construção das curvas de calibração empregadas nas análises do medicamento veterinário em questão, utilizando-se das técnicas hífenadas de cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas com analisador do tipo triplo-quadrupolo.

IV.4 Avaliação da incerteza do material de referência certificado

O impacto da incerteza da pureza do MRC (material de referência certificado, empregado para se preparar as soluções padrão de calibração, ou seja, as abscissas das curvas) na composição do resultado final também foi avaliado. Para se avaliar tal efeito, a porcentagem de pureza foi computada ao modelo de regressão pela consideração desse parâmetro na estimativa de λ (Abordagem 3). Os valores de concentração calculados, variando-se o desvio padrão da pureza, são apresentados na Tabela 10. Para todos os três níveis avaliados, o teste de Kruskal-Wallis retornou p-valor maior que 5% (nível de significância). Assim, a hipótese nula de que as médias são iguais não pode ser rejeitada. Portanto, conclui-se que a incerteza da pureza de um MRC não impacta nos resultados, mesmo quando o desvio padrão da pureza alcançar 100% do valor declarado.

Tabela 10: Valores calculados para as concentrações de três replicatas, em três níveis diferentes de concentração, variando-se a pureza do MRC de 0,15% a 100%.

Pureza do MRC	0,15%	1%	5%	10%	25%	50%	100%
Nível 1 - a	0,56094	0,56098	0,56191	0,56449	0,57518	0,58593	0,59176
Nível 1 - b	0,45121	0,45125	0,45231	0,45527	0,46780	0,48093	0,48830
Nível 1 - c	0,40731	0,40736	0,40847	0,41159	0,42485	0,43893	0,44692
Nível 2 - a	0,91209	0,91211	0,91262	0,91400	0,91878	0,92192	0,92282
Nível 2 - b	0,95598	0,95600	0,95646	0,95769	0,96173	0,96392	0,96420
Nível 2 - c	1,06572	1,06573	1,06606	1,06690	1,06910	1,06891	1,06766
Nível 3 - a	1,96553	1,96550	1,96477	1,96251	1,94957	1,92989	1,91600
Nível 3 - b	2,18500	2,18496	2,18397	2,18095	2,16432	2,13989	2,12291
Nível 3 - c	2,03137	2,03134	2,03053	2,02804	2,01400	1,99289	1,97807

Fonte: Elaborado pelo autor.

Poder-se-ia, então, questionar sobre a real necessidade de se adquirir um MRC, dado que o seu custo é maior exatamente pelo fato de ser preparado sob os requisitos de uma norma de qualidade (ISO 17034), ou seja, com incerteza de medição rigorosamente estimada e, na maioria dos casos, menor que a de um produto que não é MRC. Todavia, justamente por possuir um maior rigor no preparo, a confiabilidade da pureza declarada é maior. Isso é relevante, pois a pureza é utilizada para se calcular as concentrações empregadas como abscissas dos modelos de regressão e, por isso, pode afetar a concentração calculada das amostras. Por exemplo: se a pureza real do MRC utilizado no preparo da curva de calibração for menor do que a declarada, os valores de concentração calculados para as amostras serão superestimados. Por fim, é pertinente ressaltar que o uso do MRC assegura a rastreabilidade da medição ao sistema internacional de unidades.

V Considerações finais

Foram construídos seis modelos de regressão Deming (três homocedásticos e três heterocedásticos) variando-se a razão (λ) entre as variâncias das variáveis independente e resposta. Para os casos ortogonais, o valor λ é 1. Já para os casos das regressões Deming, o valor de λ foi calculado considerando-se a estimativa para os valores “verdadeiros” obtidos a partir da regressão ortogonal. Adicionalmente, estimou-se o valor de λ também a partir de valores experimentais (razão entre a variância de x, estimada pela abordagem *bottom-up*, e a variância de y, calculada considerando-se a variância das respostas instrumentais). Todos os modelos apresentaram inclinações estatisticamente significativas, para $\alpha = 5\%$, atestando-se se tratar de uma regressão linear, e interceptos não significativos, estatisticamente.

Os seis modelos bivariados construídos, juntamente com o modelo univariado já utilizado na rotina analítica do laboratório (mínimos quadrados ponderado pelo inverso das variâncias das replicatas de cada concentração) foram comparados quanto às suas respostas para três amostras, analisadas em triplicata, com concentrações variando do menor nível da curva ao último, passando pelo ponto intermediário que é onde se toma a decisão quanto à violação de uma amostra (de acordo com os níveis indicados para cada analito, nas diferentes legislações e recomendações mundiais). Os resultados foram comparados estatisticamente utilizando-se do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, para o qual não se observaram diferenças estatísticas significantes (para $\alpha = 5\%$) em nenhum dos modelos, em nem um dos três níveis de concentração.

Assim, conclui-se que os modelos de regressão Deming ajustados retornam a mesma resposta que o modelo univariado já empregado na rotina. Ou seja, a incerteza da variável independente (concentração), quando computada ao modelo de regressão linear, não contribui para que os resultados sejam estatisticamente diferentes (para $\alpha = 5\%$) dos obtidos valendo-se do método univariado.

O outro objetivo deste trabalho foi avaliar a contribuição da incerteza da pureza de um MRC, empregado para se construir a curva de calibração, à concentração final calculada. Para isso, utilizou-se do modelo Deming heterocedástico e com o λ estimado experimentalmente (por se tratar do modelo mais robusto, dado que as suposições de uso são as menos restritivas) para se construir modelos de regressão com o desvio-padrão da pureza do MRC variando nos seguintes percentuais: 0,15%, 1%, 5%, 10%, 25%, 50% e 100%. Cada um desses modelos foi

utilizado para se estimar a concentração de triplicatas de amostras avaliadas em três níveis diferentes, de forma análoga à realizada para se comparar os modelos bivariados.

Para esse último experimento, observou-se que mesmo variando-se a incerteza da pureza em 100% os valores reportados para as concentrações das triplicatas de amostras, analisadas em três diferentes níveis, não diferiram estatisticamente (para $\alpha = 5\%$), utilizando-se do teste de Kruskal-Wallis. Assim, pode-se afirmar que a incerteza da pureza do MRC é irrelevante ao cálculo das concentrações das amostras. Todavia, é importante ressaltar que, ainda que o maior preço do MRC advinha do fato dele ser preparado com um maior rigor metrológico, a fim de se obter uma menor incerteza, esse produto apresenta maior confiabilidade no seu cálculo de pureza, o que efetivamente afeta nos valores de concentração calculados pelos modelos de regressão linear.

Dessa forma, este trabalho atingiu os seus objetivos e contribuirá para o aprimoramento da política de qualidade do laboratório no que se refere ao atendimento aos requisitos da norma de qualidade ISO 17025. As planilhas implementadas em Excel foram validadas e poderão servir na rotina do laboratório quando tais modelos precisarem ser ajustados.

Como possibilidades de uma expansão deste trabalho tem-se a estimativa da incerteza das amostras pelas abordagens bottom-up, pelo método numérico de Kragten e pela simulação de Monte Carlo. Adicionalmente, também seria interessante comparar os três métodos ao top-down, já utilizado na rotina do laboratório, e, por fim, avaliar o impacto da incerteza da pureza do MRC na incerteza final. Como última sugestão de trabalho futuro, tem-se o estudo e implementação de um modelo de regressão Deming em que o λ seja estimado para cada um dos pontos da curva de calibração.

Referências

ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017, Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração.

AL SHARADQAH, A.; CHERNOV, N.; HUANG, Q. Errors-in-variables regression and the problem of moments. *Brazilian Journal of Probability and Statistics*. 27 (401-415). **2013**.

ALBERTAZZI, A. G. Jr.; SOUSA, A. R. Fundamentos de metrologia científica e industrial, 2ª edição, Editora Manole, **2018**.

BALABANIC, D.; FILIPIC, M.; KLEMENCIC, A. K.; ZEGURA, B. Raw and biologically treated paper mill wastewater effluents and the recipient surface waters: Cytotoxic and genotoxic activity and the presence of endocrine disrupting compounds. *Science of the Total Environment*, 574 (78-89), **2017**.

BORGATI, T. F. Estimativa da incerteza de dois métodos cromatográficos utilizando-se das abordagens top-down e bottom-up. Trabalho de conclusão de curso de graduação em Engenharia Mecânica. UFMG, Belo Horizonte. **2018**.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária, Instrução Normativa Nº 42 de 20 de dezembro de 1999. PNCRC - Plano Nacional de Controle de Resíduos em produtos de origem animal, Diário Oficial da União de 22 de dezembro de 1999. Seção 1, página 213. Brasília, **1999**.

CALDEIRA, L.; LIMA, J.; SANTOS, F.; LANA, M.; RIBEIRO, A. C. S. R.; OLIVEIRA, E. LC-MS/MS quantification of ractopamine in bovine and swine muscle: stability of matrix-matched calibration solutions. *Accreditation and Quality Assurance*, 91-96 (22), **2017**.

CASS, Q. B.; CASSIANO, N. Cromatografia líquida novas tendências e aplicações. 1a e. Elsevier Editora Ltda, **2015**.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L; BONATO, P.S. Introdução a métodos cromatográficos. 5a ed. Campinas: Editora da Unicamp, **1993**.

DEMING, W. E. Statistical Adjustment of Data. John Wiley and Sons. 4ª edição. Londres, **1948**.

European Commission, Council Directive 96/22/EC of 29 April 1996, Off. J. EU L125 (**1996**).

HARRIS, D. C. Análise Química Quantitativa, 8ª edição, Editora LTC, **2012**.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. Mass Spectrometry: principles and applications. Third edition. Wiley, **2007**.

ISO GUM **2008** - Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement.

JENSEN, A. C. Deming Regression MethComp package. Steno Diabetes Center. Gentofte, Denmark. **2007**.

MAGALHÃES, W. F. Uncertainty Calculation of Quantities Obtained by Least Squares Regression of Linearized Physical-Chemical Models, a Statistical and Metrological Approach. *Revista Virtual de Química*, v. 12, p. 1256-1277, **2020**.

MAGALHÃES, W. F. Estimation of Analytical Measurement Uncertainty for Ethyl Carbamate Quantification in Cachaça by CG-IDMS Recalculated Based on Sound Metrological and Statistic Concepts. *Revista Virtual de Química*, v. 13, p. 394-418, **2021**.

MGQA - Manual de Garantia da Qualidade Analítica, Resíduos e Contaminantes em Alimentos. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). Brasília, **2011**.

MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C. Estatística aplicada e probabilidade para engenheiros. 6ª edição, Editora LTC, **2016**.

NCSS statistical software - https://ncss-wpengine.netdna-ssl.com/wp-content/themes/ncss/pdf/Procedures/NCSS/Deming_Regression.pdf (acessado em 17/10/2022).

NORDTEST Technical Report. Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories. Edição 3.1, volume 537. Oslo, **2012**.

RIGGS, D. S.; GUARNIERI, J. A.; ADDELMAN, S. Fitting straight lines when both variables are subject to error. *Life Sciences*, 1305-1360, **1978**.

ROCHA, D. G.; SANTOS, F. A.; GOMES, A. A.; FARIA, A. F. Validation of a LC-MS/MS Multiresidue Methodology Based on a QuEChERS Approach for the Determination of Fluoroquinolones, Sulfonamides and Trimethoprim in Poultry and Porcine Kidney According to the Normative Instruction 24/2009-MAPA. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 76-86 (28), **2017a**.

ROCHA, L. G.; SANTOS, F. A.; RIBEIRO, A. C. S. R.; FERNANDES, C.; SILVA, L. H. M.; GLORIA, M. B. A. A simple, fast and sensitive screening LC-ESI-MS/MS method for antibiotics in fish. *Talanta*, 85-93 (163), **2017b**.

TAPIA-OROZCO, N.; SANTIAGO-TOLEDO, G.; BARRÓN, V.; ESPINOSA-GÁRCIA, A. M.; GARCÍA-GARCÍA, J. A.; GARCÍA-ARRAZOLA, R. Environmental epigenomics: Current approaches to assess epigenetic effects of endocrine disrupting compounds (EDC's) on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **2017**.

VAN HUFFEL, S.; LEMMERLING, P. Total least squares and errors-in-variables modeling: analysis, algorithms and applications. Springer. Bélgica. **2002**.

VIM - Vocabulário Internacional de Metrologia, conceitos fundamentais e gerais e termos associados. 1ª edição luso-brasileira, **2012**.

Apêndice A - Métodos de propagação de incertezas de curva de calibração

Uma abordagem para se construir o modelo de regressão bivariado consiste em se estimar a incerteza de cada valor de concentração e se obter uma regressão linear “Deming” por iteração. Contudo, o que se fez neste trabalho foi se estimar a incerteza de preparo da concentração do ponto médio da curva e se aplicar o fator λ calculado com esse dado a todos os demais pontos da curva de calibração. Esse ponto também foi escolhido, porque ele representa o ponto de tomada de decisão, já que a partir dele a amostra é considerada violada. Para se explicar o critério empregado na seleção da abordagem da estimativa de incerteza, é necessário fazer uma pequena contextualização das diferentes alternativas de cálculo desse parâmetro.

Não existe um método único, ou mesmo mais correto, para se avaliar a incerteza de um mensurando. Pode-se, por exemplo, estimar a incerteza utilizando-se de dados de validação interlaboratorial (a incerteza, nesse caso, é basicamente o desvio padrão obtido pela combinação dos dados obtidos pelos diversos laboratórios) ou, de forma similar, utilizar os dados obtidos em um ensaio de proficiência (que nada mais é do que um ensaio interlaboratorial, de uma mesma amostra controle, organizado por um provedor internacionalmente reconhecido) e, a partir deles, se extrair a incerteza intralaboratorial (utilizando-se de uma ANOVA). Contudo, essas duas abordagens, apesar de simples e de requererem o mínimo de esforço, não são indicadas, pois não consideram detalhadamente todo o processo analítico. Isso é contornado utilizando-se das abordagens bottom-up, descrita no guia ISO GUM 2008, e top-down, abordada no documento NORDTEST 2012.

A abordagem por modelagem é empregada, geralmente, por laboratórios de excelência já que demanda um profundo conhecimento do procedimento analítico, das variáveis envolvidas, de suas correlações e do impacto delas na incerteza final. Assim, por tudo isso, a abordagem bottom-up demanda mais trabalho. Uma desvantagem dessa abordagem é que existe o risco de alguma contribuição para a incerteza final ser negligenciada, visto que as contribuições nesse caso são tomadas individualmente. Contudo, essa estratégia é a mais indicada por ser didática e promover uma discussão sobre as fontes de contribuição para a incerteza final, além de contribuir para a identificação, e conseqüente minimização, das contribuições que impactam mais no resultado final.

Já a abordagem top-down é a mais empregada em laboratórios de rotina, por demandar menos trabalho e por utilizar dados de validação. A incerteza obtida por essa estratégia é tende a ser mais realista do que a obtida pelo método bottom-up visto que, nesse caso, todas as

variáveis do processo são computadas conjuntamente ao se utilizar dos dados de validação. Não existe a possibilidade de se negligenciar alguma contribuição, na abordagem top-down, além do método ser mais rápido, demandar menos esforço, poder fazer uso de dados históricos, ser mais facilmente programável e apresentar resultados de mesma magnitude que a abordagem bottom-up, tida como mais complexa e mais recomendável a usuários experientes (ISO GUM 2008).

Resumindo, se o laboratório tiver competência e tempo para realizar investigações dos procedimentos analíticos, a abordagem de modelagem (bottom-up) é, geralmente, a mais indicada. Se o laboratório tiver tempo limitado, mas tiver dados de validação e controle de qualidade, a abordagem de validação top-down é a mais adequada.

Para se estimar a incerteza da abscissa do ponto referente à metade da curva, se empregou da abordagem bottom-up. Optou-se por esse modelo, pois com ele é possível computar a incerteza do MRC do analito empregado na construção da curva de calibração, o que era um outro problema prático que precisava ser analisado.

Quando da seleção de um insumo, é necessário que se tenha um critério definido de aceitação do mesmo. No caso de um MRC, esse critério poderia ser a incerteza da sua pureza. Contudo, é preciso avaliar o quanto a incerteza da pureza do MRC impacta no resultado final. Assim, esse valor foi variado, na estimativa da incerteza da abscissa, que compunha o fator λ , até que as médias para o valor de concentração de uma amostra começassem a divergir estatisticamente da anterior. Com isso, foi possível estimar uma incerteza máxima aceitável para o MRC.

Para se avaliar todas as fontes de incerteza consideradas na abordagem *bottom-up* é preciso, inicialmente, se descrever o procedimento analítico. O mesmo é resumido a seguir:

- 1) Pipetar 5 mL de uma amostra branca e adicionar a um tubo de 50 mL (V_{pip}/L);
- 2) Adicionar a solução padrão, nas concentrações dos pontos da curva de calibração (V_{curva}/L);
- 3) Adicionar 10 mL de acetonitrila para realizar a extração (V_{acet}/L);
- 4) Retirar 6 mL da fase orgânica e transferir a outro tubo de 10 mL;
- 5) Adicionar os agentes secantes;
- 6) Retirar 3,7 mL do sobrenadante (V_{final}/L);
- 7) Evaporar até a secura;
- 8) Redissolver com 400 μL e transferir para um vial (V_{redis}/L).

Assim, a equação do mensurando (concentração dos pontos da curva de calibração – abscissas) é a seguinte:

$$c/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1} = \frac{m/\mu\text{g} \cdot \text{pureza}}{V_{\text{bal\~{a}o}}/\text{L}} \cdot \frac{V_{\text{pip1}}/\text{L}}{V_{\text{b1}}/\text{L}} \cdot \frac{V_{\text{pip2}}/\text{L}}{V_{\text{b2}}/\text{L}} \cdot \frac{V_{\text{curva}}/\text{L}}{V_{\text{pip}}/\text{L}} \cdot \frac{0,005\text{ L}}{V_{\text{acet}}/\text{L}} \cdot \frac{V_{\text{final}}/\text{L}}{V_{\text{redis}}/\text{L}} \quad (10)$$

As componentes destacadas em vermelho advêm do preparo da solução padrão, que é realizado pesando-se o MRC ($m/\mu\text{g}$) e diluindo-se o sal em 100 mL de metanol (utiliza-se do balão volumétrico para isso, $V_{\text{bal\~{a}o}}/\text{L}$). Em seguida, um volume dessa solução é pipetado ($V_{\text{bal\~{a}o}}/\text{L}$) e diluído em outro balão de 100 mL (V_{b1}/L). Ainda é necessário se repetir o passo anterior (V_{pip2}/L e V_{b2}/L) de tal forma a se pipetar um volume ($V_{\text{curva}}/\text{L}$) e se alcançar a concentração desejada na amostra branca. O V_{pip}/L representa os 5 mL de amostra branca (amostra de urina isenta de qualquer contaminação prévia pelo analito que se está analisando) que são utilizados para se preparar cada ponto da curva. O V_{acet}/L é o volume de 10 mL de acetonitrila adicionados para se realizar a extração. O $V_{\text{final}}/\text{L}$ corresponde ao volume de 3,7 mL pipetados da solução de acetonitrila. Por fim, o $V_{\text{redis}}/\text{L}$ que aparece na fórmula se refere ao volume de 400 μL empregados para se redissolver o extrato seco. Feito isso, essa última solução formada é transferida para um vial, que é um frasco de vidro compatível com o amostrador automatizado do sistema de HPLC. Dessa etapa em diante, todo o processo é instrumental. A única interferência humana se dá na interpretação dos sinais analíticos (definição do que é um sinal do analito e o que se refere a um ruído instrumental, definição dos limites de integração da área do sinal cromatográfico, dentre outros processamentos).

É pertinente mencionar o porquê dos 6 mL não contribuírem para a composição da incerteza de medição. Esse volume é retirado somente para se secar a fase orgânica, ou seja, a solução, que tem uma concentração constante, pode ser retirada como uma alíquota qualquer. Desse volume, são retirados os 3,7 mL que efetivamente contribuem para a diluição da amostra. Nesse caso, é preciso se padronizar, pois isso afeta a quantidade de matéria que será analisada e que, como consequência, precisa ser proporcional ao nível de concentração dos pontos da curva de calibração.

O valor de 0,005 L foi adicionado para se contabilizar a diluição de 5 mL para 10 mL (etapa 3 do procedimento descrito anteriormente). Se se computasse somente a diluição de 10 mL, negligenciar-se-ia a incerteza da etapa de pipetagem de 5 mL, que efetivamente influencia na concentração final, uma vez que uma quantidade de matéria diferente da desejada poderia ser aspirada pela micropipeta na última etapa.

A partir da equação da concentração, estima-se sua incerteza de acordo com a seguinte equação:

$$u_c = \sqrt{\sum_i^n \left(\frac{\partial c}{\partial x_i} \cdot u_{x_i} \right)^2} \quad (11)$$

Ou seja, a incerteza de medição é a raiz quadrada do somatório dos produtos quadráticos do coeficiente de sensibilidade pela incerteza das variáveis de entrada da equação do mensurando. Os coeficientes de sensibilidade (derivadas parciais) têm por objetivo transformar todas as contribuições para a mesma unidade do mensurando, além de ponderar a contribuição de cada fonte de incerteza. O cálculo de cada um deles é apresentado a seguir:

$$\frac{\partial c}{\partial m} = \frac{\text{pureza}}{V_{\text{balão/L}}} \cdot \frac{V_{\text{pip1/L}}}{V_{b1/L}} \cdot \frac{V_{\text{pip2/L}}}{V_{b2/L}} \cdot \frac{V_{\text{curva/L}}}{V_{\text{pip/L}}} \cdot \frac{0,005}{V_{\text{acet/L}}} \cdot \frac{V_{\text{final/L}}}{V_{\text{redis/L}}} = \frac{c}{m} \quad (12)$$

$$\frac{\partial c}{\partial m} = \frac{0,9741}{0,1 \text{ L}} \cdot \frac{0,001 \text{ L}}{0,1 \text{ L}} \cdot \frac{0,00111 \text{ L}}{0,1 \text{ L}} \cdot \frac{0,0001 \text{ L}}{0,005 \text{ L}} \cdot \frac{0,005 \text{ L}}{0,01 \text{ L}} \cdot \frac{0,0037 \text{ L}}{0,0004 \text{ L}} = \frac{1,0001572 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}}{10000 \mu\text{g}} = 0,0001 \text{ L}^{-1}$$

$$\frac{\partial c}{\partial \text{pureza}} = \frac{m/\mu\text{g}}{V_{\text{balão/L}}} \cdot \frac{V_{\text{pip1/L}}}{V_{b1/L}} \cdot \frac{V_{\text{pip2/L}}}{V_{b2/L}} \cdot \frac{V_{\text{curva/L}}}{V_{\text{pip/L}}} \cdot \frac{0,005 \text{ L}}{V_{\text{acet/L}}} \cdot \frac{V_{\text{final/L}}}{V_{\text{redis/L}}} = \frac{c}{\text{pureza}} \quad (13)$$

$$\frac{\partial c}{\partial \text{pureza}} = \frac{10000 \mu\text{g}}{0,1 \text{ L}} \cdot \frac{0,001 \text{ L}}{0,1 \text{ L}} \cdot \frac{0,00111 \text{ L}}{0,1 \text{ L}} \cdot \frac{0,0001 \text{ L}}{0,005 \text{ L}} \cdot \frac{0,005 \text{ L}}{0,01 \text{ L}} \cdot \frac{0,0037 \text{ L}}{0,0004 \text{ L}} = \frac{1,0001572 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}}{0,9741} = 1,2675 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$$

$$\frac{\partial c}{\partial V_{\text{balão}}} = \frac{-m/\mu\text{g} \cdot \text{pureza}}{V_{\text{balão}}^2/\text{L}^2} \cdot \frac{V_{\text{pip1/L}}}{V_{b1/L}} \cdot \frac{V_{\text{pip2/L}}}{V_{b2/L}} \cdot \frac{V_{\text{curva/L}}}{V_{\text{pip/L}}} \cdot \frac{0,005 \text{ L}}{V_{\text{acet/L}}} \cdot \frac{V_{\text{final/L}}}{V_{\text{redis/L}}} = \frac{-c}{V_{\text{balão}}} = -10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-2} \quad (14)$$

$$\frac{\partial c}{\partial V_{\text{pip1}}} = \frac{m/\mu\text{g} \cdot \text{pureza}}{V_{\text{balão/L}}} \cdot \frac{1}{V_{b1/L}} \cdot \frac{V_{\text{pip2/L}}}{V_{b2/L}} \cdot \frac{V_{\text{curva/L}}}{V_{\text{pip/L}}} \cdot \frac{0,005 \text{ L}}{V_{\text{acet/L}}} \cdot \frac{V_{\text{final/L}}}{V_{\text{redis/L}}} = \frac{c}{V_{\text{pip1}}} = 1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-2} \quad (15)$$

$$\frac{\partial c}{\partial V_{b1}} = \frac{-m/\mu\text{g} \cdot \text{pureza}}{V_{\text{balão/L}}} \cdot \frac{V_{\text{pip1/L}}}{V_{b1}^2/\text{L}^2} \cdot \frac{V_{\text{pip2/L}}}{V_{b2/L}} \cdot \frac{V_{\text{curva/L}}}{V_{\text{pip/L}}} \cdot \frac{0,005 \text{ L}}{V_{\text{acet/L}}} \cdot \frac{V_{\text{final/L}}}{V_{\text{redis/L}}} = \frac{-c}{V_{b1}} = -10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-2} \quad (16)$$

$$\frac{\partial c}{\partial V_{\text{pip2}}} = \frac{m/\mu\text{g} \cdot \text{pureza}}{V_{\text{balão/L}}} \cdot \frac{V_{\text{pip1/L}}}{V_{b1/L}} \cdot \frac{1}{V_{b2/L}} \cdot \frac{V_{\text{curva/L}}}{V_{\text{pip/L}}} \cdot \frac{0,005 \text{ L}}{V_{\text{acet/L}}} \cdot \frac{V_{\text{final/L}}}{V_{\text{redis/L}}} = \frac{c}{V_{\text{pip2}}} = 901 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-2} \quad (17)$$

$$\frac{\partial c}{\partial V_{b2}} = \frac{-m/\mu\text{g} \cdot \text{pureza}}{V_{\text{balão/L}}} \cdot \frac{V_{\text{pip1/L}}}{V_{b1/L}} \cdot \frac{V_{\text{pip2/L}}}{V_{b2}^2/\text{L}^2} \cdot \frac{V_{\text{curva/L}}}{V_{\text{pip/L}}} \cdot \frac{0,005 \text{ L}}{V_{\text{acet/L}}} \cdot \frac{V_{\text{final/L}}}{V_{\text{redis/L}}} = \frac{-c}{V_{b2}} = -10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-2} \quad (18)$$

$$\frac{\partial c}{\partial V_{\text{curva}}} = \frac{m/\mu\text{g} \cdot \text{pureza}}{V_{\text{balão/L}}} \cdot \frac{V_{\text{pip1/L}}}{V_{b1/L}} \cdot \frac{V_{\text{pip2/L}}}{V_{b2/L}} \cdot \frac{1}{V_{\text{pip/L}}} \cdot \frac{0,005 \text{ L}}{V_{\text{acet/L}}} \cdot \frac{V_{\text{final/L}}}{V_{\text{redis/L}}} = \frac{c}{V_{\text{curva}}} = 10002 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-2} \quad (19)$$

$$\frac{\partial c}{\partial V_{\text{pip}}} = \frac{-m/\mu\text{g} \cdot \text{pureza}}{V_{\text{bal\~{a}o}}/L} \cdot \frac{V_{\text{pip1}}/L}{V_{b1}/L} \cdot \frac{V_{\text{pip2}}/L}{V_{b2}/L} \cdot \frac{V_{\text{curva}}/L}{V_{\text{pip}}^2/L^2} \cdot \frac{0,005 L}{V_{\text{acet}}/L} \cdot \frac{V_{\text{final}}/L}{V_{\text{redis}}/L} = \frac{-c}{V_{\text{pip}}} = -200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-2} \quad (20)$$

$$\frac{\partial c}{\partial V_{\text{acet}}} = \frac{-m/\mu\text{g} \cdot \text{pureza}}{V_{\text{bal\~{a}o}}/L} \cdot \frac{V_{\text{pip1}}/L}{V_{b1}/L} \cdot \frac{V_{\text{pip2}}/L}{V_{b2}/L} \cdot \frac{V_{\text{curva}}/L}{V_{\text{pip}}/L} \cdot \frac{0,005 L}{V_{\text{acet}}^2/L^2} \cdot \frac{V_{\text{final}}/L}{V_{\text{redis}}/L} = \frac{-c}{V_{\text{acet}}} = -100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-2} \quad (21)$$

$$\frac{\partial c}{\partial V_{\text{final}}} = \frac{m/\mu\text{g} \cdot \text{pureza}}{V_{\text{bal\~{a}o}}/L} \cdot \frac{V_{\text{pip1}}/L}{V_{b1}/L} \cdot \frac{V_{\text{pip2}}/L}{V_{b2}/L} \cdot \frac{V_{\text{curva}}/L}{V_{\text{pip}}/L} \cdot \frac{0,005 L}{V_{\text{acet}}/L} \cdot \frac{1}{V_{\text{redis}}/L} = \frac{c}{V_{\text{final}}} = 270 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-2} \quad (22)$$

$$\frac{\partial c}{\partial V_{\text{redis}}} = \frac{-m/\mu\text{g} \cdot \text{pureza}}{V_{\text{bal\~{a}o}}/L} \cdot \frac{V_{\text{pip1}}/L}{V_{b1}/L} \cdot \frac{V_{\text{pip2}}/L}{V_{b2}/L} \cdot \frac{V_{\text{curva}}/L}{V_{\text{pip}}/L} \cdot \frac{0,005 L}{V_{\text{acet}}/L} \cdot \frac{V_{\text{final}}/L}{V_{\text{redis}}^2/L^2} = \frac{-c}{V_{\text{redis}}} = -2500 \text{ g} \cdot \text{L}^{-2} \quad (23)$$

As incertezas e distribuições das funções densidade de probabilidade das variáveis, para o cálculo da concentração de 1 µg/L (que corresponde ao nível intermediário das abcissas e ao nível empregado para se indicar uma amostra violada, para o DES), são as seguintes:

Tabela 11: estimativa da incerteza, pela abordagem *bottom-up*, da concentração intermediária das abcissas.

Variável	Unidade	Valor	Incerteza	F.D.P	Certif. Calib.	Coef. sensib.	u.coef
m	µg	10000	0,05	normal	013.58619/07/22	0,0001000	5,0008E-06
pureza	NA	0,9741	0,0015	normal	G128192	1,02675	0,0015401
V balão	L	0,1	0,000015	normal	12856/2019	-10,001572	-0,00015
Vpip1	L	0,001	0,0000001	normal	LV02846-15834-22-R0	1000,1572	0,0001000
Vb1	L	0,1	0,000015	normal	12856/2019	-10,001572	-0,00015
Vpip2	L	0,00111	0,0000001	normal	LV02846-15834-22-R0	901,0425	9,0104E-05
Vb2	L	0,1	0,000015	normal	12856/2019	-10,001572	-0,00015
V curva	L	0,0001	0,0000001	normal	LV02846-15834-22-R0	10001,572	0,0010002
V pipet.	L	0,005	0,0000041	normal	LV02846-21577-21-R0	-200,03143	0,0008201
V acetoneit.	L	0,01	0,0000045	normal	821A4D22	-100,01572	-0,0004501
V final	L	0,0037	0,0000041	normal	LV02846-21577-21-R0	270,31275	0,0011083
V reconst.	L	0,0004	0,0000001	normal	LV02846-15834-22-R0	-2500,3929	-0,00025

$$C = 1,0001572 \mu\text{g}/\text{L}$$

$$u_c = 0,0023715 \mu\text{g}/\text{L}$$

Fonte: Elaborado pelo autor.

Dessa forma, como apresentado na Tabela 11, o desvio padrão das abcissas foi estimado como sendo 0,0023715.

Uma vez que o nível de referência para se estimar o λ foi a concentração de 1 $\mu\text{g/L}$, tem-se que a variância obtida para Y neste ponto foi de 0,03179, o que implica em $\lambda = 0,0001769$. Esta variância foi obtida aplicando-se o maior desvio padrão percentual (44%), de todos os pontos da curva (ou seja, para cada conjunto de três pontos foi encontrado um desvio e o maior desvio percentual foi empregado), ao ponto médio da curva, que deve corresponder ao limite de tomada de decisão.

Adicionalmente, é pertinente elucidar a estratégia de levantamento das componentes que contribuem à incerteza combinada. Em um trabalho anterior (BORGATI, 2018), todas as fontes de incerteza para as variáveis empregadas em um processo similar já haviam sido levantadas e computadas ao modelo, a saber: resolução, calibração e repetibilidade para a grandeza massa e as mesma componentes, com a adição da temperatura, para a grandeza volume. Contudo, neste trabalho, logo no início dos testes, verificou-se que a incerteza da pureza do MRC, parâmetro que precisava ser avaliado, ficaria diluído frente às outras componentes que compuseram a incerteza combinada do mensurando. Assim, para se superestimar a contribuição da incerteza do MRC, somente a incerteza de calibração foi computada às componentes que contribuem à incerteza de cada componente. No final da avaliação, confirmou-se a suposição dos testes preliminares sobre a irrelevância da contribuição da incerteza da pureza à incerteza do mensurando.

Todavia, foi preciso avaliar se essa simplificação na estimativa da incerteza não afetou a estimativa da inclinação e do intercepto. No trabalho de 2018, as duas fontes primárias de incerteza para cada uma das componentes foram a repetibilidade e a incerteza advinda da calibração. Assim, para se avaliar se a simplificação realizada foi adequada, dobrou-se o valor da incerteza estimada nesse trabalho e calcularam-se novamente os parâmetros da regressão. Para se ser ainda mais conservador, a incerteza foi quadruplicada e o modelo de regressão construído dessa maneira foi comparado com os outros dois. O resumo dos parâmetros desses modelos está apresentado na tabela 12. Cada um dos três modelos, utilizando-se dos três λ diferentes, foram construídos utilizando-se das abordagens 3 e 6, que são as únicas que computam a variabilidade experimental das abscissas e ordenadas.

Tabela 12: Avaliação dos modelos de regressão linear construídos com a simplificação da abordagem de estimativa de incerteza.

Abordagem	λ	a	b
3	33,16	-0,044076	0,490636
	132,64	-0,045358	0,491735
	530,58	-0,045716	0,492043
6	33,16	-0,035996	0,483297
	132,64	-0,038443	0,485863
	530,58	-0,039117	0,486577

Fonte: Elaborado pelo autor.

As inclinações foram comparadas utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis e não se observou diferença estatística entre elas, ao nível de significância de 5%. Já os interceptos não foram comparados, pois o teste de avaliação de sua significância já fora realizado anteriormente e concluiu-se que eles não são significativos.

Assim, ficou demonstrado que a simplificação da estimativa da incerteza não impactou na construção dos modelos que fazem uso do λ estimado experimentalmente. De certo modo, isso já era esperado, pois a relação λ entre as variâncias experimentais de x e y (apresentada na tabela 5) era de menos de um milésimo. Ou seja, já era sabido que a incerteza de x frente à de y era insignificante.

Apêndice B - Equações empregadas na construção dos modelos de regressão via MMQO e MMQP

Tomando-se o valor mínimo da equação que fornece a distância (equação 6), chegamos às equações para as inclinações e interceptos:

$$SS = \sum_{i=1}^N [(x_i - X'_i)^2 + \lambda \cdot (y_i - \beta_0 - \beta_1 \cdot X'_i)^2] \quad (6)$$

$$\beta_1 = \frac{(\lambda q - u) + \sqrt{(u - \lambda q)^2 + 4\lambda p^2}}{2\lambda p} \quad (24)$$

$$\beta_0 = y_m - \beta_1 \cdot x_m \quad (25)$$

Em que y_m e x_m são os valores médios das variáveis correspondentes e as entradas u , p e q são dadas por:

$$u = \sum_{i=1}^N (x_i - x_m)^2 \quad (26)$$

$$q = \sum_{i=1}^N (y_i - y_m)^2 \quad (27)$$

$$p = \sum_{i=1}^N (x_i - x_m) \cdot (y_i - y_m) \quad (28)$$

A estimativa dos valores “verdadeiros” (valor estimado pela regressão ortogonal) é dada por:

$$X'_i = x_i + \frac{\lambda b_1 d_i}{(1 + \lambda b_1^2)} \quad (29)$$

$$Y'_i = y_i - \frac{d_i}{(1 + \lambda b_1^2)} \quad (30)$$

Sendo d_i o seguinte:

$$d_i = y_i - (\beta_0 + \beta_1 x_i) \quad (31)$$

Já para o caso ponderado, a distância quadrática a ser minimizada é a que já foi apresentada na equação 8:

$$SSw = w_i \cdot \sum_{i=1}^N [(x_i - X'_i)^2 + \lambda \cdot (y_i - \beta_0 - \beta_1 \cdot X'_i)^2] \quad (8)$$

O fator de ponderação, w_i , que também já foi apresentado anteriormente é:

$$w_i = \frac{1}{\left[\frac{x_i + \lambda y_i}{1 + \lambda} \right]^2} \quad (7)$$

Os interceptos e inclinações para esse caso são obtidos de acordo com as seguintes equações:

$$\beta_1 = \frac{(\lambda q_w - u_w) + \sqrt{(u_w - \lambda q_w)^2 + 4\lambda p_w^2}}{2\lambda p_w} \quad (32)$$

$$\beta_0 = y_{m_w} - \beta_1 \cdot x_{m_w} \quad (33)$$

$$x_{m_w} = \frac{\sum_{i=1}^N w_i \cdot x_i}{\sum_{i=1}^N w_i} \quad (34)$$

$$y_{m_w} = \frac{\sum_{i=1}^N w_i \cdot y_i}{\sum_{i=1}^N w_i} \quad (35)$$

$$u_w = \sum_{i=1}^N w_i \cdot (x_i - x_{m_w})^2 \quad (36)$$

$$q_w = \sum_{i=1}^N w_i \cdot (y_i - y_{m_w})^2 \quad (37)$$

$$p_w = \sum_{i=1}^N w_i \cdot (x_i - x_{m_w}) \cdot (y_i - y_{m_w}) \quad (38)$$

Os desvios padrões dos interceptos e inclinações são calculados considerando-se o método de Jackknife, dividido em quatro passos:

- 1) Estima-se o valor do parâmetro desejado (ϕ), utilizando-se de todos os dados.
- 2) Estimar o mesmo parâmetro desejado (ϕ_i), N vezes, mas retirando um par (x_i, y_i) a cada vez.
- 3) Calcular N pseudo-parâmetros (ϕ_i^*) utilizando-se da equação:

$$\phi_i^* = N \cdot \phi - (N - 1) \cdot \phi_i \quad (39)$$

- 4) O estimador Jackknife (ϕ_{Jack}) é dado por:

$$\phi_{Jack} = \sum_{i=1}^N \frac{\phi_i^*}{N} \quad (40)$$

- 5) A variância é estimada como:

$$V(\phi) = \sum_{i=1}^N \frac{(\phi_i^* - \phi_{Jack})^2}{N-1} \quad (41)$$

- 6) E, por fim, o desvio padrão da média é dado por:

$$SE(\phi) = \sqrt{\frac{V(\phi)}{N}} \quad (42)$$

Os intervalos de confiança para os interceptos e inclinações são obtidos multiplicando-se o desvio padrão da média por um fator de abrangência $t_{1-\alpha/2, N-2}$. A linearidade será avaliada considerando-se a significância da inclinação. A hipótese nula é que ele é igual a zero e a alternativa é que ele é diferente de zero. Assim, caso o intervalo de confiança da inclinação contenha o zero, a inclinação poderá ser desprezada e, portanto, o ajuste dos pontos não será considerado linear. A mesma lógica se aplica ao intervalo de confiança do intercepto: se ele contiver o zero, então o intercepto não é estatisticamente significativo, ao nível de significância (α) empregado.