

TUTORIAL EXCEL PARA PARAMETRIZAÇÃO DE CURVAS ANALÍTICAS

CRISTIAN DEBORTOLLI¹, LUIZA DALBOSCO², DANIELA OPPELT³, WALTER AUGUSTO RUIZ⁴, RÓDNER BIANCHIN PEDROSO⁵, LEANO ALDOUS JENSEN⁶

RESUMO

A química analítica utiliza procedimentos empíricos para determinar a concentração de analitos mediante técnicas instrumentais. Tais técnicas permitem relacionar a resposta instrumental (y) e o sinal medido no instrumento, que geralmente é função da concentração do analito, representada por ($y = fx$) que é comumente denominada curva analítica ou curva- padrão. Funções lineares são muito utilizadas para esta finalidade, assim a linearização desta função torna-se necessária para o cálculo da concentração do analito e para expressar corretamente o resultado é necessário um tratamento estatístico dos dados experimentais. Observa-se que os estudantes de disciplinas de química analítica instrumental apresentam dificuldades no tratamento de dados e na interpretação de resultados quando se utiliza uma curva analítica e na compreensão de seus parâmetros. Nesse sentido, propõe-se um tutorial de regressão linear de dados experimentais para o cálculo de todos os parâmetros que caracterizam uma curva analítica, através de um procedimento utilizando a planilha eletrônica Excel 2016 do MS Office. Criou-se uma rotina de cálculos utilizando dados experimentais da determinação espectrofotométrica de proteína, usando como padrão a albumina de soro bovino (BSA) e da calibração de pHmetro, mas pode ser estendida a outros procedimentos onde o cálculo se faz necessário.

PALAVRAS-CHAVE: CURVA ANALÍTICA, PARÂMETROS DA CURVA ANALÍTICA, MODELOS ESTATÍSTICOS.

EXCEL TUTORIAL FOR PARAMETRIZATION OF ANALYTICAL CURVES

ABSTRACT

Analytical chemistry uses empirical procedures to determine analytes concentration through instrumental techniques that relate the analytical signal, instrumental response (y) to the analyte concentration (x). The signal measured by the instrument is generally a function of the analyte concentration, which is plotted ($y = fx$), commonly referred to as analytical curve or standard curve. Linear functions are commonly used for this purpose, thus the linearization of this function is necessary to calculate the concentration of the analyte and, to properly express the result, statistical processing of the experimental data is required. Usually, students of instrumental analytical chemistry courses find it difficult to process and interpret results when using a calibration curve and understand its

¹ Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande. E-mail: debortollicristian@gmail.com

² Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande. E-mail: luizadalbosco@gmail.com

³ Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande. E-mail: dani.oppelt@gmail.com

⁴ Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande. E-mail: dqmwar@furg.br

⁵ Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande. E-mail: rodner.pedroso@furg.br

⁶ Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande. E-mail: leanoeq@gmail.com

parameters. In that sense, it is proposed a linear regression tutorial of experimental data for the calculation of all the parameters that characterize an analytical curve, through a procedure using Excel spreadsheet MS Office 2016. A routine of calculations was created using experimental data from the spectrophotometric determination of protein, using the standard BSA and pH meter calibration, but it can be extended to other procedures where the calculation is necessary.

KEYWORDS: ANALYTICAL CURVE, PARAMETERS OF THE CALIBRATION CURVE, STATISTICAL MODELS.

1. INTRODUÇÃO

Um dos procedimentos mais importantes em análises químicas é a determinação da concentração de um analito através da relação existente entre concentração e propriedade física do mesmo. Geralmente, a propriedade física é medida através de um instrumento e os dados experimentais coletados são tratados por testes estatísticos. Esses dados são registrados em um gráfico ($y = f(x)$), onde a concentração é representada como variável independente (x) e o sinal como variável dependente (y). Dessa forma, gera-se uma função matemática que pode ser linear, logarítmica, exponencial ou polinomial.

Para calcular a concentração do analito, é necessário obter a função $y = f(x)$. A obtenção dessa função é realizada sempre nas condições (temperatura, comprimento de onda, potencial, condutividade, tempo de retenção etc.) que melhor descrevam a propriedade física empregada. Igualmente, é possível utilizar procedimento similar para estabelecer as condições ótimas entre concentração e o respectivo sinal [5, 6].

Uma vez estabelecida a melhor condição para a medida, prepara-se uma série de soluções de concentração conhecida do analito. A propriedade física é então medida para cada uma dessas soluções, e pode-se relacionar então o sinal resultante com a concentração. A curva resultante é denominada curva-analítica ou curva-padrão, a qual permite obter a função $y = f(x)$, desde que cada solução seja tratada conforme o método recomendado para medir a propriedade do analito. Uma consideração importante é que nessa série de soluções haja uma solução que não contenha o analito, denominada "branco", que permite calibrar o instrumento no ponto inicial da curva. Em cada ponto da curva (cada solução de concentração conhecida) devem ser registradas no mínimo três leituras, de forma que se permita o tratamento estatístico.

Na posse de todos os dados experimentais, sugere-se o método de regressão linear dos mínimos quadrados para determinar a função linear (y). Ou seja, determina-se o seu coeficiente angular (m), linear (b), de determinação (R^2) e de correlação (r); os

desvios das variáveis dependentes (s_y), independente (s_x) e da regressão (s_r). Uma vez estabelecida a função matemática que descreve a intensidade do sinal instrumental pela concentração, pode-se calcular a concentração do analito na amostra (C_{Xo}), assim como os respectivos intervalos de confiança (IC). O método dos mínimos quadrados, para regressões simples (não ponderadas), assume que não há desvio significativo em x , ou seja, as concentrações dos padrões são consideravelmente precisas, se os resíduos se distribuírem normalmente [4, 5, 6], e os desvios de y não variam significativamente com os valores de x [4, 5]. A Figura 1 mostra uma curva de calibração típica, com o limite de confiança da regressão.

Os limites de confiança da curva, linhas pontilhadas na Figura 1, reduzem-se pertodo centroide da reta. Isso implica que para reduzir o limite de confiança da amostra, pode-se aumentar o número de padrões na curva, bem como aumentar o número de leituras da amostra (replicatas) [6].

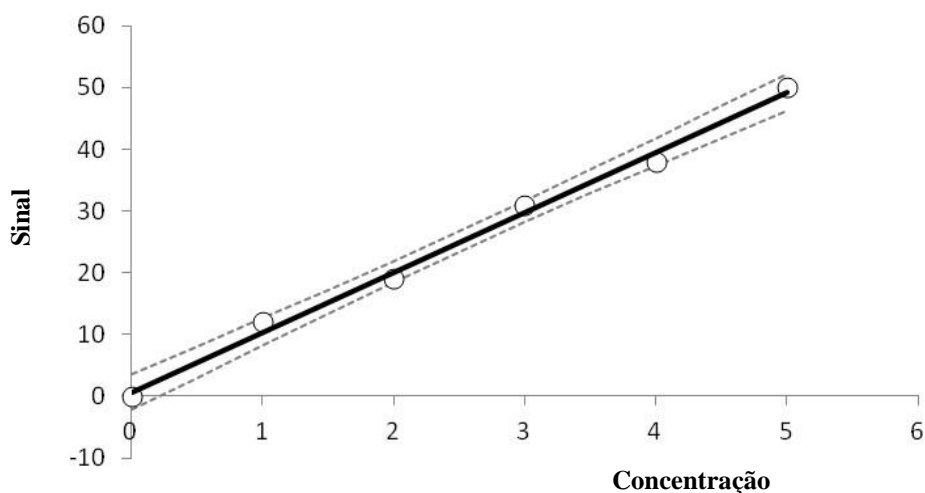


FIGURA 1. Função de calibração para determinação da concentração de um analito

$$[y_{(\pm s_y)} = m_{(\pm s_m)}x + b_{(\pm s_b)}].$$

Os parâmetros da função linear (Equação (1)) e da regressão linear (Equação (2)) podem ser calculados através das equações da Tabela 1. Uma das formas de avaliar o ajuste do modelo linear é pelo valor do coeficiente de determinação (R^2 , Equação (5)) e de correlação (r , Equação (6)). Quanto mais próximos estes valores forem de 1, maior será a correlação entre o sinal e a concentração. No entanto, esses valores não implicam necessariamente que o ajuste linear seja satisfatório para a distribuição de pontos [9].

O intervalo de confiança da regressão linear pode ser calculado através dos desvios dos valores do estimador da função da regressão (\hat{Y}). Para simplificar os cálculos, o intervalo de confiança pode ser calculado com o estimador \hat{Y}' (Equação (22)), onde t é o valor de *Student* para $(1 - \alpha/2)$, referindo-se à distribuição bicaudal com $(n - 2)$ graus de liberdade; n é o número de pontos usados na regressão; \bar{x} é a média dos valores de x_i usados na regressão; SS_x é o somatório do quadrado dos desvios dos valores dos padrões; s_r é o desvio da regressão; X' são os valores arbitrários para a construção do intervalo de confiança; e \hat{Y} são os valores gerados pela equação da regressão [6].

TABELA 1. Parâmetros e equações utilizadas na parametrização da regressão linear

Parâmetros	Equações	Referências
Função linear (Y)	$y = mx + b_0$ (1)	Bisquerria et al. [2]; Harris [4]
Função da regressão (\hat{Y})	$\hat{Y} = mX' + b_0$ (2)	Bisquerria et al. [2]; Harris [4]
Coeficiente angular (m)	$m = \frac{S_{xy}}{S_{sx}}$ (3)	Bisquerria et al. [2]; Harris [4]
Coeficiente linear (b)	$b = \bar{y} - m\bar{x}$ (4)	Bisquerria et al. [2]; Harris [4]
Coeficiente de determinação (R^2)	$R^2 = \frac{\sum(\hat{y} - \bar{y})^2}{\sum(y_i - \bar{y})^2} = \frac{SS_r}{SS_y}$ (5) SS_r = somatório do quadrado do resíduo SS_y = somatório do desvio de y_i	Gonçalves [3]; Holler et al. [5]
Coeficiente de correlação (r)	$r = \sqrt{R^2} = \frac{S_{sxy}}{\sqrt{S_{sx} \cdot S_{sy}}}$ (6)	Gonçalves [3]; Holler et al. [5]
Valor médio das concentrações (\bar{x})	$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$ (7)	Bisquerria et al. [2]; Harris [4]
Valor médio das respostas do padrão (y)	$\bar{y} = \frac{\sum y_i}{n}$ (8)	Bisquerria et al. [2]; Harris [4]
Concentração do analito na amostra	$C_{x0} = \frac{\bar{y}_c - b_0}{m}$ (9) \bar{y}_c = resposta média do analito na amostra	Harris [4]; Holler et al. [5]
Somatório quadrado dos resíduos	$SS_r = \sum [y_i - (b + mx_i)]^2 = SS_y - m^2 SS_x$ (10)	Holler et al. [5]
Somatório quadrado dos desvios de y	$SS_y = \sum (y_i - \bar{y})^2 = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N}$ (11)	Harris [4]; Holler et al. [5]
Somatório quadrado dos desvios de x	$SS_x = \sum (x_i - \bar{x})^2 = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N}$ (12)	Harris [4]; Holler et al. [5]
Somatório do produto dos desvios x e y	$S_{xy} = \sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) = \sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{N}$ (13)	Holler et al. [5]
Desvio padrão da regressão	$S_r = \sqrt{\frac{SS_y - m^2 SS_x}{n-2}} = \sqrt{\frac{SS_r}{n-2}}$ (14)	Holler et al. [5]
Desvio padrão do coeficiente angular	$S_m = \frac{S_r}{\sqrt{SS_x}}$ (15)	Holler et al. [5]
Desvio padrão do coeficiente linear	$S_b = S_r \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}}$ (16)	Holler et al. [5]
Desvio padrão da concentração do analito	$S_{x0} = \frac{S_r}{m} \sqrt{\frac{1}{M} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{y}_c - \bar{y})^2}{m^2 SS_x}}$ (17) \bar{y}_c = valor médio das respostas da amostra \bar{Y} = valor médio das respostas do padrão (curva analítica) M = número de respostas da amostra N = número de pontos da curva	Holler et al. [5]
Sinal mínimo	$S_m = \bar{s}_{br} + k S_{br}$ (18) \bar{s}_{br} = média dos valores da resposta do branco S_{br} = desvio padrão das respostas do branco	Holler et al. [5]
Limite de detecção	$LDO = \frac{s_m - \bar{s}_{br}}{m}$ (19)	Holler et al. [5]
Desvio padrão relativo da amostra	$\%DPR = \frac{s_{x0}}{c_{x0}} * 100$ (20)	Harris [4]
Parâmetro t_c calculado	$t_c = \frac{x_i - \bar{x}}{s_x}$ (21)	Neto et al. [7]
Intervalo de confiança da função ($y = f_x$)	$\hat{y}' = IC = \hat{y} \pm t * s_r + \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(x' - \bar{x})^2}{SS_x}}$ (22)	Rawling et al. [8]
Limites de confiança do resultado (para um dado α)	$LC = \pm \left(\frac{t * s_c}{\sqrt{M}} \right)$ (23)	Harris [4]

Parâmetros importantes dos métodos de análise instrumental são o *menor sinal distinguível* e o *limite de detecção*, que podem ser calculados através das Equações (18) e (19), respectivamente. Nessas equações, S_m é o menor sinal distinguível, S_{br}^- é o sinal médio do branco, S_{br} é o desvio padrão do branco, k constante múltipla (comumente adotado com o valor de 3), e m é o coeficiente angular da $y = f_x$. O limite de detecção (LDO) é a menor concentração de analito capaz de produzir um sinal significativamente diferente do sinal médio do branco; na prática se utiliza o sinal médio do branco como coeficiente linear (b) e o desvio padrão do branco (s_{br}) como o valor de s_r [6]. Para o cálculo do limite de determinação (LQO), ou seja, a menor concentração quantificável, usa-se a mesma Equação (19), porém na Equação (18) o valor do k será igual a 10 [10].

Por fim, após ter-se calculado a concentração da amostra (Equação (9)), o seu desvio pode ser estimado pela Equação (17) [5], onde s_r é o desvio da regressão, m é a pendente, M é o número de medidas da amostra, N é o número de pontos da curva, \bar{y}_c é o valor médio lido da amostra, \bar{Y} é o valor médio dos valores lidos dos padrões e SS_x é o somatório do quadrado dos desvios dos valores dos padrões. Estas equações também podem ser utilizadas para o cálculo da concentração do analito quando se utiliza o método de adições sucessivas, neste caso o termo $(1/M)$ da Equação (17) será igual a zero.

Os cálculos elencados acima requerem, além de conhecimento em fundamentos de estatística, conhecimento básico de planilha eletrônica e a compreensão do método instrumental utilizado. Para o estudante que está tendo o primeiro contato com métodos instrumentais, a elaboração de uma curva-analítica pode ser uma tarefa complicada, pois várias equações e conceitos estatísticos são aplicados para essa finalidade.

2. METODOLOGIA

A demonstração do uso da planilha do Excel foi realizada com alunos da disciplina de Análise Instrumental Química, do curso de Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande - FURG. Utilizaram-se dados experimentais da determinação de proteína pelo método de Biureto [1] e como padrão a albumina de soro bovino (BSA). As absorbâncias do cromóforo foram lidas no comprimento de onda de 540 nm em espectrofotômetro Hitachi e se encontram registradas na Tabela 2.

TABELA 2. Absorbâncias de soluções-padrão de BSA

n°	BSA mg.mL ⁻¹	Absorbâncias		
		1	0,0	0,000
2	0,5	0,098	0,117	0,112
3	1,0	0,199	0,231	0,239
4	1,5	0,314	0,335	0,355
5	2,0	0,405	0,439	0,452
6	Amostra	0,275	0,277	0,275

2.1. Tutorial para tratamento dos dados no Excel^{MS}

Abra novo arquivo no Excel. Na barra de ferramentas, escolher tipo e tamanho da letra. Por exemplo, selecionar as células B2 à H2 e na barra de ferramentas marcar *mesclar e centralizar*. Digite *Tabela 1. Absorbância e concentração de soluções-padrão de BSA*. Nas células seguintes construa a tabela como mostrada na Figura 2 preenchendo com os dados da análise. Utilizar a barra de ferramentas para formatar as respectivas células.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1								
2	Tabela 1. Absorbância e concentração de soluções-padrão de BSA							
3								
4		n°	Concentração (mg.mL ⁻¹)	Absorbâncias (A)			A _{média}	Desv. Padrão
5		1	0,0	0,000	0,000	0,000		
6		2	0,5	0,098	0,117	0,112		
7		3	1,0	0,199	0,231	0,239		
8		4	1,5	0,314	0,335	0,355		
9		5	2,0	0,405	0,439	0,453		
10		6	Amostra	0,275	0,277	0,275		
11								

FIGURA 2. Absorbâncias das soluções-padrão de BSA.

Para o cálculo da média e do desvio-padrão das absorbâncias (Figura 3), colocar o cursor na célula G5 e, na barra de ferramentas, clicar ao lado do símbolo somatório (Σ) e selecionar *média*, marcar as células D5, E5 e F5 e pressione a tecla *Enter* (<E>). Colocar o cursor na célula H5 e na barra de ferramentas, em *Fórmulas*, clicar na janela *mais funções* e marcar *DESVPAD.A*. Marcar as células D5, E5 e F5 e <E>. Selecionar as células G5 e H5 e posicionar o cursor na parte inferior direita da célula H5 e arrastar

até a célula H10. Para formatar o número de algarismos, marcar as células D5 até H10 e na barra de ferramentas formatar 3 algarismos.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1								
2		Tabela 1. Absorbância e concentração de soluções-padrão de BSA						
3								
4		nº	Concentração (mg.mL ⁻¹)	Absorbâncias (A)			A _{média}	Desv. Padrão
5		1	0,0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
6		2	0,5	0,098	0,117	0,112		
7		3	1,0	0,199	0,231	0,239		
8		4	1,5	0,314	0,335	0,355		
9		5	2,0	0,405	0,439	0,453		
10		6	Amostra	0,275	0,277	0,275		

FIGURA 3. Média e desvio-padrão das absorbâncias da curva analítica.

Para inserir o gráfico da curva-padrão (Figura 4), marque as células C5 a C9 e G5 a G9 e na barra do menu *Inserir* clicar em *gráfico dispersão* e <E>. No gráfico, clique na palavra *série* e deletar. Colocar o cursor em alguma linha da grade e com o botão direito deletar as *linhas da grade*. Colocar o cursor em um ponto da curva e com o botão direito selecionar *linha de tendência* e marcar as opções, *definir equação no gráfico* e *exibir valor de R² no gráfico*. Com esse procedimento obtém-se a Figura 4.

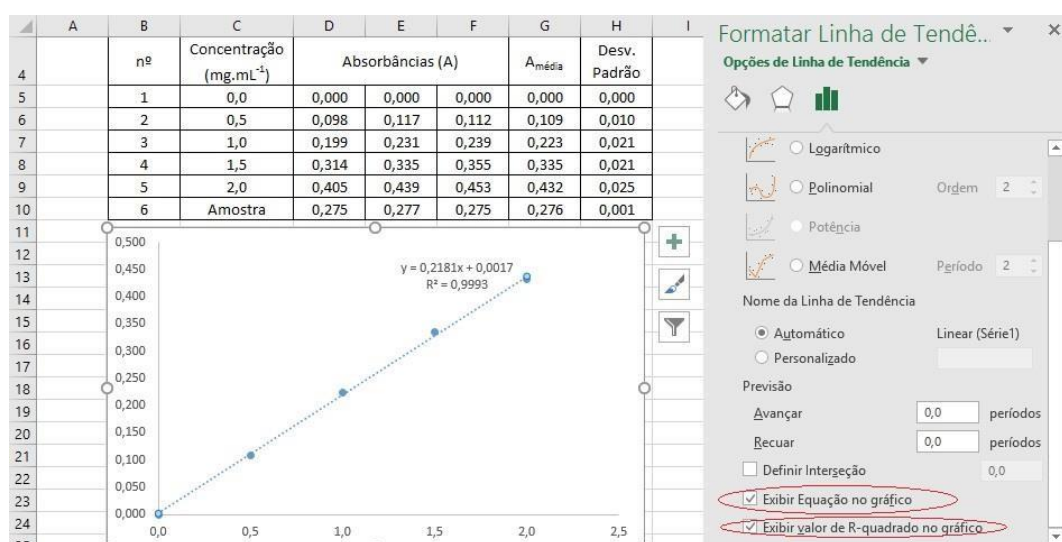


FIGURA 4. Função linear da curva analítica com o coeficiente de determinação.

Para formatar os eixos x e y basta clicar no gráfico e no menu *Elementos do*

Gráfico (cruz verde que fica realçada ao lado do gráfico), marcar *Títulos dos eixos*, selecionar no gráfico o eixo x e digitar na barra de comando (*fx*) concentração (mg.mL⁻¹) e <E>; repetir o procedimento para título do eixo y, como na Figura 5 a seguir.

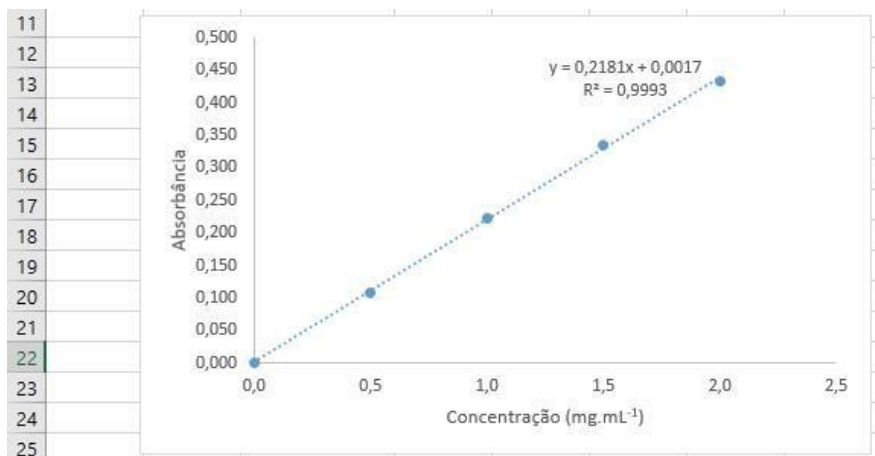


FIGURA 5. Títulos dos eixos da função da curva analítica.

Para inserir o desvio padrão no gráfico, selecionar no menu *Elementos do gráfico: Barras de erros, mais opções, formatar barra de erro, opções de barra de erros*, em erro escolher *personalizado (especificar valor)*. Marcar os dados do desvio padrão da absorbância (H5:H9), *valor do erro positivo* e <E>, do *valor do erro negativo* (15:19) e <E>, como nas Figuras 6 e 7.

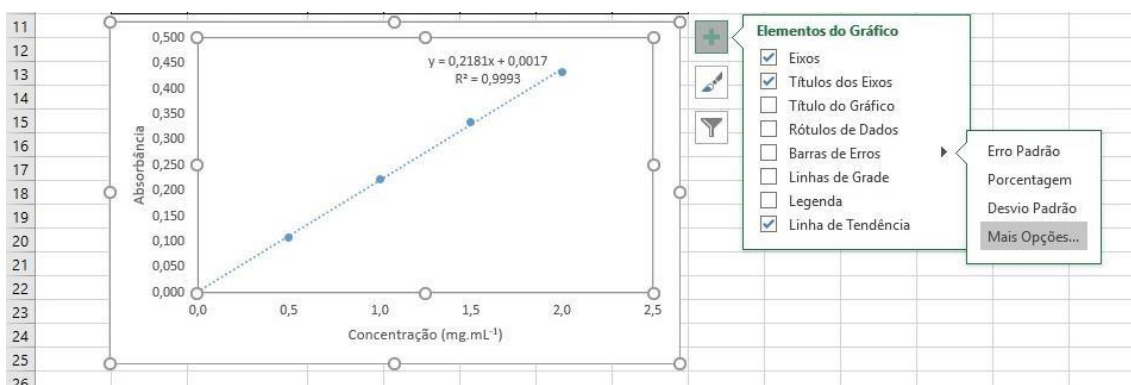


FIGURA 6. Incluindo os desvios dos dados experimentais.



FIGURA 7. Incluindo os desvios dos dados experimentais (*continuação*)

2.2. Cálculo dos parâmetros da curva

Os valores dos coeficientes angular e linear e seus respectivos desvios, bem como o desvio da regressão e R^2 , podem ser calculados com as equações da Tabela 1 ou através das funções do Excel. Transfira o gráfico da função linear para outras células na mesma planilha. Nas células J4, J5 e J6 digitar m , s_m e R^2 , respectivamente; nas células M4, M5 e M6 digitar b , s_b e s_r , respectivamente. Colocar o cursor na célula K4 e digitar $=proj.lin(G5:G9;C5:C9;1;1)$, marcar as células K4 a L6 para compor a matriz, teclar simultaneamente $F2$ seguido de $Ctrl + Shift$ e $\langle E \rangle$, como mostrado na Figura 8.

FIGURA 8. Cálculo matricial dos parâmetros da curva analítica.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1													
2		Tabela 1. Absorbância e concentração de soluções-padrão de BSA											
3													
4		nº	Concentração (mg.L ⁻¹)	Absorbâncias (A)			A _{média}	Desv. Padrão		m	0,218066667	0,00173333	b
5		1	0,0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		sm	0,003286561	0,0040252	sb
6		2	0,5	0,098	0,117	0,112	0,109	0,010		r ²	0,999319027	0,00519651	sr
7		3	1,0	0,199	0,231	0,239	0,223	0,021					

O parâmetro t de *Student* para uma distribuição bicaudal com 95% de confiabilidade ($\alpha = 0,05$), pode ser calculado com a função $inv.t.bc()$; assim, deve-se entrar com o valor de $\alpha = 0,05$ em *probabilidade* com n graus de liberdade ($n - 2 = 3$),

onde $n = 5$ pontos da curva. Colocar o cursor na célula J7 e digitar *Param t* e na célula K7 digitar $=inv.t.bc(0,05;3)$ e <E>.

O intervalo de confiança da regressão pode ser calculado usando as equações do SS_x , \hat{Y} , t , s_r , X' (Tabela 1), ou com as seguintes funções: calcular SS_x usando a função *desvq()*. Colocar o cursor em J8 e digitar SS_x , colocar o cursor na célula K8, selecione na barra de *menu*, *fórmulas*, na barra de ferramentas *mais funções*, *estatística* e *desvq*, marque o intervalo da concentração dos padrões (x) C5 a C9 e <E>, como mostra a Figura 9.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	
1														
2		Tabela 1. Absorbância e concentração de soluções-padrão de BSA												
3														
4		nº	Concentração (mg.L ⁻¹)	Absorbâncias (A)				A _{média}	Desv. Padrão		m	0,218066667	0,00173333	b
5		1	0,0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		sm	0,003286561	0,0040252	sb	
6		2	0,5	0,098	0,117	0,112	0,109	0,010		r²	0,999319027	0,00519651	sr	
7		3	1,0	0,199	0,231	0,239	0,223	0,021		Param t	3,182446305			
8		4	1,5	0,314	0,335	0,355	0,335	0,021		SSx	2,5			
9		5	2,0	0,405	0,439	0,453	0,432	0,025						

FIGURA 9. Cálculo do somatório quadrado dos desvios de x (SS_x)

Nas células J9 e J10 escrever N e x_{medio} , respectivamente. Na célula K9 escrever 5 (número de pontos usados na curva) e na célula K10 $=média(C5:C9)$. Nas células E12 a H12, digitar o vocativo para entrada de dados para: X' , \hat{Y}' , $IC(+)$, $IC(-)$; onde IC é o intervalo de confiança. Nas células E13 a E21, digitar os valores arbitrários de concentração (X'), na célula F13 digitar $=K\$4*E13+L\4 (Eq. 1) e <E>. Na célula G16 digitar $=F13+K\$7*L\$6*RAIZ((1/K\$9)+(E13-1)^2/K\$8)$ (Eq. 17) e <E>. Selecione as células F13 a H13, coloque o cursor no extremo inferior direito da célula H13 e arraste até H21 para completar o quadro da Figura 10.

	A	B	C	D	E	F	G	H
2	Tabela 1. Absorbância e concentração de soluções-padrão de BSA							
3								
4		nº	Concentração (mg.L ⁻¹)	Absorbâncias (A)			A _{médias}	Desv. Padrão
5		1	0,0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
6		2	0,5	0,098	0,117	0,112	0,109	0,010
7		3	1,0	0,199	0,231	0,239	0,223	0,021
8		4	1,5	0,314	0,335	0,355	0,335	0,021
9		5	2,0	0,405	0,439	0,453	0,432	0,025
10		6	Amostra	0,275	0,277	0,275	0,276	0,001
11								
12				X'	\hat{y}'	IC (+)	IC (-)	
13				0,0	0,001733	0,014543	-0,01108	
14				0,2	0,045347	0,056514	0,034179	
15				0,5	0,110767	0,119825	0,101709	
16				0,7	0,15438	0,162414	0,146346	
17				1,0	0,2198	0,227196	0,212404	
18				1,2	0,263413	0,271099	0,255727	
19				1,5	0,328833	0,337891	0,319775	
20				1,7	0,372447	0,382854	0,36204	
21				2,0	0,437867	0,450677	0,425057	

FIGURA 10. Cálculo dos intervalos de confiança (IC).

Para obter o gráfico da curva analítica com os seus respectivos desvios e os intervalos de confiança, clicar no gráfico da Figura 6 e no menu *Ferramentas de gráfico*, selecione *Design*, *Selecionar dados* e *Adicionar*. Para adicionar à função linear o intervalo positivo, marcar primeiro os dados da coluna *X'* e depois os dados da coluna *IC(+)* e *<E>*. Para adicionar o intervalo inferior, repete-se o procedimento e no final marcar os dados da coluna *IC (-)* e *<E>*. Para formatar os marcadores dos intervalos de confiança, clique com o botão direito do mouse, clique sobre a linha de cada intervalo e selecione *Formatar série de dados*, faça suas opções e *<E>*, como mostrado na Figura 11.

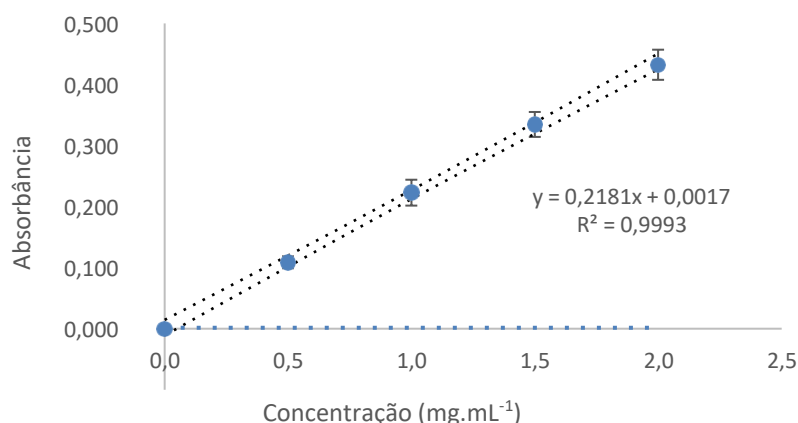


FIGURA 11. Curva analítica com intervalo de confiança.

2.3. Cálculo dos resultados da amostra

Nas células C23 e D24 escrever *Concentração do analito na amostra* e C_{x_0} , respectivamente. Na célula E24 escrever $= (G10-L4)/K4$ (Eq. 7). Para o cálculo dos desvios, colocar os vocativos nas células D27 a D32, conforme mostra a Figura 12. Na célula E27 digitar 3 (número de replicatas da amostra). Na célula E28 digitar *média* ($G5:G9$) e na célula E29 $= (L6/K4) * RAIZ((1/E27)+(1/K9)+((G10-E28)^2/(K8*K4^2)))$ (Eq. 17).

Para calcular o desvio-padrão relativo da concentração do analito na amostra e o limite de confiança do resultado, utilizar as Equações (20) e (23), respectivamente.

	A	B	C	D	E	F	G	H
19					1,5	0,328833	0,337891	0,319775
20					1,7	0,372447	0,382854	0,36204
21					2,0	0,437867	0,450677	0,425057
22								
23			Concentração do analito na amostra:					
24				C_{x_0}	1,256191 mg.mL ⁻¹			
25								
26			Desvios à concentração do analito na amostra					
27				M	3			
28				\bar{y}	0,220			
29				s_{x_0}	0,017826			
30				LC	0,032753			
31				DPR	0,014191			
32				%DPR	1,42%			
33								
34			Resultado da concentração da amostra					
35					$X_0 = 1,26 \pm 0,03 \text{ mg.mL}^{-1} (\alpha = 0,05)$			

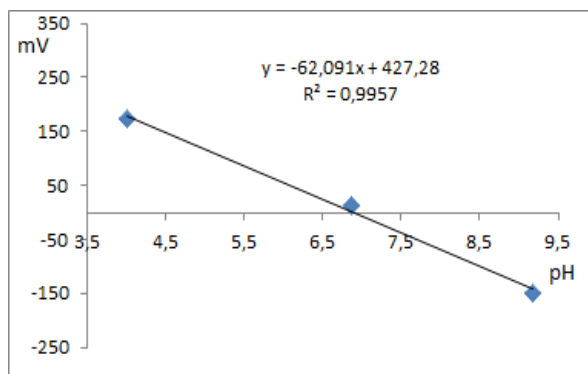
FIGURA 12. Cálculos do resultado da amostra.

2.4. Ajuste de curva de calibração

Para o ajuste de curva de calibração, utilizamos os dados experimentais da calibração de eletrodos de pH, Tabela 3, e sua linearização, Figura 13, como descrito nos passos anteriores.

TABELA 3. Potencial de soluções tampão de pH

pH	4,01	4,01	4,01	4,01	6,86	6,86	6,86	6,86	9,18	9,18	9,18	9,18
E(mV)	173,3	173,3	173,3	173,3	14,5	14,5	14,5	14,5	-147,7	-147,7	-147,7	-147,7



Projeção Linear			
m	-62,091	427,278	b
Sm	1,289	9,032	Sb
R ²	0,996	9,437	Sy

FIGURA 13. Função linear do pH e os coeficientes da sua projeção linear

A projeção linear permite verificar que os dados experimentais apresentam um elevado índice de determinação (R^2) e os desvio-padrão elevados sugerem um ajuste do modelo através da análise de variância e cálculo do erro puro.

Para calcular a Análise de Variância (ANOVA) no Excel, na barra de funções marcar a função *Dados* e na barra de ferramentas marcar *análise de dados*, abre-se a caixa de diálogo da *análise de dados* e nela marcar *regressão* e <Ok>. Selecionar o *intervalo de y entrada* (E (mv)), com a tecla *Tab* passar para selecionar o *intervalo de x* (pH) de entrada, marcar *nova planilha* e <Ok>, se obtém os dados da Tabela 4.

TABELA 4. Análise de variância para a curva de calibração do pH

ANOVA					
	GL	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	206820,29	206820,2882	2322,12	3,57E-13
Resíduo	10	890,65	89,07		
Total	11	207710,94			

Como a ANOVA fornecida pelo Excel não permite verificar nem o ajuste do modelo nem os erros, esses podem ser calculados com as Equações (24) a (29), permitindo elaborar as Tabelas 5 e 6.

$$\hat{y} = -mx + b \quad (24)$$

$$S. Q_{\text{modelo}} = \sum(\hat{y} - \bar{\hat{y}})^2 \quad (25)$$

$$S. Q_{\text{resíduo}} = \sum(\hat{y} - y_i)^2 \quad (26)$$

$$S. Q_{\text{total}} = \sum(y_i - \bar{y})^2 \quad (27)$$

$$S. Q_{\text{erro puro}} = \sum(y_i - \bar{\hat{y}})^2 \quad (28)$$

$$S. Q_{falta\ de\ ajuste} = S. Q_{residuo} - S. Q_{erro\ puro} \quad (29)$$

Graus de liberdade:

- do modelo = $g - 1$; (grupos x, y) ($g = 2$)
- do resíduo = $n - 2$; ($n = 12$)
- da falta de ajuste = $c - 2$; ($c = \text{número do } y_{jm} = 3$)
- do erro puro = $n - c$
- total = $n - 1$

$$F_{\text{crítico}} = \text{INV}F(\alpha, GL_{\text{Modelo}}, GL_{\text{residuo}})$$

$F_{\text{observado}} \gg F_{\text{crítico}}$ Não existe diferença significativa

TABELA 5. Soma de quadrados para a ANOVA

pH, (x)	E (mV), (y)	$Y_{i(\text{média})}$	$(Y_i - Y_{i(\text{média})})^2$	SQe.p	\hat{y}	SQ modelo	SQ residuo	SQ Total	SQ falta de ajuste
4,01	173,3		0,180625		178,2951	27552,66	24,950924	25921	(SQ residuo - SQ erro puro)
4,01	171,4		2,175625		178,2951	27552,66	47,542266	25312,81	877,097134
4,01	173		0,015625		178,2951	27552,66	28,037978	25824,49	
4,01	173,8	172,875	0,855625	3,2275	178,2951	27552,66	20,205834	26082,25	
6,86	14,5		1,21		1,33574	120,32796	173,29774	4,84	
6,86	11,6		3,24		1,33574	120,32796	105,35503	0,49	
6,86	14,7		1,69		1,33574	120,32796	178,60345	5,76	
6,86	12,8	13,4	0,36	6,5	1,33574	120,32796	131,42926	0,25	
9,18	-147,7		2,805625		-142,7154	24031,365	24,846437	25600	
9,18	-150,1		0,525625		-142,7154	24031,365	54,532613	26373,76	
9,18	-149,7		0,105625		-142,7154	24031,365	48,784917	26244	
9,18	-150	-149,375	0,390625	3,8275	-142,7154	24031,365	53,065689	26341,29	
Soma	147,6			13,555	147,6618	206817,41	890,65213	207710,94	
média	12,3				12,30515				

TABELA 6. ANOVA da calibração do pH com os erros do ajuste e do erro puro

ANOVA					
FV	GL	SQ	QM	Fob	F c
Modelo	1	206817,4114	206817,4	2322,09	4,96
Residuo	10	890,652134	89,06521		
Falta de ajuste	1	877,097134	877,0971	582,36	5,12
Erro puro	9	13,555	1,506111		
Total	11	207708,0636			

A relação entre $F_{\text{observado}}$ e $F_{\text{calculado}}$ dos dados experimentais não apresentam diferença significativa ao nível de 0,05 sugerindo que o modelo utilizado ($y = -mx + b$) descreve bem a relação entre potencial e pH.

3. DISCUSSÃO

Dentre os métodos de análise instrumental química a espectrofotometria visível e ultravioleta é muito utilizada na determinação da concentração de analitos, enquanto que a potenciometria é muito útil para determinar potenciais de eletrodos. Dados experimentais obtidos com esses dois métodos possibilitaram desenvolver um tutorial para o aprendizado da regressão linear e o ajuste de curvas analíticas.

Curvas analíticas obtidas por espectrofotometria UV – Vis tem como variável resposta a absorvância em função da concentração estabelecendo-se uma relação linear entre ambas. Essa função ($y = f_x$) é passível de ser ajustada por regressão linear simples e assim calcular a concentração de um analito em uma amostra, esta é uma atividade comum em laboratórios químicos entretanto é necessário observar uma série de requisitos para expressar corretamente o resultado. Os passos apresentados no tutorial permitem expressar corretamente o resultado final na determinação da concentração do analito em uma amostra, bem como o cálculo do ajuste de uma curva de calibração de eletrodos. Essas operações são dispendiosas quando executadas livremente.

A planilha eletrônica Excel é muito utilizada na química analítica instrumental e em outras disciplinas da Engenharia Química; no entanto, os estudantes iniciantes na instrumentação analítica apresentam dificuldades no manejo desta planilha e principalmente no cálculo e interpretação dos parâmetros de curvas analíticas.

O tutorial facilita o aprendizado da regressão linear, a compreensão e a interpretação estatística dos dados experimentais; assim, a sala de aula se torna mais dinâmica e mais atraente ao estudante, incentivando-o a aprimorar seu conhecimento no tratamento estatístico de dados experimentais coletados nas aulas práticas.

4. CONCLUSÃO

O tutorial “passo-a-passo” para planilha Excel^{MS} 2016, como ferramenta computacional, facilita o aprendizado de cada etapa da regressão linear de uma função matemática linearizada sendo muito útil para estimar a concentração de um analito ou para determinar os parâmetros de uma curva de calibração. Assim o tutorial é uma técnica de ensino-aprendizagem que facilita a compreensão das estatísticas na química analítica.

O tutorial mostrou-se um bom recurso didático capaz de reforçar e apresentar

conceitos de fácil assimilação e prontamente aplicável. O estudante poderá sempre recorrer ao tutorial para rever os passos de forma rápida e explicativa.

O desenvolvimento de cada operação na planilha eletrônica, com os recursos gráficos, permite visualizar em forma rápida a relação que existe entre a variável dependente, resposta do método com a variável independente, concentração ou pH etc.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official Methods of Analysis**. 1995. Arlington. USA.
- [2] BISQUERRA, J.; CASTELLÁ S., J.; MARTÍNEZ, F. **Introdução à Estatística, enfoque informático com o pacote estatístico SPSS**. Ed. Artmed. Porto Alegre, RS. 2004.
- [3] GONÇALVES, M. L. S. S. **Métodos Instrumentais para Análise de Soluções: Análise Quantitativa**. 4ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.
- [4] HARRIS, D. **Explorando a Química Analítica** 4ª. Ed. Trad. Por Julio C. Afonso, Mauro dos Santos de Carvalho, Milton R. Salles, Oswaldo Barcia. Ed. Gen LTC, R.J. 2011.
- [5] HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A. e CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6ª ed. São Paulo: Bookman, 2009.
- [6] MILLER, N. J. e MILLER, J. C. **Estatística y Quimiometría para Química Analítica**. Trad. C. M. Jiménez e R. I. Hornillos. 4ª ed. Madri: Pearson Educación, 2002.
- [7] NETO B., B.; SCARMÍNIO S., L.; BRUNS, R.E. **Como Fazer Experimentos**. Ed. UNICAMP. 2007.
- [8] RAWLING, J. O.; PANTULA, S. G. e DICKEY, D. A. **Applied Regression Analysis: A Research Tool**. 2ª ed. Nova York: Springer, 1998.
- [9] RIBEIRO, F. A. L. e FERREIRA, M. M. C. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.
- [10] STROBEL, H. A. e HEINEMAN, W. R. **Chemical Instrumentation: A Systematic Approach**. 3ª ed. Nova York: John Wiley & Sons, 1989.