



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Tony Rogério de Lima Dadamos

**DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO, VALIDAÇÃO E COMPARAÇÃO DE
DIFERENTES ABORDAGENS PARA A AVALIAÇÃO DA INCERTEZA NA
DETERMINAÇÃO ELETROQUÍMICA DE ÁCIDO ÚRICO EM SORO**

São José do Rio Preto

2018

Tony Rogério de Lima Dadamos

**DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO, VALIDAÇÃO E COMPARAÇÃO DE
DIFERENTES ABORDAGENS PARA A AVALIAÇÃO DA INCERTEZA NA
DETERMINAÇÃO ELETROQUÍMICA DE ÁCIDO ÚRICO EM SORO**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Luis Fertoni

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo J. N. Bettencourt da Silva

São José do Rio Preto

2018

Dadamos, Tony Rogério de Lima.

Desenvolvimento, otimização, validação e comparação de diferentes abordagens para a avaliação da incerteza na determinação eletroquímica de ácido úrico em soro / Tony Rogério de Lima Dadamos. -- São José do Rio Preto, 2017

173 f. : il.

Orientador: Fernando Luis Fertoni

Coorientador: Ricardo J. N. Bettencourt da Silva

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Química. 2. Eletroquímica. 3. Soro. 4. Ácido úrico. 5. Monte Carlo, Métodos de. 6. Incerteza na medição. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 541.13

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Tony Rogério de Lima Dadamos

**DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO, VALIDAÇÃO E COMPARAÇÃO DE
DIFERENTES ABORDAGENS PARA A AVALIAÇÃO DA INCERTEZA NA
DETERMINAÇÃO ELETROQUÍMICA DE ÁCIDO ÚRICO EM SORO**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Ricardo Jorge Neves Bettencourt da Silva
FCUL – Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa
Coorientador

Prof. Dr. Igor Renato Bertoni Olivares
Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos

Prof. Dr. Assis Vicente Benedetti
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química

Prof. Dr. Elcio Cruz de Oliveira
Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

Profa. Dra. Wanessa Melchert Mattos
Universidade de São Paulo, Campus Luiz de Queiroz, Departamento de Ciências Exatas

São José do Rio Preto
24 de Janeiro de 2018

RESUMO

Este trabalho apresenta metodologias de desenvolvimento, otimização, e validação de procedimentos de medição eletroquímica de parâmetros bioquímicos em fluidos biológicos. As ferramentas desenvolvidas foram aplicadas à medição voltamétrica, simples e de baixo custo de ácido úrico (AU) em soro humano que se apresenta como uma alternativa confiável às medições realizadas pelo método de referência espectrofotométrico. Foi estudada a medição de AU no soro visto a ser utilizada no diagnóstico de várias doenças, tais como gota, doenças cardiovasculares e neoplasias. O eletrodo de trabalho modificado desenvolvido e otimizado é composto por 25 % de lignina, 60 % de nanografite, 15 % de óleo mineral e cobre metálico eletrodepositado. As medições foram realizadas por um método de adição cumulativa de padrão (MAP-C), recorrendo a um novo tratamento estatístico dos dados de calibração, que permite a calibração da instrumentação num pequeno volume de soro. A incerteza da medição foi estimada recorrendo a diversas abordagens *bottom-up* desenvolvidas e usando abordagens pragmáticas *top-down* apresentadas na bibliografia. As componentes de incerteza foram combinadas usando a Lei de Propagação de Incertezas ou os métodos numéricos de Kragten e Monte Carlo. Procedeu-se igualmente a uma avaliação bayesiana da incerteza da medição que envolve a atualização de dados da prevalência de ácido úrico na população com o resultado da medição do soro específico analisado. Os modelos metrológicos desenvolvidos foram implementados em folhas de cálculo MS-Excel de fácil utilização pelo analista. As avaliações *bottom-up* da incerteza da medição recorreram a estimativas da incerteza de extrapolação produzidas pelo modelo de regressão ou usando simulações de Monte Carlo aplicáveis quando os pressupostos do modelo de regressão não são cumpridos. O método de adição cumulativa de padrão foi aplicado com sucesso à análise de soro humano pela adição de 1,0, 3,0, 5,0, 7,0 e 9,0 mg dL⁻¹ de AU a 5 mL de soro. A adequação da qualidade das medições eletroquímicas foi avaliada comparando sua incerteza com um valor alvo de 0,56 mg dL⁻¹ (uma oitava parte das faixas de AU de indivíduos saudáveis) e avaliando a compatibilidades das medições com determinações realizadas pelo procedimento de referência. As medições realizadas revelaram-se válidas e com menor custo do que as produzidas pelo método de referência. As ferramentas desenvolvidas para a construção e otimização de eletrodos de trabalho são aplicáveis à medição de outras espécies de análise e em outras matrizes. O método de adição cumulativa de padrão desenvolvido, bem como os modelos de medição respectivos desenvolvidos, são aplicáveis a qualquer tipo de medição instrumental não destrutiva de soluções.

Palavras Chaves: Eletrodo modificado. Ácido Úrico. Soro. Método de Adição de Padrão. Validação de Procedimentos. Incerteza da Medição.

ABSTRACT

This work presents methodologies for the development, optimization and validation of procedures for the electrochemical measurement of biochemical parameters in biological fluids. The developed tools were applied to voltammetric, simple and low-cost measurements of uric acid (AU) in human serum, which proved to be a reliable alternative to the spectrophotometric reference method. It was studied the measurement of AU in serum since it is used in the diagnosis of various diseases, such as gout, cardiovascular diseases and neoplasms. The developed and optimized modified working electrode is composed of 25 % lignin, 60 % nanocarbon, 15 % mineral oil and electrodeposited copper. The measurements were performed using a cumulative standard addition method (MAP-C), using a new statistical treatment of the calibration data, which allows the calibration of the instrumentation in a small volume of serum. The measurement uncertainty was estimated using developed *bottom-up* approaches and using pragmatic *top-down* approaches presented in the literature. The uncertainty components were combined using the Uncertainty Propagation Law or the numerical Kragten and Monte Carlo methods. A bayesian evaluation of the measurement uncertainty was performed, involving the updating of uric acid prevalence in the population with the result of the measurement of AU in the specific serum sample. The developed metrological models were implemented in user-friendly MS-Excel spreadsheets. The *bottom-up* assessments of measurements uncertainty involve the estimation of the extrapolation uncertainty from the regression model or using Monte Carlo simulations applicable to when the assumptions of the regression model are not valid. The cumulative standard addition method was successfully applied to the analysis of human serum by adding 1.0, 3.0, 5.0, 7.0 and 9.0 mg dL⁻¹ of AU to 5 mL of serum. The adequacy of the electrochemical measurements was assessed by comparing their uncertainty with a target value of 0.56 mg dL⁻¹ (one-eighth of the range of AU in healthy individuals) and by evaluating the compatibility of measurements with determinations performed by the reference procedure. The performed measurements are valid and significantly cheaper than those produced by the reference method. The tools developed for the construction and optimization of working electrodes are applicable to the measurement of other analytes and matrices. The developed cumulative standard addition method and respective measurement models, are applicable to any kind of non-destructive chemical measurement of a solution.

Keywords: Modified electrode. Uric acid. Serum. Standard Addition Method. Validation of Procedures. Measurement Uncertainty.

Aos meus pais, Odair e Alzaira pelo apoio em todas

as etapas de minha vida....

Aos meus tios e avós por sempre me apoiarem....

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Odair e Alzaira, pelo carinho, compreensão e por saber que sempre posso contar com eles quando eu precisar.

Aos meus avós Orlando (*In memoriam*), Tereza (*In memoriam*), José Antônio (*In memoriam*) e Helena, pelo apoio durante toda minha vida.

Aos meus tios e primos Lúcia, Valtir, José Claudinei, Rosa, Marta, Joel, Ilda e Odenir (*In memoriam*), Daiane e Liliane pelo apoio e incentivo.

Aos amigos Ludimila, Samirys, Ityara, Pingadão e Alan, pelo apoio durante todo esse tempo.

Aos companheiros de laboratório Bárbara, Carla, Thais, Lucas e Wagner, Luciana, Varti, Zé e João. Além de um agradecimento especial aos companheiros e amigos Bruno, Filipe e Airton que sempre me ajudaram em toda essa caminhada.

Aos professores em Portugal Cristina e Filomena pela receptividade, ajuda e conhecimento, e aos professores no Brasil Ieda, Ossamu, Paschoal, Luis de Boni e Cecília, que estiveram ao meu lado direta e indiretamente durante toda a minha formação.

A Fundação Educacional de Fernandópolis pela ajuda na coleta e análise das amostras durante as medições realizadas.

E um agradecimento especial ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Fertoni e ao meu coorientador Prof. Dr. Ricardo Bettencourt da Silva, pela orientação, que além de todo o conhecimento fornecido, ideias e oportunidades, eles me ensinaram que a pós-graduação não é somente “chicotada” e “paper”, que além disto existe um oceano muito maior na vida acadêmica. Me ensinaram que para aprender a nadar é preciso estar no meio do mar, juntamente com peixes grandes e nadar contra a correnteza; e sempre agarrar as oportunidades que aparecem ao longo do caminho. Gostaria de agradecer-los por todo o incentivo, apoio e motivação nessa caminhada, pois com eles consegui enxergar uma nova forma de ver a academia.

Meu muito Obrigado a Todos!

“A avaliação da incerteza não é somente cálculos matemáticos, mas sim o conhecimento do analista quanto à natureza química do que está medindo”

Adaptado GUM

LISTA DE SÍMBOLOS

- α_a - Coeficiente de transferência de elétrons anódico
 α_c - Coeficiente de transferência de elétrons catódico
 γ - Concentração de item analisado
 γ_a - Concentração do item analisado na amostra
 $\gamma_{a(I)}$ - Concentração do item analisado na amostra estimada por meio de uma regressão I vs. γ_a
 γ_{Ref} - Valor medido pelo método de referência
 γ_s - Concentração mássica da espécie
 γ_{s-B} - Concentração mássica da espécie com estimativa bayesiana
 γ_{se} - Concentração da solução estoque
 γ_τ - Concentração mássica da amostra para estimativa do LOD
 δ - Coeficiente de expansão térmica da água
 ΔT - Variação de temperatura do laboratório
 μ - Valor médio da população
 σ - Desvio padrão da população
 Γ - Concentração eletroativa
 a - Coeficiente linear da reta de calibração
 a_i - Massa do item analisado adicionado no calibrador i
 a_j - Massa do item analisado adicionado no calibrador j
 A_g - Área geométrica do eletrodo
 b - Coeficiente da curva de calibração
 $bias$ - Diferença absoluta entre o valor médio estimado e de referência
 $bias'$ - Diferença relativa entre o valor médio estimado e de referência
 b_y - Matriz no planejamento fatorial
 c - Simétrico da abcissa na origem
 C - Concentração de ferrocianeto de potássio e ferricianeto de potássio
 CPE - Elemento constante de fase - capacitância da dupla camada elétrica
 d_1 Fator de diluição da porção analítica na primeira adição padrão
 d_i - Fator de diluição da porção de amostra nos níveis de calibração i
 d_j - Fator de diluição da porção de amostra nos níveis de calibração j
 e - Nível de calibração $e=1$ a p
 E - Potencial elétrico
EMA - Erro máximo admissível da balança analítica
 E_{pa} - Potencial de pico anódico
 E_{pc} - Potencial de pico catódico
 f - Repetições de sinais
 f_e - Frequência
 $f(y)$ - Probabilidade da curva de distribuição normal
 F - Constante de Faraday - 96485 C mol^{-1}
 $F_{LOF/PE}$ - Parâmetro ANOVA-LOF
 F_p - Coeficiente de variação de Fischer calculado
 $F_{p-1; \sum o-p}^{99\%; uni}$ - Valor crítico de Fisher unicaudal para o nível de confiança de 99 %
 $F_{tab}^{99\%}$ - Coeficiente de variação de Fischer tabelado
 F_v - Fator de diluição
 $F_{vLOF; vPE}^{99\%; uni}$ - Valor crítico de Fisher unicaudal para o nível de confiança de 99 %

$F_{vp;v1}^{99\%}$ - Valor crítico de Fisher bicaudal para o nível de confiança de 99 %
 g - Função para estimativa de LOD e LOQ
 i - Variáveis de entrada do calibrador no nível i
 I - Sinal analítico
 \bar{I} - Sinal analítico médio
 \bar{I}_τ - Sinal analítico observado para estimativa do LOD
 I_{bk} - Sinal do branco
 \bar{I}_{bk} - Sinal médio do branco
 \bar{I}_e - Média dos sinais obtidos ao nível e
 \hat{I}_e - Sinal estimado para o nível de calibrador e a partir da regressão linear ($\hat{I}_e = a + bq_a$)
 I_{ef} - Repetições de f ($f=1$ a o_e) do sinal observado ao nível e
 I_i - Sinais instrumentais do calibrador i
 I_j - Sinais instrumentais do calibrador j
 I_{pa} - Corrente de pico anódica
 I_{pc} - Corrente de pico catódica
 I_t - Sinal observado
 j - Calibrador no nível j
 k - Fator de abrangência de expansão
 K_{app} - Constante de velocidade de transferência eletrônica heterogênea aparente
 k_e - Constante aparente de transferência de elétrons
 k_i - Constante da lei da propagação de incertezas
 $LOD_{y/x}$ - Limite de detecção da regressão
 $LOQ_{y/x}$ - Limite de quantificação da regressão
 m - Massa da espécie química estimada no item analisado
 m_a - Massa da espécie química adicionada
 \bar{m}_a - Média dos valores de m_{ai}
 m_{ae} - Massa do item analisado adicionado ao nível de calibração e
 m_{ai} - Massa de AU adicionado pertencente à leitura do calibrador i
 MQ - Média quadrática
 m_s - Massa da amostra estimada pela extrapolação da curva de calibração
 MS_{LOF} - Variância associada à falta de ajuste dos sinais à reta de regressão
 MS_{PE} - Variância da repetibilidade do sinal instrumental designada como "erro puro"
 n - Número de medições repetidas
 n_τ - Número de medições repetidas dos sinais analíticos para estimativa do LOD
 n_{bk} - Número de medições repetidas do branco
 n_e - Número de elétrons
 N - Número de sinais coletados para construir a curva de calibração
 o_e - Número de sinais repetidos ao nível e
 p - Funções de densidade de probabilidade
 p - Número total de calibradores
 p_a - Pureza do ácido úrico
 pka - Logarítimo da constante ácido de AU
 P - Nível de confiança da incerteza
 $Pr(A)$ - Probabilidade da ocorrência de A

$Pr(a_1 \leq A \leq a_2 | b_1 \leq B \leq b_2)$ – Probabilidade da ocorrência A assumir valores entre a_1 e a_2 quando a evidência B assume valores entre b_1 e b_2

$Pr(A | B)$ - Conhecimento obtido sobre a ocorrência A após reunida a evidência B

$Pr(B)$ - Probabilidade de ser observada a evidência B

$Pr(B | A)$ - Probabilidade de se obter a evidência B quando ocorre A

PX – percentil de X

q_a - Valor de grandeza estudada

Q^{max} - Valores máximos de ácido úrico de uma população de indivíduos saudáveis

Q^{min} - Valores mínimos de ácido úrico de uma população de indivíduos saudáveis

r - Coeficiente de correlação linear de Pearson

R - Constante física dos gases - $8,314 \text{ C V K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$

\bar{R} - Recuperação média

$R_{a_{i,j}}$ - Razão da massa do item analisado adicionado nos calibradores i e j

$R(d_1)$ – Fator de diluição da primeira adição cumulativa de padrão

$R_{d_{i,j}}$ - Razão dos fatores de diluição da porção de amostra nos calibradores calibradores i e j

R_s - Resistência da solução

R_{tc} - Resistência de transferência de carga

$R_{v_{i,j}}$ - Razão das multiplicações do volume do calibrador com o sinal instrumental observado para os calibradores i e j

s_γ – Desvio padrão de cada soro analisado

s_{bal}^{rep} – Desvio padrão da repetibilidade da balança

s_{BIAS} - Desvio padrão da precisão intermediária de n medições repetições do MRC

s'_{BIAS} - Desvio padrão relativo da precisão intermediária de n medições repetições do MRC

s_i - Desvio padrão de medidas repetidas

s_{I1} - Desvio padrão da repetibilidade do sinal ao nível da faixa de calibração

$s_{I(\tau)}$ - Desvio padrão do sinal elétrico para estimativa do LOD

$s_{I(bk)}$ - Desvio padrão dos n_{bk} sinais do branco

s_{Ip} - Desvio padrão da repetibilidade do sinal ao nível mais alto da faixa de calibração

s_{It} – Desvio padrão do sinal analítico

s_m - Desvio padrão das diferentes pesagens de massa m

$s_{precisão}$ - Desvio padrão de medições em condição de precisão intermediária

SQ – Soma quadrática

s_R - Desvio padrão da reprodutibilidade da medição

s_{Reg} – Desvio padrão residual da curva de calibração

s_y - Desvio padrão da precisão intermediária do valor de grandeza medido

$s_{y/x}$ - Desvio padrão residual da curva de calibração

t – Quantidade de amostras

$t^{95\%}$ - Distribuição t -Student para nível de confiança de 95 %

$t_{20}^{95\%}$ - Distribuição t -Student para nível de confiança de 95 % com $vs = 20$

$t_{v_{\tau}}^{95\%;uni}$ - Distribuição t -Student unicaudal do sinal analítico para um nível de confiança de 95 % para estimativa do LOD
 $t_{calc}^{95\%}$ - Distribuição t -Student calculado para nível de confiança de 95 %
 $t_d^{99\%}$ - Distribuição t -Student para um nível de confiança de 99 % e dos graus de liberdade da diferença $(\gamma_S - \gamma_{Ref}) \times$
 $t_{v_{bk}}^{95\%;uni}$ - Distribuição t -Student unicaudal do branco para um nível de confiança de 95 %
 $t_{v_{LSR}}^{95\%}$ - Distribuição t -Student para nível de confiança de 95 %
 T – Temperatura
 u – Incerteza absoluta
 u' – Incerteza relativa
 $u(\gamma_{Ref})$ – Incerteza padrão associado a γ_{Ref}
 $u(\gamma_S)$ - Incerteza padrão da concentração estimada da amostra
 $u'(\gamma_S)$ - Incerteza padrão relativa da concentração estimada da amostra
 $u(a)$ - Incerteza padrão da adição do item analisado
 $u'(a)$ - Incerteza padrão relativa da adição do item analisado
 u_{BIAS} - Incerteza padrão absoluta da veracidade da medição
 u'_{BIAS} - Incerteza padrão relativa da veracidade da medição
 $u(d_1)$ - Incerteza padrão do fator de diluição d_1 da porção analítica na primeira adição padrão
 $u'(d_1)$ - Incerteza padrão relativa do fator de diluição d_1 da porção analítica na primeira adição padrão
 u_{ext} - Incerteza padrão absoluta da extrapolação estatística da curva de calibração para estimar m_s
 u'_{ext} - Incerteza padrão relativa da extrapolação estatística da curva de calibração para estimar m_s
 u_{Fv} - Incerteza padrão associada a um fator de diluição volumétrica Fv
 $u(i)$ - Incerteza padrão da variável de entrada i
 u_m - Incerteza padrão associada à medição de massa de ácido úrico
 u_m^{cal} - Incerteza padrão associada ao erro máximo admissível
 u_m^{rep} - Incerteza padrão da repetibilidade da balança
 u_{outras} - Outras fontes de incerteza não estimadas experimentalmente
 u'_{outras} - Outras fontes de incerteza relativas não estimadas experimentalmente
 u_{pa} – Incerteza padrão associada a pureza de ácido úrico
 $u_{precisão}$ - Incerteza padrão associada à precisão
 $u'_{precisão}$ - Incerteza relativa associada à precisão
 $u(\bar{R})$ - Incerteza padrão da recuperação média
 $u(R_{a_{i,j}})$ – Incerteza da razão da massa do item analisado adicionado nos calibradores i e j
 $u'(R_{a_{i,j}})$ - Incerteza relativa da razão da massa do item analisado adicionado nos calibradores i e j
 $u(R_{d_{i,j}})$ – Incerteza da razão dos fatores de diluição da porção de amostra nos calibradores i e j
 $u'(R_{d_{i,j}})$ – Incerteza relativa da razão dos fatores de diluição da porção de amostra nos calibradores i e j
 $u(R_{v_{l_{i,j}}})$ – Incerteza da razão das multiplicações do volume do calibrador com o sinal instrumental observado para os calibradores i e j

$u'(R_{vl_{i,j}})$ - Incerteza relativa da razão das multiplicações do volume do calibrador com o sinal instrumental observado para os calibradores i e j
 u_v^{cal} - Incerteza padrão associada ao volume nominal da pipeta de vidro
 u_v^{rep} - Incerteza padrão da repetibilidade da manipulação da pipeta
 u_v^{temp} - Incerteza padrão devido a temperatura
 $u_{veracidade}$ - Incerteza padrão associada à veracidade
 $u'_{veracidade}$ - Incerteza relativa associada à veracidade
 u_{vf}^{cal} - Incerteza padrão associada aos volumes nominais dos equipamentos usados para medir Vf
 u_{vf}^{rep} - Incerteza padrão associada à repetibilidade das medições dos volumes Vf
 u_{vi}^{cal} - Incerteza padrão associada aos volumes nominais dos equipamentos usados para medir Vi
 u_{vi}^{rep} - Incerteza padrão associada à repetibilidade das medições dos volumes Vi
 u_{v_s} - Incerteza associada a porção de volume da amostra
 $u(v_s)$ - Incerteza padrão associada ao volume da amostra v_s
 $u'(v_s)$ - Incerteza padrão relativa associada ao volume da amostra v_s
 $u_{V_{se}}$ - Incerteza padrão associada ao volume da solução estoque de AU
 $u(x_i)$ - Incerteza padrão associada a x_i
 $u(y)$ - Incerteza padrão combinada do valor da grandeza medida, y
 $u'(y)$ - Incerteza padrão combinada relativa do valor da grandeza medida, y
 $u(y_{Ref})$ - Incerteza padrão do valor de referência
 $u'(y_{Ref})$ - Incerteza padrão relativa associada ao valor de referência
 $u''(y_{Ref})$ - Incerteza padrão relativa do valor de referência
 $u(y, x_i)$ - Diferença entre os valores de y calculados para $(x_i + u(x_i))$ e x_i
 U - Incerteza expandida absoluta
 U' - Incerteza expandida relativa
 $U(\gamma_s)$ - Incerteza expandida da concentração estimada da amostra
 $U(\gamma_{s-B})$ - Incerteza expandida da concentração estimada da amostra pela abordagem bayesiana
 U^{tg} - Incerteza expandida alvo
 $U(y)$ - Incerteza padrão expandida do valor da grandeza medida, y
 v - Volume da solução analisada
 $v(\gamma_s)$ - Graus de liberdade associados a $u(\gamma_s)$
 v_τ - Graus de liberdade dos sinais analíticos \bar{I}_τ
 v_1 - Graus de liberdade associados a s_{I1}
 v_a - Volume da amostra
 v_{a1} - Volume da primeira adição de padrão
 $v_{a\#}$ - Volumes sucessivos adicionados de solução estoque
 v_{ANOVA} - Graus de liberdade da regressão na tabela ANOVA
 v_{bk} - Graus de liberdade do branco \bar{I}_{bk}
 v_e - Velocidade de varredura de potenciais
 v_i - Volume total do calibrador i
 v_j - Volume total do calibrador j
 v_{LOF} - Graus de liberdade associados a $MS_{LOF} (p - 2)$
 v^{LSR} - Graus de liberdade dos parâmetros de regressão $(N - 2)$
 v_m - Graus de liberdade relativo a $m (n-1)$.
 v_p - Graus de liberdade associados a s_{Ip}
 v_{PE} - Graus de liberdade associados a $MS_{PE} (O_e - 1)$

v_s – Alíquota volumétrica da amostra
 v_{se} - Volume da solução estoque de AU
 v_{ta} - Volume total da solução
 \bar{v}_{ta} - Volume total médio da solução
 V - Volume nominal da vidraria utilizada
 V_f - Volume final da diluição
 V_i - Volume inicial a ser diluído
 W – Parâmetro de Levene
 x_1 - Porcentagem de lignina no eletrodo
 x_2 - Velocidade de deposição de cobre
 x_3 - Número de ciclos de eletrodeposição
 x_4 - Velocidade de varredura em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹
 x_i - Valor da variável i usado para estimar o resultado final, y
 X - Níveis -1, 0 e +1 no planejamento fatorial
 X^T - Matriz transposta dos níveis -1, 0 e +1 no planejamento fatorial
 y - Valor de grandeza medida
 \bar{y} - Média do valor de grandeza medida
 y_{Ref} - Valor de referência
 y_v - Valor de grandeza medida verdadeiro
 $y(x_i)$ - Resultados estimados considerando que os valores da variável i são $y(x_i)$
 Z_w - Impedância de Warburg

LISTA DE SIGLAS

4-AMP - 4-aminoantipirina
AA - Ácido Ascórbico
ANOVA - Análise de Variância
AU - Ácido Úrico
BIPM - *Bureau International des Poids et Mesures*
b-MCM - Abordagem *bottom-up* baseada em simulações de Monte Carlo
b-MMQ – Abordagem *bottom-up* baseada no método dos mínimos quadrados
CPE - Elemento constante de fase
DA - Dopamina
DCFS - Diclorofenolsulfonato
EC – Eletroquímico-Químico
ECE - Eletroquímico-Químico-Eletroquímico
ECS - Eletrodo de Calomelano Saturado
EIE - Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
EMA - Erro Máximo Admissível
EPC - Eletrodo de Pasta de Carbono
FEF - Fundação Educacional de Fernandópolis
GUM - *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*
IBILCE - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
IEC - *International Electrotechnical Commission*
IFCC - *International Federation of Clinical Chemistry*
INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IR - Espectroscopia no Infravermelho
ISO - *International Organization for Standardization*
IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*
IUPAP - *International Union of Pure and Applied Physics*
LACETE - *Laboratory of Energy Clean Technology*
LG – Lignina
LGB - Lignina de Bagaço de Cana
LGK - Lignina KRAFT
LGKP - Lignina KRAFT Purificada
LOD - Limite de Detecção
LOQ – Limite de Quantificação
LPI - Lei da Propagação de Incertezas
LSQA - Laboratório de Sucroquímica e Química Analítica
MAP - Método de Adição de Padrão
MAP-C - Método de Adição Cumulativa de Padrão
MCM - Simulações de Monte Carlo
MCMC - Simulações *Markov Chain Monte Carlo*
MMQ - Método dos Mínimos Quadrados
MQ – Média Quadrática
MR - Material de Referência
MRC - Material de Referência Certificado
NG - Nanografite
OIML - *International Organization of Legal Metrology*
POD – Peroxidase
SF# - Soro Fisiológico
SH# - Soro Humano

SI - Sistema Internacional de Unidades
SQ – Soma Quadrática
TEM - Microscopia Eletroquímica de Transmissão
UOD – Uricase
VAM - *Valid Analytical Measurements*
VIM - Vocabulário Internacional de Metrologia
XRD - Difractometria de Raios X

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura molecular de (A) Ácido Úrico e (B) Urato.....	32
Figura 2: Estrutura proposta para a lignina	36
Figura 3: Inter-relações entre os conceitos “valor verdadeiro”, “valor da grandeza medida”, “erro” e “incerteza”	39
Figura 4: Triângulo da rastreabilidade de medições às unidades do Sistema Internacional de Unidades. O esquema também identifica as instituições responsáveis pela gestão dos diferentes níveis da cadeia de rastreabilidade .	42
Figura 5: Etapas para a estimativa da incerteza quando as componentes de incerteza são combinadas pela Lei de Propagação de Incertezas ou pelo Método numérico de Kragten	44
Figura 6: Função de densidade de probabilidade da distribuição normal e intervalos de confiança de 68 %, 95,5 % e 99,7%	49
Figura 7: Eletrodo conjugado em matriz de teflon	72
Figura 8: Imagem da superfície do eletrodo de nanografite-lignina (Microscópio Digital - Dino Lite Plus AM-313); Ampliação: 200 X.....	72
Figura 9: Planejamento fatorial 3^3 utilizando todas as combinações e todos os níveis. (A) porcentagem de lignina no eletrodo; (B) velocidade de varredura de eletrodeposição de cobre metálico; (C) ciclos voltamétricos para a eletrodeposição de cobre metálico.....	75
Figura 10: Diagrama de Ishikawa para as fontes de incerteza da determinação eletroquímica de ácido úrico em amostras de soro em condições de repetibilidade	82
Figura 11: Experimento de adições sucessivas de AU com controle de pesagem	87
Figura 12: Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo nanografite-lignina em CuSO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com velocidade de varredura de 300 mV s^{-1}	92
Figura 13: Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de Cu-nanografite-lignina em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8) e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} , para diferentes valores de v_e de deposição de íons cobre: 50 (—); 300 (—) e 500 mV s^{-1} (—) em CuSO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com 4 ciclos de eletrodeposição utilizando voltametria cíclica no intervalo de potencial de $-1,0$ a $1,2 \text{ V vs. Ag}$	93
Figura 14: Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodos de 85 % nanografite e 15 % óleo mineral (—), Cu (NG); 25 % de lignina KRAFT, 60 % de nanografite e 15 % de óleo mineral (—), Cu (LGK); 25 % de lignina KRAFT purificada, 60 % de nanografite e 15 % de óleo mineral (—), Cu (LGKP); e 25 % de lignina de bagaço de cana, 60 % de nanografite e 15 % de óleo mineral (—) Cu (LGB); KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8); $v_e = 100 \text{ mV s}^{-1}$. As eletrodeposições de cobre metálico	

foram em CuSO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com 4 ciclos voltamétricos de $-1,0$ a $1,2 \text{ V vs. Ag}$ com $v_e = 300 \text{ mV s}^{-1}$	95
Figura 15: Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodos de 85 % nanografite e 15 % óleo mineral, Cu (—); 65 % nanografite, 20 % de lignina KRAFT e 15 % óleo mineral, Cu (—); 60 % nanografite, 25 % de lignina KRAFT e 15 % óleo mineral, Cu (—); e 50 % nanografite, 30 % de lignina KRAFT e 15 % óleo mineral, Cu (—); em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8); $v_e = 100 \text{ mV s}^{-1}$. As eletrodeposições de cobre metálico foram em CuSO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com 4 ciclos voltamétricos de $-1,0$ a $1,2 \text{ V vs. Ag}$ com $v_e = 300 \text{ mV s}^{-1}$	97
Figura 16: Probabilidade de interação em função dos efeitos do planejamento fatorial 2^4 com 95 % de confiança	99
Figura 17: Probabilidade de interação em função dos efeitos do planejamento fatorial 3^3 com 95 % de confiança	101
Figura 18: Gráfico de contorno obtido para a otimização das variáveis: (A) Interação entre porcentagem de lignina no eletrodo (x_1) e velocidade de varredura, v_e para a eletrodeposição de cobre (x_2); (B) Interação entre porcentagem de lignina no eletrodo (x_1) e número de ciclos para a eletrodeposição de cobre metálico (x_3); e (C) Interação entre velocidade de varredura, v_e , para a eletrodeposição de cobre metálico (x_2) e número de ciclos para a eletrodeposição de cobre metálico (x_3). Os valores numéricos apresentados no gráfico de contorno referem-se à corrente elétrica	102
Figura 19: Espectros de infravermelho obtidos para: a) lignina KRAFT (—); b) nanografite-lignina (—); e c) nanografite (—); pastilhas preparadas em KBr 1:100 (m/m)	104
Figura 20: Difratoograma de Raios X obtidos para: nanografite (—); lignina KRAFT (—); e nanografite-lignina (—)	105
Figura 21: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de nanografite (—); e nanografite-lignina (—) em $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de ferrocianeto/ferricianeto de potássio em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8); $v_e = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Espectros de plano complexo obtidos para o eletrodo de nanografite (\square) e eletrodo de nanografite-lignina (\circ) em $100 \text{ kHz} \leq f_e \leq 0,1 \text{ Hz}$; onda senoidal, amplitude 10 mV aplicada no E de meia onda obtido a partir da voltametria cíclica. As linhas ultrapassando os identificadores são os resultados de simulação com software empregando o circuito de Randles modificado	106
Figura 22: Modelo de circuito equivalente utilizado para análise dos dados obtidos com os gráficos de plano complexo obtidos com a espectroscopia de impedância eletroquímica	107
Figura 23: Microscopia eletrônica de transmissão do eletrodo de nanografite e do eletrodo de nanografite-lignina. Tensão da fonte: 200 kV	110
Figura 24: Efeito da velocidade de varredura, v_e na resposta voltamétrica do eletrodo Cu-nanografite-lignina em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8, com a dependência	

das intensidades de correntes de pico anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}) com a ve para os picos II e III dos voltamogramas cíclicos	111
Figura 25: Diagrama de Distribuição de Espécies para Cu^{+2} em meio alcalino	112
Figura 26: Relação de dependência de $I_{pa}/ve^{1/2}$ com velocidade de varredura de potenciais ve e dependência de I_{pa}/I_{pc} com velocidade de varredura de potenciais ve , obtidos dos voltamogramas da Figura 24.....	113
Figura 27: Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de nanografite (—); nanografite-lignina (—); Cu-nanografite (—); Cu-nanografite-lignina (—) e na ausência de AU; “branco” (—), em KCl 0,1 mol L ⁻¹ (pH 8); $ve= 300$ mV s ⁻¹ ; 5,0 mg dL ⁻¹ de AU	116
Figura 28: Diagrama de distribuição de espécies para ácido úrico; $pka1 = 5,7$ e $pka2 = 10,3$	119
Figura 29: Processo oxidativo de ácido úrico proposto por Dryhurst	119
Figura 30: Mecanismo proposto para o funcionamento do eletrodo modificado com Cu-nanografite-lignina para oxidação de ácido úrico.....	120
Figura 31: (A) Efeito da velocidade de varredura de potenciais sobre a resposta voltamétrica do eletrodo Cu-nanografite-lignina na presença de 5,0 mg dL ⁻¹ de AU em KCl 0,1 mol L ⁻¹ com a dependência das intensidades de correntes de pico anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}) com a ve para os picos II e III dos voltamogramas cíclicos	122
Figura 32: Dependência das correntes de pico anódica e catódica em função da variação de velocidade de varredura de potenciais para os picos II e III da Figura 31. (A) Dependência de I_{pa}/I_{pc} vs. ve (B) Dependência de I_{pa} vs. ve (C) Dependência de I_{pc} vs. ve	123
Figura 33: Voltamogramas cíclicos obtidos para adições sucessivas de 250 μ L de ácido úrico 1,68 g L ⁻¹ na amostra de soro humano 01 com o eletrodo de Cu-nanografite-lignina; $ve= 300$ mV s ⁻¹	125
Figura 34: Sinal I das 20 medições repetidas de uma solução de soro fisiológico contendo 1,04 mg dL ⁻¹ de ácido úrico	128
Figura 35: Curva de calibração obtida para quantificação de ácido úrico na amostra de soro humano SH1 analisada usando o eletrodo de Cu-nanografite-lignina desenvolvido com $ve= 300$ mV s ⁻¹ ; Adições de padrão cumulativas: três adição de 250 μ L de solução estoque de 1,68 g L ⁻¹ de ácido úrico	133
Figura 36: Resíduos de regressão em função da massa de ácido úrico adicionada na sequência da calibração, por adição cumulativa de padrão, para análise do soro SH1 (curva de calibração apresentada na Figura 35).....	133
Figura 37: Variação da Incerteza padrão relativa da medição, $u'\gamma S$, com a concentração estimada de ácido úrico no soro, γS	142
Figura 38: Contribuição percentual de cada componente de incerteza para a incerteza da concentração estimada de ácido úrico no soro, usando a abordagem <i>bottom-up</i> de avaliação da incerteza baseada no modelo de regressão	143

Figura 39: Distribuição de frequências de valores simulados da determinação eletroquímica do teor de ácido úrico num soro fortificado a 3,0 mg dL ⁻¹ , em que os volumes medidos foram controlados volumetricamente.....	146
Figura 40: Contribuição percentual das principais da incerteza associada a cada uma das variáveis aleatorizadas, nas simulações de Monte Carlo considerando um controle volumétrico dos volumes na calibração analítica para o SH1. Foram citadas na legenda as fontes maioritárias	149
Figura 41: Incertezas expandidas estimadas pelas abordagens <i>bottom-up</i> e <i>top-down intralaboratorial</i> baseadas no programa VAM e guia Nordest para a determinação de ácido úrico em sete soros. A Figura inclui a incerteza alvo	156
Figura 42: Histograma de frequência das simulações de <i>Markov Chain Monte Carlo</i> para estimativa do teor de ácido úrico no soro de um brasileiro saudável cuja determinação eletroquímica estima um valor de ácido úrico de 7,01 mg dL ⁻¹	159

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Diferenças relevantes das abordagens <i>bottom-up</i> e <i>top-down</i>	64
Tabela 2: Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no planejamento 2 ⁴	74
Tabela 3: Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no planejamento 3 ³	75
Tabela 4: Reprodutibilidade da superfície do eletrodo de nanografite-lignina para a eletrodeposição de cobre metálico em solução de CuSO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ com 4 ciclos de eletrodeposição e 300 mV s ⁻¹ de velocidade de varredura.....	98
Tabela 5: Tabela ANOVA para o planejamento 3 ³ com 95 % de confiança...	100
Tabela 6: Dados obtidos com os espectros de plano complexo da Figura 21	108
Tabela 7: Resultados simulados da quantificação do teor estimado da curva hipotética em 10 mL de uma solução amostra por adição cumulativa de volumes de 0,250 mL de uma solução estoque considerando a concentração extrapolada a partir de uma regressão ($I * v_{ta}$ vs. ma) ou (I vs. γa).....	129
Tabela 8: Parâmetros de regressão e correlação linear usados para avaliar a homocedasticidade e linearidade do sinal instrumental nas calibrações por adição cumulativa de padrão usadas para a análise de soros fortificados (SF) e soros humanos (SH)	132
Tabela 9: Parâmetros considerados na avaliação da qualidade dos calibradores para as regressões pelo MMQ realizadas nas calibrações por adição cumulativa de padrão	137
Tabela 10: Componentes de incerteza e incerteza expandida da determinação eletroquímica de AU em soro fisiológico fortificado e soro humano usando a abordagem <i>bottom-up</i> baseada no modelo de regressão dos mínimos quadrados	141
Tabela 11: Avaliação e comparação da medição de AU num soro fortificado a 3,0 mg dL ⁻¹ , envolvendo o controle gravimétrico ou volumétrico de volumes de calibração, usando as abordagens <i>bottom-up</i> baseadas no MMQ (b-MMQ) ou em simulações Monte Carlo (b-MCM). São apresentados os componentes de incerteza da abordagem b-MMQ.....	147
Tabela 12: Resultados da determinação voltamétrica de ácido úrico em soro fisiológico e soro humano e os respectivos valores de referência. A última coluna apresenta o valor absoluto da diferença e a respectiva incerteza expandida	150
Tabela 13: Parâmetros envolvidos na avaliação <i>top-down intralaboratorial</i> da incerteza da medição proposta no programa VAM, incluindo a incerteza expandida para um nível de confiança de aproximadamente 95 %	152
Tabela 14: Parâmetros envolvidos na avaliação <i>top-down intralaboratorial</i> da incerteza da medição proposta no guia Nordtest, incluindo a incerteza expandida para um nível de confiança de aproximadamente 95 %.....	154

Tabela 15: Avaliação frequentista e bayesiana da medição de ácido úrico em soro humano de indivíduos brasileiros saudáveis do sexo masculino e feminino. Os valores frequentistas correspondem às avaliações *bottom-up* da medição eletroquímica de AU nos soros fortificados SF1 a SF5..... 158

LISTA DE EQUAÇÕES

$$U' = \frac{U}{y} \quad (1) \dots\dots\dots 39$$

$$U^{tg} = \frac{Q^{max} - Q^{min}}{8} \quad (2) \dots\dots\dots 47$$

$$u(y) = \sqrt{\left(\frac{\partial y}{\partial a}\right)^2 u(a)^2 + \left(\frac{\partial y}{\partial b}\right)^2 u(b)^2 + \left(\frac{\partial y}{\partial c}\right)^2 u(c)^2 + \dots + \left(\frac{\partial y}{\partial n}\right)^2 u(n)^2} \quad (3) \dots\dots\dots 48$$

$$y = k + k_a a + k_b b + k_c c + k_d d \quad (4) \dots\dots\dots 48$$

$$u_y = \sqrt{(k_a u_a)^2 + (k_b u_b)^2 + (k_c u_c)^2 + (k_d u_d)^2} \quad (5) \dots\dots\dots 48$$

$$y = \frac{k.a.b}{c.d} \quad (6) \dots\dots\dots 48$$

$$\frac{u_y}{y} = \sqrt{\left(\frac{u_a}{a}\right)^2 + \left(\frac{u_b}{b}\right)^2 + \left(\frac{u_c}{c}\right)^2 + \left(\frac{u_d}{d}\right)^2} \quad (7) \dots\dots\dots 48$$

$$f(y) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(y-\mu)^2}{2\sigma^2}} \quad (8) \dots\dots\dots 49$$

$$\frac{\partial y}{\partial i} = \frac{y(x_i + u(x_i)) - y(x_i)}{u(x_i)} \quad (9) \dots\dots\dots 50$$

$$u(y, x_i) = (\partial y / \partial x_i) u(x_i) \approx y(x_i + u(x_i)) - y(x_i) \quad (10) \dots\dots\dots 51$$

$$Pr(A|B) = \frac{Pr(B|A) \cdot Pr(A)}{Pr(B)} \quad (11) \dots\dots\dots 53$$

$$Pr(a_1 \leq A \leq a_2 | b_1 \leq B \leq b_2) = \int_{a_1}^{a_2} \int_{b_1}^{b_2} p(B|A)p(A)dBdA \quad (12) \dots\dots\dots 53$$

$$U(y) = k \cdot s_R \quad (13) \dots\dots\dots 59$$

$$u_{precisão} = \frac{s_{precisão}}{\sqrt{n}} \quad (14) \dots\dots\dots 60$$

$$s_{precisão} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^t (n_i - 1) s_i^2}{\sum_{i=1}^t (n_i - 1)}} \quad (15) \dots\dots\dots 60$$

$$\bar{R} = \frac{\bar{y}}{y_{Ref}} \quad (16) \dots\dots\dots 61$$

$$u_{veracidade} = u(\bar{R}) = \bar{R} \sqrt{\frac{s_y^2}{n\bar{y}^2} + \left(\frac{u(y_{Ref})}{y_{Ref}}\right)^2} \quad (17) \dots\dots\dots 61$$

$$t^{95\%} = \frac{|1 - \bar{R}|}{u(\bar{R})} \quad (18) \dots\dots\dots 61$$

$$u'(y) = \sqrt{u'_{precisão}^2 + u'_{veracidade}^2 + u'_{outras}^2} \quad (19) \dots\dots\dots 62$$

$$u'(y) = \sqrt{u'_{precisão}^2 + u'_{BIAS}^2} \quad (20) \dots\dots\dots 63$$

$$bias' = \frac{\bar{y} - y_{Ref}}{y_{Ref}} \quad (21) \dots\dots\dots 63$$

$$u'_{BIAS} = \sqrt{\frac{s'_{BIAS}{}^2}{n} + u'(y_{Ref})^2 + bias'^2} \quad (22) \dots\dots\dots 63$$

$$\gamma_s = m/v \quad (23) \dots\dots\dots 67$$

$$b_y = (X^T X)^{-1} X^T I_t \quad (24) \dots\dots\dots 74$$

$$\frac{s_{ip}^2}{s_{i1}^2} \leq F_{vp;v1}^{99\%} \quad (25) \dots\dots\dots 76$$

$$W = \frac{[(\sum_{e=1}^p O_e) - p] \cdot \left\{ \sum_{e=1}^p O_e \left[\left(\frac{\sum_{f=1}^{O_e} |I_{ef} - \bar{I}_e|}{O_e} \right) - \left(\frac{\sum_{f=1}^p \sum_{e=1}^{O_e} |I_{ef} - \bar{I}_e|}{\sum_{e=1}^p O_e} \right) \right]^2 \right\}}{(p-1) \sum_{e=1}^p \sum_{f=1}^{O_e} \left(|I_{ef} - \bar{I}_e| - \frac{\sum_{f=1}^{O_e} |I_{ef} - \bar{I}_e|}{O_e} \right)^2} \leq F_{p-1; \sum_{o=p}}^{99\%;uni} \quad (26) \dots\dots\dots 76$$

$$F_{LOF/PE} = \frac{MS_{LOF}}{MS_{PE}} = \frac{\sum_{e=1}^p O_e (\bar{I}_e - \hat{I}_e)^2 / p - 2}{\sum_{e=1}^p \sum_{f=1}^{O_e} (I_{ef} - \bar{I}_e)^2 / \sum_{e=1}^p (O_e - 1)} \leq F_{vLOF;vPE}^{99\%;uni} \quad (27) \dots\dots\dots 77$$

$$LOD_{y/x} = 3,3 \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{1 + \frac{\bar{m}_a^2}{\sum_{e=1}^p \sum_{f=1}^{O_e} (m_{ai} - \bar{m}_a)^2} + \frac{1}{\sum_{e=1}^p O_e}} \quad (28) \dots\dots\dots 78$$

$$LOQ_{y/x} = 10 \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{1 + \frac{\bar{m}_a^2}{\sum_{e=1}^p \sum_{f=1}^{O_e} (m_{ai} - \bar{m}_a)^2} + \frac{1}{\sum_{e=1}^p O_e}} \quad (29) \dots\dots\dots 79$$

$$g = \frac{t_{vLSR}^{95\%}}{\left(b / \left(\frac{s_{y/x}^2}{\sum_{e=1}^p (m_{ae} - \bar{m}_a)^2} \right)^{1/2} \right)^2} \leq 0,05 \quad (30) \dots\dots\dots 79$$

$$u_m = \sqrt{2(u_m^{cal})^2 + 2(u_m^{rep})^2} \quad (31) \dots\dots\dots 83$$

$$u_m^{cal} = \frac{EMA}{\sqrt{3}} \quad (32) \dots\dots\dots 83$$

$$u_{v_s} = \sqrt{(u_v^{cal})^2 + (u_v^{rep})^2 + (u_v^{temp})^2} \quad (33) \dots\dots\dots 83$$

$$u_v^{temp} = \frac{\delta \Delta T V}{\sqrt{3}} \quad (34) \dots\dots\dots 83$$

$$u_{Fv} = Fv \sqrt{\frac{(u_{vi}^{cal})^2 + (u_{vi}^{rep})^2}{vi^2} + \frac{(u_{vf}^{cal})^2 + (u_{vf}^{rep})^2}{vf^2}} \quad (35) \dots\dots\dots 83$$

$$u_{ext} = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{(\bar{I} * vta)^2}{b^2 \sum_{i=1}^N (m_{ai} - \bar{m}_a)^2}} \quad (36) \dots\dots\dots 84$$

$$u(\gamma_s) = \gamma_s \sqrt{(u'(v_s))^2 + (u'(d_1))^2 + (u'(a))^2 + \left(\frac{u_{ext}}{m_s} \right)^2} \quad (37) \dots\dots\dots 84$$

$$|\gamma_s - \gamma_{Ref}| \leq t_d^{99\%} \sqrt{u^2(\gamma_s) + u^2(\gamma_{Ref})} \quad (38) \dots\dots\dots 90$$

$$Y = 1,02 + 0,13x1 + 0,10x2 + 0,11x3 + 0,15x4 - 0,04x12 \quad (39) \dots\dots\dots 99$$

$$Y = 1,31_{(\pm 0,05)} + 0,03x1_{(\pm 0,02)} + 0,14x3_{(\pm 0,02)} - 0,23x11_{(\pm 0,04)} - 0,25x22_{(\pm 0,04)} + 0,073x33_{(\pm 0,04)} \quad (40) \dots\dots 101$$

$$K_{app} = \frac{RT}{F^2 R_{tc} C A_g} \quad (41) \dots\dots 109$$

$$I_{pa}(mA) = 0,54 + 0,002v_e (mV s^{-1}) \text{ anódico} \quad (42) \dots\dots 110$$

$$I_{pc}(mA) = -0,23 - 4,64v_e (mV s^{-1}) \text{ catódico} \quad (43) \dots\dots 110$$

$$I_{pa} = \frac{n_e^2 F^2 A_g \Gamma v_e}{4RT} \quad (44) \dots\dots 114$$

$$I_{pa}(mA) = 0,53 + 0,0023 v_e (mV s^{-1}) \text{ anódico} \quad (45) \dots\dots 121$$

$$I_{pc}(mA) = -0,81 - 0,0019 v_e (mV s^{-1}) \text{ catódico} \quad (46) \dots\dots 121$$

$$LOD = t_{v_{bk}}^{95\%;uni} \left(\frac{S_{I(bk)} \gamma_{\tau}}{\bar{I}_{\tau} - \bar{I}_{bk}} \right) \left(\frac{4v_{bk}}{4v_{bk}+1} \right) + t_{v_{\tau}}^{95\%;uni} \left(\frac{S_{I(\tau)} \gamma_{\tau}}{\bar{I}_{\tau} - \bar{I}_{bk}} \right) \left(\frac{4v_{\tau}}{4v_{\tau}+1} \right) \quad (47) \dots\dots 127$$

$$\gamma_a = \frac{\gamma_{a(I)} \gamma_{se}}{\gamma_{a(I)} + \gamma_{se}} \quad (48) \dots\dots 130$$

$$R_{vI_{i,j}} = \frac{v_i \cdot I_i}{v_j \cdot I_j} \quad (49) \dots\dots 135$$

$$R_{d_{i,j}} = \frac{d_i}{d_j} \quad (50) \dots\dots 135$$

$$R_{a_{i,j}} = \frac{a_i}{a_j} \quad (51) \dots\dots 135$$

$$\left(\frac{u(R_{d_{i,j}})}{R_{d_{i,j}}} \right) \leq \left(\frac{u(R_{vI_{i,j}})}{R_{vI_{i,j}}} \right) / 5 \quad (52) \dots\dots 135$$

$$\left(\frac{u(R_{a_{i,j}})}{R_{a_{i,j}}} \right) \leq \left(\frac{u(R_{vI_{i,j}})}{R_{vI_{i,j}}} \right) / 5 \quad (53) \dots\dots 136$$

$$\gamma_{se} = \frac{m \cdot p_a}{v_{se}} \quad (54) \dots\dots 140$$

$$u_{(a)} = \sqrt{\left(\frac{u_m}{m} \right)^2 + \left(\frac{u_{p_a}}{p_a} \right)^2 + \left(\frac{u_{v_{se}}}{v_{se}} \right)^2} \quad (55) \dots\dots 140$$

$$d_1 = \frac{v_s}{v_s + v_{a1}} \quad (56) \dots\dots 141$$

$$m + 2 * EMA(ALEATORIO() - 0,5) \quad (57) \dots\dots 146$$

$$m + s_{bal}^{rep} \cdot INV.T(ALEATORIO(); 19) \quad (58) \dots\dots 146$$

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
2 REFERENCIAL TEÓRICO	32
2.1 ÁCIDO ÚRICO	32
2.2 ELETROQUÍMICA E ELETROANALÍTICA	33
2.2.1 Técnicas eletroanalíticas	33
2.2.2 Eletrodos modificados	34
2.2.3 Eletrodos de carbono e lignina	34
2.3 OTIMIZAÇÃO EXPERIMENTAL	37
2.4. AVALIAÇÃO DA INCERTEZA DA MEDIÇÃO	38
2.4.1 Terminologia e definições	38
2.4.2. Rastreabilidade da medição	41
2.4.3. Princípios da avaliação da incerteza	43
2.4.4. Métodos de combinação de componentes de incerteza	47
2.4.4.1 Lei da propagação de incertezas	48
2.4.4.2 Método numérico de Kragten	50
2.4.4.3 Método numérico de Monte Carlo	51
2.4.5 Avaliação bayesiana da incerteza da medição	52
2.4.6. Avaliação da incerteza em etapas unitárias	55
2.4.7. Abordagens pragmáticas de avaliação da incerteza	58
2.4.7.1 Abordagem <i>top-down interlaboratorial</i>	58
2.4.7.2 Abordagem <i>top-down intralaboratorial</i> : Programa VAM	59
2.4.7.3 Abordagem <i>top-down intralaboratorial</i> Nordtest	62
2.4.8 Comparação de abordagens de avaliação da incerteza	63
2.5 DESENVOLVIMENTO METROLÓGICO: MÉTODO DE ADIÇÃO CUMULATIVO DE PADRÃO (MAP-C)	65
3 OBJETIVO	68
4. EXPERIMENTAL	70
4.1 EQUIPAMENTOS	70
4.2 OBTENÇÃO DA LIGNINA	71
4.3 PREPARAÇÃO E MODIFICAÇÃO DOS ELETRODOS	71
4.4 PLANEJAMENTO FATORIAL	73
4.5 VALIDAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS	76

4.5.1 Homocedasticidade da resposta instrumental.....	76
4.5.2 Linearidade da resposta instrumental	77
4.5.3 Limites de detecção e quantificação	78
4.5.4 Modelo metrológico	79
4.6 PREPARO DOS CALIBRADORES.....	80
4.7 PREPARO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS	81
4.8 ESTIMATIVA DA INCERTEZA DA MEDIÇÃO.....	82
4.8.1 Abordagem <i>bottom-up</i> baseada no método dos mínimos quadrados	82
4.8.2 Abordagem <i>bottom-up</i> baseada em simulações Monte Carlo.....	86
4.8.3 Abordagem <i>top-down intralaboratorial</i> do programa VAM	88
4.8.4 Abordagem <i>top-down</i> do guia Nordtest.....	89
4.8.5 Compatibilidade Metrológica	90
4.9 AVALIAÇÃO BAYESIANA DA INCERTEZA DA MEDIÇÃO	90
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	92
5.1 CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ELETRODOS	92
5.2 PLANEJAMENTO FATORIAL PARA OTIMIZAÇÃO DO ELETRODO ...	99
5.3 CARACTERIZAÇÃO DO ELETRODO.....	103
5.4 CARACTERIZAÇÃO DO ELETRODO NA PRESENÇA DE ÁCIDO ÚRICO	115
5.5 VALIDAÇÃO DA CALIBRAÇÃO DO SENSOR.....	126
5.5.1 Avaliação preliminar do limite de detecção	126
5.5.2 Método de adição cumulativa de padrão.....	128
5.5.2.1. Seleção de variáveis da regressão linear	128
5.5.2.2. Aplicabilidade do método dos mínimos quadrados.....	130
5.5.3. Homocedasticidade e linearidade da resposta instrumental	131
5.5.4. Qualidade dos calibradores.....	134
5.5.5. Limiares analíticos.....	138
5.6 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE SORO.....	139
5.6.1. Avaliação <i>bottom-up</i> da incerteza baseada no método dos mínimos quadrados	139
5.6.2. Avaliação <i>bottom-up</i> baseada em simulações Monte Carlo.....	144
5.6.3. Validação das avaliações de incerteza <i>bottom-up</i>	150
5.6.4. Avaliação <i>top-down intralaboratorial</i> da incerteza	151
5.6.4.1. Abordagem do projeto VAM.....	151
5.6.4.2. Abordagem do guia Nordtest.....	153

5.6.5 Comparativo de avaliações de incerteza <i>bottom-up</i> e <i>top-down</i>	155
5.7. AVALIAÇÃO BAYESIANA DA INCERTEZA DA MEDIÇÃO	157
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	161
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	163

1 INTRODUÇÃO

O ácido úrico (AU) é um composto de grande interesse biomédico pois executa funções essenciais do metabolismo dos mamíferos, no qual o AU é um produto do metabolismo das purinas. Níveis anormais de AU são sintomas de várias doenças, dentre elas o infarto e a doença de Lesch–Nyhan (Wu *et al.*, 2016). O nível de concentração do AU em fluidos corporais tais como células, plasma sanguíneo e urina é um biomarcador de muitas condições clínicas, incluindo hiperglicemia e a gota (Rho *et al.*, 2011). Numerosas doenças, condições fisiológicas, alterações bioquímicas, fatores sociais e ambientais estão associados a aumentos da concentração de ácido úrico plasmático (Moriwaki, 2014).

O procedimento padrão utilizado nos laboratórios de análises clínicas para a análise de AU em soro sanguíneo é um método colorimétrico enzimático em que o ácido úrico é oxidado pela uricase (UOD), catalisada pela peroxidase (POD), no qual o peróxido de hidrogênio formado reage com o diclorofenolsulfonato (DCFS) e 4-aminoantipirina (4-AMP), produzindo uma antipirilquinonimina de cor vermelha. A absorvância do composto formado é medida a 505 nanômetros, sendo diretamente proporcional à concentração de ácido úrico da amostra (Kageyama, 1971).

A desvantagem desse procedimento é o custo da análise, a interferência causada por efeitos de matriz que podem inibir a ação da uricase, a turbidez de algumas amostras e o aquecimento da amostra, podendo causar perdas do item analisado, e conseqüentemente conduzindo a resultados de medição equivocadamente elevados (Benini *et al.*, 2014).

Outras técnicas utilizadas na determinação de ácido úrico encontradas na literatura são a fluorimétrica (Jin *et al.*, 2016), espectrofotometria alternativa à mencionada (Khajehsharifi *et al.*, 2017), além de técnicas eletroquímicas como a voltametria de onda quadrada (Granero *et al.*, 2016), pulso diferencial (Uzun *et al.*, 2015) e a amperometria (Guo *et al.*, 2016).

As técnicas eletroquímicas são especialmente adequadas a esta finalidade devido ao seu baixo custo. Os avanços da eletrônica permitiram a simplificação da instrumentação, em particular para determinação de ácido úrico. Outro aspecto importante para o emprego de eletrodos modificados é que estes permitem uma maior interação entre as espécies presentes em solução e a

superfície do eletrodo, assegurando maior seletividade e sensibilidade (Martin *et al.*, 2012).

Por causa da sensibilidade das técnicas eletroquímicas a efeitos de matriz, utiliza-se o método de adição de padrão (MAP). O MAP apresenta limitação em relação à quantidade de amostra necessária para proceder às adições de padrão, o que dificulta a sua aplicação. No entanto, a realização de adições cumulativas do padrão à mesma porção analítica de amostra, torna mais viável a implementação do MAP. Porém esta estratégia de adição tem como desvantagem a diluição progressiva da amostra, podendo causar erros nas análises se esta não for considerada nos cálculos (Goncalves *et al.*, 2016).

A adição de padrão é especialmente apropriada quando a composição da matriz da amostra é desconhecida ou complexa, e afeta o sinal analítico. Logo, o MAP compensa uma série de interferências ao se adicionar quantidades conhecidas do objeto de análise à amostra desconhecida (Steliopoulos, 2015).

Para que uma determinação analítica seja adequada, essa deverá apresentar uma incerteza conhecida inferior a um valor máximo admissível designado como incerteza alvo (Bettencourt da Silva, 2016). Considerando que o valor de ácido úrico em indivíduos saudáveis varia entre 2,5 a 7,0 mg dL⁻¹ para homens e 1,5 a 6,0 mg dL⁻¹ para mulheres, de acordo com o guia Eurachem/CITAC para a definição da incerteza alvo (Eurachem/CITAC, 2015), a incerteza expandida alvo será de 0,56 mg dL⁻¹ (um oitavo da amplitude do intervalo controlado).

É importante assegurar a qualidade das medições de AU visto que valores superiores a 7,0 mg dL⁻¹ podem servir de indicativo de que o paciente seja portador de ao menos uma das possíveis doenças: 1) gota; 2) insuficiência renal; 3) leucemia; 4) policitemia; 5) mieloma múltiplo; 6) intoxicação por chumbo e 7) cetoacidose, na síndrome de Lesch-Nyhan e nas hiperuricemias idiopáticas. Por outro lado, valores inferiores a 1,5 mg dL⁻¹ são pouco frequentes, mas podem indicar doenças tais como: 1) síndrome de Fanconi; 2) doença de Wilson e 3) doenças malignas, tais como linfoma de Hodgkin e carcinoma broncogênico. A presença de baixos níveis de ácido úrico está associada a perturbações neurodegenerativas, tais como a doença de Parkinson, esclerose múltipla e Alzheimer (Kutzinger *et al.*, 2008). O teor de AU por si não permite identificar uma doença, mas pode ser um indicativo (Zuo *et al.*, 2016).

A literatura apresenta várias abordagens para a avaliação da incerteza da medição destacando-se a abordagem *bottom-up*, a qual permite uma avaliação mais fina da incerteza a partir do levantamento detalhado de todas as componentes de incerteza. O levantamento da contribuição relativa das componentes de incerteza permite otimizar os custos e a incerteza da medição a partir de intervenções ao nível das componentes de incerteza minoritárias e maioritárias, respectivamente (Burr *et al.*, 2016).

Outra abordagem encontrada na literatura para estimativa da incerteza é designada como *top-down intralaboratorial*, envolvendo a utilização dos estudos de precisão e veracidade da medição, realizados durante a validação interna do procedimento, com vista a estimar, de forma combinada, componentes maioritárias da incerteza da medição. A veracidade de medição pode ser avaliada pela análise de materiais de referência certificados ou amostras fortificadas preparadas no laboratório (Eurachem/CITAC, 2012).

Pode-se também realizar uma avaliação bayesiana do resultado da medição que consiste na atualização de um conhecimento prévio do mensurando, considerando uma dada população de itens (*i.e.* soros de uma população), recorrendo ao resultado da medição do item estudado que deverá fazer parte da população previamente estudada (Gelman *et al.*, 2014). No caso da análise de ácido úrico em soro humano, o conhecimento prévio considerado é a prevalência de concentração de ácido úrico na população de um certo local.

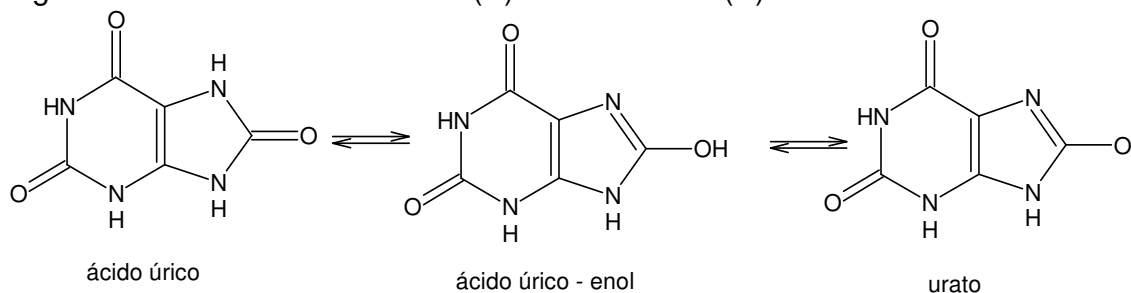
Sendo assim, estão descritas no presente trabalho diferentes abordagens de estimativa da incerteza da medição (*bottom-up*, *top-down intralaboratorial* e bayesiana), posteriormente aplicadas à determinação eletroquímica de ácido úrico em amostras de soro fisiológico e soro humano, recorrendo a calibrações analíticas por adição cumulativa de padrões à porção analítica de ensaio.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ÁCIDO ÚRICO

O ácido úrico (Figura 1) é o produto final do metabolismo das purinas e está presente principalmente no plasma na forma de urato. A concentração de ácido úrico no plasma humano é muito maior do que a encontrada em outros primatas, porque as células humanas não expressam a enzima oxidase de urato (uricase). Além disso, quase 90 % do ácido úrico produzido é reabsorvido ao longo dos túbulos renais. No plasma, esta molécula é um antioxidante importante para os seres humanos. O urato pode, por sua vez, complexar diversos íons de metais de transição, além de reagir com o ácido hipocloroso e radical hidroxila produzindo produtos relativamente instáveis (Meotti *et al.*, 2011).

Figura 1: Estrutura molecular de (A) Ácido Úrico e (B) Urato



Fonte: Elaborado pelo Autor

Técnicas eletroquímicas têm sido frequentemente aplicadas para a determinação de ácido úrico em uma variedade de matrizes biológicas (Amal Raj *et al.*, 2013), mas observa-se que para a determinação eletroquímica direta do ácido úrico recorrendo a eletrodos sólidos, sem modificação prévia, são exigidos elevados sobrepotenciais. Com tais potenciais aplicados tem-se o favorecimento da adsorção de outras substâncias interferentes, as quais coexistem nos fluidos biológicos, tais como o ácido ascórbico e dopamina, cujo potencial de oxidação são muito próximos ao do ácido úrico, resultando em perda de seletividade e precisão intermediária (Yu *et al.*, 2013).

Dessa forma, ultimamente, tem-se utilizado diversos eletrodos modificados com o objetivo de melhorar a seletividade e sensibilidade da determinação de ácido úrico, tais como eletrodos modificados com a inserção de nanopartículas de metais (Wang *et al.*, 2013), polímeros (Koçak *et al.*, 2013) e materiais à base de carbono como grafite e grafeno (Khan *et al.*, 2013).

No entanto, apesar de apresentarem algumas vantagens, tais como baixos limites de detecção e seletividade favorável, alguns destes eletrodos envolvem várias etapas de preparação e apresentam pouca repetibilidade.

Devido a fatores dessa natureza, existe a necessidade de desenvolver sensores eletroquímicos de construção rápida e simples, específicos para a determinação de ácido úrico.

2.2 ELETROQUÍMICA E ELETROANALÍTICA

2.2.1 Técnicas eletroanalíticas

As técnicas eletroanalíticas são uma classe de técnicas em química analítica que estudam um composto medindo o potencial e/ou corrente elétrica em uma célula eletroquímica seletiva para o item analisado (Gil *et al.*, 2013). Essas técnicas podem ser divididas em várias categorias dependendo dos parâmetros elétricos da célula que são mantidos constante ou medidos. As três principais categorias são: 1) a potenciometria, que envolve a medição da diferença de potenciais num par de eletrodos, 2) a coulometria, em que é medida de carga elétrica da célula ao longo do tempo e 3) a voltametria, em que a corrente elétrica da célula é medida enquanto altera ativamente o potencial (Zhang *et al.*, 2016).

A potenciometria mede passivamente a diferença de potencial desenvolvida entre dois eletrodos imersos em uma solução; afetando pouco a solução durante o processo de medição. Um dos eletrodos é denominado de eletrodo de referência e tem o seu potencial constante ao longo do tempo, enquanto o outro é denominado de eletrodo indicador, cujo potencial varia com a composição da amostra (Muñoz *et al.*, 2005). Portanto, a diferença de potencial entre os dois eletrodos permite uma avaliação da composição da solução analisada. O eletrodo seletivo mais comum é o eletrodo de membrana de vidro para medição de pH (Shapira *et al.*, 2016). Uma variante da potenciometria é a cronopotenciometria que consiste em utilizar uma corrente constante e medir a evolução do potencial do eletrodo indicador em função do tempo.

Já a coulometria envolve a medição da corrente quando aplicado um potencial com intuito de converter um composto de um estado de oxidação para outro. Em experimentos desta natureza, a corrente total aplicada é medida direta ou indiretamente para determinar o número de elétrons transferidos

(Cisternas *et al.*, 2015). O número de elétrons transferidos permite determinar a quantidade de item analisado na solução (*i.e.* mols do item analisado) e posteriormente a sua concentração na solução analisada ou, quando a concentração é conhecida, o número de elétrons transferidos na reação redox. As formas mais comuns de coulometria incluem a eletrogravimetria e as titulações coulométricas (Beutl *et al.*, 2017).

Já na voltametria, usa-se um sistema de dois ou três eletrodos e aplica-se uma diferença de potencial constante e/ou variável medindo-se a corrente resultante (Kokkinos *et al.*, 2017). Esta técnica permite explorar o comportamento eletroquímico de um sistema químico e revelar o potencial de oxidação e/ou redução de um item analisado e a sua reatividade eletroquímica (Sajid *et al.*, 2016).

2.2.2 Eletrodos modificados

Em química analítica, o principal objetivo de modificar superfícies de eletrodos é de ter a maior interação da superfície modificada com o item analisado em solução, assegurando assim uma maior sensibilidade e seletividade, e com isso ter o alargamento da aplicabilidade das medições. As superfícies mais usadas nos eletrodos modificados são ouro, platina e carbono, sendo modificadas com materiais biológicos, polímeros, óxidos, entre outros (Sajid *et al.*, 2016). Essas modificações permitem a construção de sensores amperométricos, voltamétricos, potenciométricos, impedimétricos, entre outros (Sajid *et al.*, 2016).

Os eletrodos modificados tendem a produzir maiores valores de corrente e menores valores de potencial, aumentando assim a sensibilidade e diminuindo o sobrepotencial com melhorias significativas na seletividade do sistema (Barsan *et al.*, 2015).

2.2.3 Eletrodos de carbono e lignina

Um eletrodo de pasta de carbono (EPC) é produzido a partir de uma mistura de pó de grafite condutor (ou outros materiais à base de carbono, como grafeno, nanotubos, entre outros) e de um líquido de colagem como óleo mineral. Estes eletrodos são fáceis de produzir e oferecem uma superfície facilmente renovável. Os eletrodos de carbono pertencem a um grupo especial de eletrodos

de carbono heterogêneos. Estes eletrodos são amplamente utilizados principalmente para medições voltamétricas, no entanto, sensores à base de carbono também são aplicáveis em coulometria, amperometria e potenciometria (Silveira *et al.*, 2017).

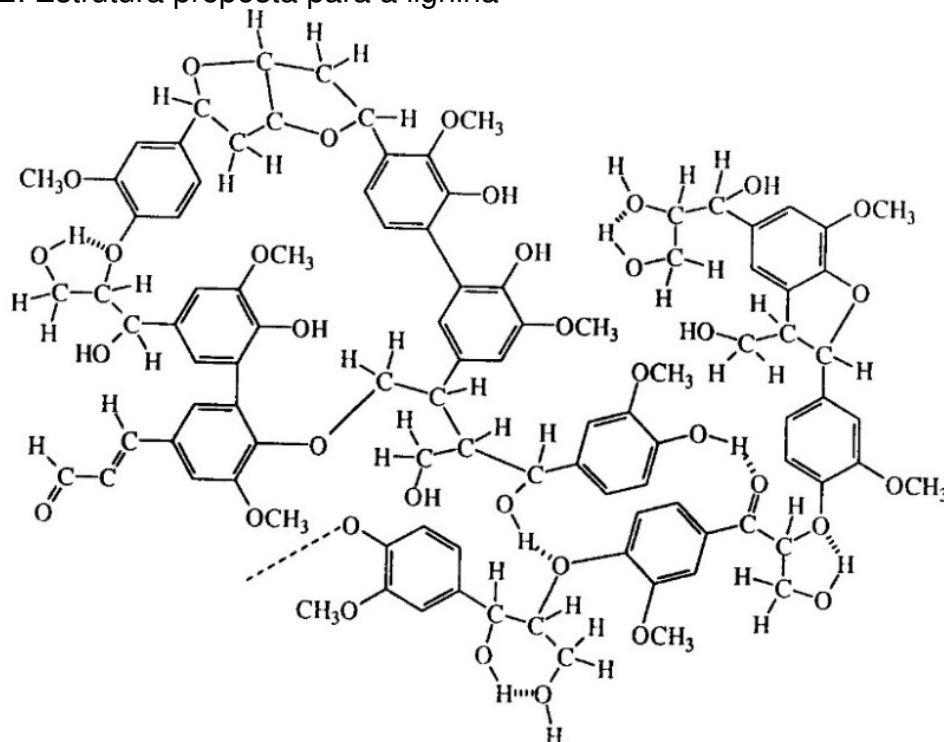
Em geral, os EPC são populares porque são facilmente obtidos a baixo custo e são especialmente adequados para preparar eletrodos modificados com misturas de outros compostos, dando assim ao eletrodo propriedades características. Os eletrodos fabricados desta forma são sensores altamente seletivos para a eletroquímica inorgânica e orgânica (Alizadeh *et al.*, 2017).

Dentre as modificações desses eletrodos de carbono, um material com grande potencial é a lignina (LG), que é uma classe de macromoléculas orgânicas com estrutura complexa que formam materiais estruturais importantes nos tecidos de suporte de plantas vasculares e de algumas algas (Chen *et al.*, 2017). As ligninas são particularmente importantes na formação de paredes celulares, especialmente na madeira, porque elas conferem rigidez e não apodrecem facilmente. Quimicamente, as ligninas são macromoléculas orgânicas fenólicas reticuladas (Gómez-Fernández *et al.*, 2017).

A lignina é uma macromolécula racêmica reticulada com massas moleculares superiores a 10.000 u (Figura 2), relativamente hidrofóbica e aromática na natureza. O grau de polimerização na natureza é difícil de medir uma vez que é fragmentado durante a extração e a molécula consiste em vários tipos de subestruturas que parecem repetir-se de forma aleatória. Diferentes tipos de lignina foram descritas dependendo dos meios de isolamento (Pradyawong *et al.*, 2017).

A composição da lignina varia de espécie para espécie. Um exemplo de composição é a observada em álamos, que é formada por aproximadamente 60 % de carbono, 6 % de hidrogênio, 0,7 % de cinzas e 30 % de oxigênio (Li *et al.*, 2017). A produção comercial global de lignina é de cerca de 1,1 milhões de toneladas métricas por ano, e são usadas em uma ampla gama de aplicações, tais como na purificação da água, como destacado no trabalho de Wahlström *et al.*, (2017).

Figura 2: Estrutura proposta para a lignina



Fonte: Mattsson *et al.*, (2016)

A modificação de eletrodos com lignina foi utilizada por diversos autores, como no trabalho de Buoro *et al.*, (2013) que modificou um eletrodo de pasta de carbono com lignina e nanopartículas de ouro, realizando um estudo eletroquímico de oxidação de dopamina e ácido ascórbico, além da redução de nitrito e iodato. Já no trabalho de Jędrzaka *et al.*, (2018), os autores fazem uma pasta de carbono modificada com lignina, sílica e glicose oxidase combinando nanotubos de carbono e nanopartículas de platina para construção de um biossensor para determinação de glicose em fluidos humanos.

Com isso, pode-se observar o potencial de aplicação da lignina na produção de eletrodos de carbono para análises eletroquímicas. Mas mesmo com este potencial de aplicabilidade, ainda se encontram poucos trabalhos na literatura que usam a lignina na produção de eletrodos modificados. A utilização de lignina na produção de eletrodos é encorajada pelo seu impacto no desempenho dos eletrodos, baixo custo e disponibilidade.

2.3 OTIMIZAÇÃO EXPERIMENTAL

A quimiometria é uma área científica multidisciplinar que consiste na aplicação de métodos estatísticos ou matemáticos para estudar dados de origem química. Essa disciplina é frequentemente usada para resolver problemas descritivos e preditivos de sistemas químicos caracterizados por múltiplas variáveis (Ríos-Reina *et al.*, 2017). Em aplicações descritivas, as propriedades dos sistemas químicos são modeladas com a intenção de entender as relações subjacentes e a estrutura do sistema, a fim de se obter a compreensão e identificação de um modelo apropriado para um determinado sistema. Nas aplicações preditivas, as propriedades dos sistemas químicos são modeladas com a intenção de prever novas propriedades ou comportamentos de interesse. Em ambos os casos, os conjuntos de dados podem ser pequenos, mas geralmente são muito grandes e altamente complexos, envolvendo centenas de variáveis, casos ou observações (Qiu *et al.*, 2017). A quimiometria é particularmente utilizada na química analítica com o intuito do desenvolvimento de procedimentos de análise otimizados (Wang *et al.*, 2017).

Dentro da quimiometria, o planejamento fatorial é de extrema importância devido a capacidade de identificação/triagem das variáveis mais relevantes de um determinado sistema analítico (Tarley *et al.*, 2009). Esta triagem envolve a realização de experimentos fazendo variar de forma controlada as variáveis relevantes com vista a permitir um maior conhecimento do sistema estudado. Na química analítica, um bom planejamento experimental é fundamental para fornecer os dados necessários à otimização da resposta analítica (Tarley *et al.*, 2009).

O planejamento fatorial se torna importante pois existe um constante interesse na determinação de possíveis relações entre as variáveis que afetam a resposta analítica. Essa ferramenta quimiométrica permite elaborar modelos que determinam o impacto das variáveis de influência, e suas eventuais correlações na resposta analítica por meio da observação de valores de resposta analítica, considerando várias combinações de níveis dessas variáveis (Wieling *et al.*, 1993). O tratamento adequado dessa informação permite construir modelos multivariados úteis para otimizar a resposta analítica.

Assim, por meio de um estudo de superfície de resposta, pode-se calcular os coeficientes da regressão polinomial multivariada que visa sugerir a maximização da resposta instrumental (Raji *et al.*, 2009).

O planejamento fatorial permite assim cumprir, de forma adequada, uma das primeiras etapas de um processo analítico, “a otimização da resposta do sistema”, para que, em seguida, esse seja aplicado ao estudo de casos reais e posteriormente seja avaliada a incerteza da caracterização do sistema estudado.

2.4. AVALIAÇÃO DA INCERTEZA DA MEDIÇÃO

2.4.1 Terminologia e definições

Em metrologia, segundo o Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM), a incerteza de medição é o “*parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas*” (JCGM, 2012; INMETRO & IPQ, 2012). Todas as medições são afetadas por uma incerteza e um resultado de medição só é apresentado de forma completa quando é apresentada a incerteza associada. Essa incerteza tem uma base probabilística e reflete o conhecimento incompleto do valor da grandeza medida (Subir *et al.*, 2011).

A grandeza que se pretende medir é designada como mensurando (INMETRO & IPQ, 2012). Nas medições em química, o mensurando é geralmente uma concentração ou uma fração de massa de uma espécie química como molécula, elemento ou íon, entre outros, no item analisado. A espécie química que se pretende determinar é designada como “analito”¹ (JCGM, 2012). Na análise de ácido úrico em soro humano, o mensurando será a concentração mássica de ácido úrico no soro de indivíduo X colhida no dia Y à hora Z. As variáveis X, Y e Z são necessárias para caracterizar a grandeza que se pretende determinar. Em alguns contextos, pode-se apresentar o mensurando de uma forma mais genérica, sem especificar o item analisado, como a concentração mássica de ácido úrico em soro humano.

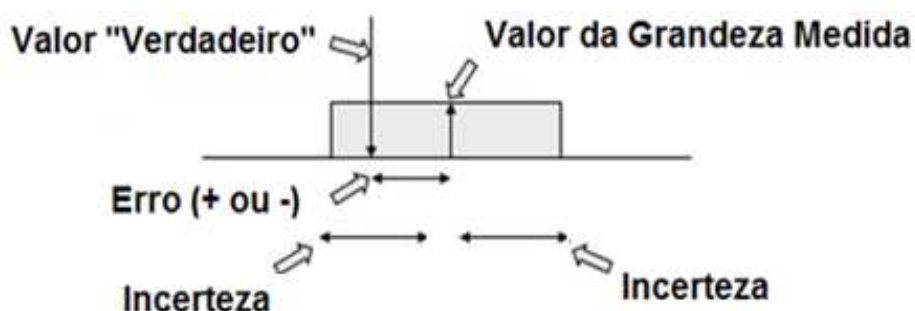
O objetivo de uma medição é determinar o valor aceito como verdadeiro do mensurando, sendo necessário um esforço de aperfeiçoamento e

¹ Segundo VIM (INMETRO & IPQ, 2012), “*Em química, “analito”, ou o nome duma substância ou dum composto, são termos utilizados algumas vezes para “mensuranda”. Tal uso é erróneo porque esses termos não se referem a grandezas.*”

compreensão do procedimento de medição. No entanto, o resultado de uma medição será apenas uma estimativa do valor real que, na maior parte dos casos, permanecerá como desconhecido. O valor “real” ou convencionalmente chamado de real é apenas conhecido nos materiais de referência (MR) como materiais de referência certificados (MRC) ou itens fortificados. Esse valor, habitualmente designado como valor de referência, é conhecido com uma determinada incerteza. A diferença entre o valor medido e o valor verdadeiro é chamado de erro. O erro pode ter um sinal positivo ou negativo. O erro resulta da combinação de efeitos aleatórios e efeitos sistemáticos que afetam a medição.

Em contrapartida, a qualidade do resultado da medição é quantificada pela incerteza de medição que define um intervalo em torno do valor de grandeza medido, y , que deverá incluir o valor convencionalmente aceito como verdadeiro, y_v , com uma probabilidade conhecida (Figura 3).

Figura 3: Inter-relações entre os conceitos “valor verdadeiro”, “valor da grandeza medida”, “erro” e “incerteza”



Fonte: Elaborado pelo Autor

Habitualmente, a incerteza de medição é reportada, na forma expandida, para um nível de confiança de 95 % ou 99 % (Miller *et al.*, 2005). A incerteza da medição por ser reportada na forma absoluta, U , nas mesmas unidades do valor da grandeza medida, y , ou na forma relativa, U' , determinada pela razão entre a incerteza absoluta e o valor de grandeza medido y como destacado na Equação (1) (Bettencourt da Silva, 2016).

$$U' = \frac{U}{y} \quad (1)$$

A incerteza relativa consiste numa proporção do valor da grandeza medida que não tem unidades e, por vezes, é expressa em porcentagem.

A incerteza de medição é diferente do erro, pois trata-se de um valor positivo que expressa uma amplitude que se estende acima e abaixo de y . Quando o nível de confiança da incerteza, P , (*i.e.* $P=95\%$ ou $P=99\%$) reportada é elevado, existe uma elevada probabilidade do módulo da diferença entre o valor de grandeza medido e o valor aceito como verdadeiro ser inferior à incerteza de medição. No entanto, existe sempre alguma probabilidade $(1-P)$ do módulo do erro ser superior à incerteza de medição (Bettencourt da Silva, 2016). Quando P é 95% ou 99% , existe uma probabilidade de 5% ou 1% , respectivamente do valor verdadeiro não estar incluído no intervalo $(y \pm U)$ em um teste bicaudal.

Os resultados de medição têm incerteza porque há fontes de incerteza em cada etapa analítica. Estes são os efeitos que causam os desvios entre o valor da grandeza medida e o “valor verdadeiro”. Se o procedimento de medição utilizado for bem conhecido, as fontes de incerteza mais importantes são conhecidas. Devem ser realizados esforços para minimizar as fontes de incerteza, otimizando o procedimento de medição e análise, e sempre que for necessário reportar resultados menos incertos. Não é possível eliminar todas as fontes de incerteza, no entanto, essas devem ser estimadas e consideradas na estimativa da incerteza (Eurachem/CITAC, 2012).

As magnitudes dos desvios causados pelas fontes de incerteza são geralmente desconhecidas e em muitos casos não podem ser conhecidos, assim, eles só podem ser estimados. Se forem estimadas as magnitudes de todas as fontes de incerteza importantes, então é possível combiná-las e obter a estimativa da incerteza de medição, que neste caso será chamada de incerteza de medição combinada (Eurachem/CITAC, 2012).

Se for realizado um número de medições repetidas do mesmo mensurando, idealmente todas estas medições repetidas devem dar exatamente o mesmo valor e este valor deve ser igual ao valor aceito como verdadeiro do mensurando. Na realidade, os resultados das medições repetidas quase sempre diferem entre si, sendo o seu valor central diferente do valor aceito como verdadeiro. Tal fato se deve, portanto, às fontes de incerteza, e, de forma um tanto quanto simplificada, as próprias fontes de incerteza podem ser divididas em componentes que expressam efeitos aleatórios e efeitos sistemáticos (Eurachem/CITAC, 2012).

Dentre tais fontes de incerteza, as que expressam efeitos aleatórios são responsáveis pelas diferenças entre os resultados de medições repetidas e, portanto, também do valor verdadeiro. No entanto, se forem realizadas medições repetidas, o valor médio é menos afetado por efeitos aleatórios que os valores individuais. Assim, a influência de efeitos aleatórios pode ser minimizado pelo aumento do número de repetições.

Por outro lado, os efeitos sistemáticos causam um desvio de todas as medições em relação ao valor verdadeiro e não são minimizados por análises repetidas (Miller *et al.*, 2005). No entanto, uma vez determinado, o erro sistemático da medição pode ser eliminado dos resultados por subtração desta componente do erro de medição². O erro sistemático de medição estimado é conhecido como uma incerteza que transmite incerteza ao resultado corrigido. Um exemplo desta correção de erros sistemáticos é em relação a recuperação de amostras em comparação com um MRC, quando a recuperação não é satisfatória, podendo-se corrigir, desde que se tenha consistência na recuperação e que não exceda o intervalo de confiança $\bar{x} \pm tu_y$.

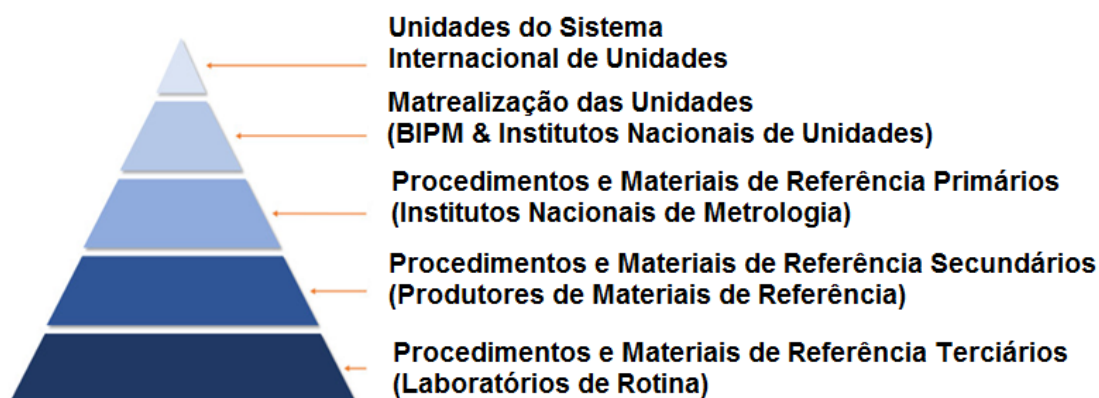
2.4.2. Rastreabilidade da medição

De acordo com o VIM, a Rastreabilidade Metrológica de Medição é a *“propriedade dum resultado de medição pela qual tal resultado pode ser relacionado a uma referência através duma cadeia ininterrupta e documentada de calibrações, cada uma contribuindo para a incerteza de medição”* (INMETRO & IPQ, 2012).

A Figura 4 apresenta uma pirâmide de rastreabilidade de medição que é a representação gráfica mais comumente utilizada para descrever a rastreabilidade de uma medição em relação as unidades do Sistema Internacional de unidades (SI). Este esquema apresenta uma hierarquia de procedimentos e referências entre as unidades SI e as medições de rotina.

² O erro de medição pode ser dividido em duas componentes: O erro aleatório e sistemático de medição.

Figura 4: Triângulo da rastreabilidade de medições às unidades do Sistema Internacional de Unidades. O esquema também identifica as instituições responsáveis pela gestão dos diferentes níveis da cadeia de rastreabilidade



Fonte: Elaborado pelo Autor

A rastreabilidade da medição é importante, pois proporciona confiança e garantia de que os resultados de medição concordem com os padrões nacionais ou internacionais usados. Quando duas medições são rastreáveis à mesma referência, dizem-se comparáveis (INMETRO & IPQ, 2012), visto que a sua comparação faz sentido do ponto de vista metrológico. A rastreabilidade da medição tem um impacto direto na incerteza da medição, visto que quanto maior for o número de níveis de cadeia responsáveis pela rastreabilidade do resultado à referência usada, maior será o número de comparações e calibrações que afetam o valor estimado da grandeza medida (Park *et al.*, 2009).

Idealmente, a comparabilidade da medição, deve ser assegurada por um sistema hierárquico de procedimentos e materiais de referência capazes de assegurar a rastreabilidade da medição a unidades do Sistema Internacional de Unidades. Todas as comparações envolvidas são realizadas por diferentes laboratórios, com uma incerteza conhecida, que mede a intensidade das ligações da cadeia de rastreabilidade (Park *et al.*, 2009).

Junto ao topo desta cadeia de rastreabilidade devem ficar os procedimentos primários cujos princípios físico-químicos e cuja qualidade de desempenho asseguram a obtenção de resultados de elevada qualidade. Estes procedimentos devem ser utilizados para validar procedimentos secundários que, por sua vez, são usados para avaliar o desempenho dos procedimentos usados nos laboratórios de ensaio. Normalmente, os

procedimentos primários são caros e demorados e os procedimentos correntemente usados nos laboratórios de rotina acreditados ou não acreditados são mais simples, mas também mais incertos (Park *et al.*, 2009).

Os procedimentos primários devem ser capazes de medir isoladamente a “entidade específica” de interesse (item analisado) e a relação entre a propriedade e a grandeza medida deve ser corrigida ou estar isenta de interferências. Um dos desafios mais exigentes da metrologia química é produzir procedimentos e referências primárias capazes de viabilizar a rastreabilidade das medições de rotina a unidades SI. Enquanto essas ferramentas não estão disponíveis, são usadas cadeias de rastreabilidade mais curtas baseadas em materiais com valores não rastreados diretamente à unidade SI .

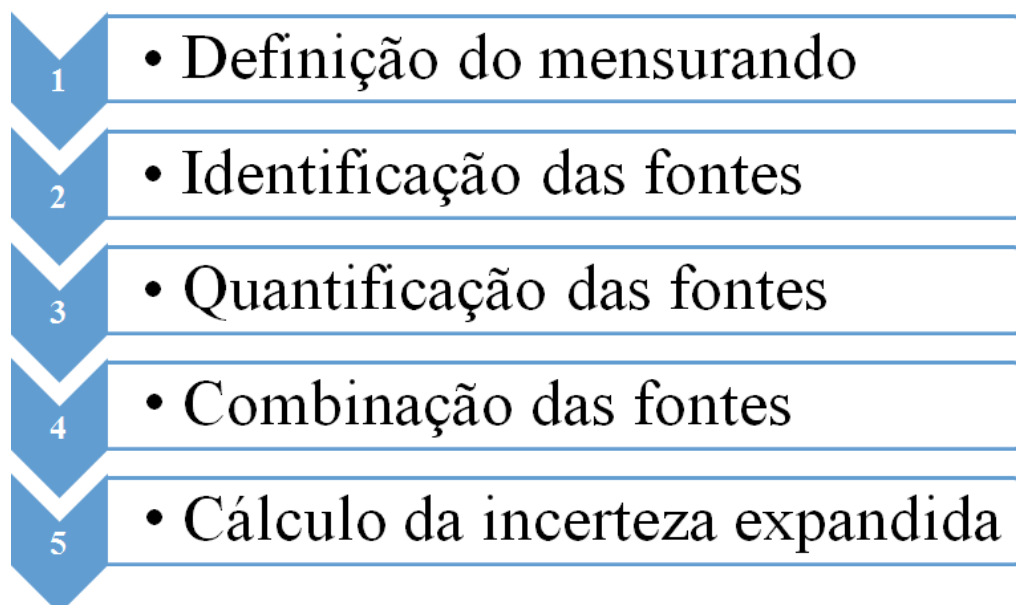
2.4.3. Princípios da avaliação da incerteza

Quando algum resultado é apresentado sob a forma de um valor único, este somente possui alguma objetividade para os analistas familiarizados com o procedimento de medição, desempenho dos equipamentos e qualidade das referências usadas. Com a globalização dos mercados, obriga-se que as informações dos boletins de análise sejam interpretáveis de forma objetiva por todos os interessados no resultado final. Só a informação analítica apresentada com incerteza é interpretável de forma objetiva.

A avaliação da incerteza da medição pode ser realizada recorrendo a diferentes abordagens que se distinguem pelos tipos de informação e algoritmos usados. Neste trabalho são discutidas as abordagens *bottom-up* e *top-down intralaboratorial*. A abordagem *bottom-up* estima a incerteza da medição recorrendo a dados do desempenho específico das diversas etapas analíticas, variáveis de influência e referências químicas usadas nos ensaios. Para tal, utiliza modelos complexos de determinação do impacto dessas componentes de incerteza na qualidade dos resultados de medição. A abordagem *top-down intralaboratorial* combina parâmetros do desempenho global da medição, recorrendo a algoritmos simples, para estimar a incerteza da medição.

Independentemente da abordagem de avaliação considerada neste trabalho, a estimativa da incerteza envolve o cumprimento de algumas etapas a destacar pela Figura 5.

Figura 5: Etapas para a estimativa da incerteza quando as componentes de incerteza são combinadas pela Lei de Propagação de Incertezas ou pelo Método numérico de Kragten



Fonte: Elaborado pelo Autor

Primeiramente deve-se definir o mensurando (seção 2.4.1), depois identificar as fontes de incerteza (seção 4.8.1 – Diagrama de Ishikawa), e por último quantificar e combinar as componentes de incerteza. Quando as componentes de incerteza são combinadas pela Lei de Propagação de Incertezas ou pelo método numérico de Kragten, a incerteza combinada na forma padrão tem de ser expandida para um nível de confiança típico de 95 % ou 99 % (seção 2.4.4). Já o método de Monte Carlo, a combinação de componentes de incerteza não envolve essa etapa de expansão conforme apresentado no Suplemento 01 do GUM (JCGM, 2012).

A quantificação das componentes de incerteza pode envolver avaliações Tipo A ou Tipo B. Quando é possível avaliar experimentalmente uma etapa analítica ou efeito específico na medição, por exemplo a precisão de uma etapa de pesagem quantificada pelo desvio padrão de pesagens sucessivas, procede-se a uma estimativa da incerteza Tipo A.

Em contrapartida, quando o valor de determinada componente de incerteza não é obtido pelo tratamento de ensaios experimentais, mas recorrendo a outro tipo de informação ou a um julgamento científico baseado na

informação disponível, procede-se a uma avaliação Tipo B³ (Han *et al.*, 2016). Essa informação pode provir de diversas fontes, tais como: medições anteriores cujos detalhes são desconhecidos; experiência ou conhecimento geral da propriedade; comportamento de materiais e instrumentos; especificações de reagentes, materiais ou equipamentos; dados produzidos em calibrações ou obtidos de outros certificados; incerteza atribuída a dados de referência retirados da bibliografia, entre outros (Han *et al.*, 2016).

Estão disponíveis diversos guias para estimativa da incerteza de medições, dentre eles merece destaque o documento “*Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*”, conhecido pela abreviatura GUM (JCGM, 2008), que tem os seguintes signatários: ISO (*International Organization for Standardization*), BIPM (*Bureau International des Poids et Mesures*), IEC (*International Electrotechnical Commission*), IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry*), IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), IUPAP (*International Union of Pure and Applied Physics*) e OIML (*International Organization of Legal Metrology*) (OIML, 2008). Esses guias e seus suplementos são aplicáveis a todos os tipos de medições e apresenta estratégias, metodologias, terminologias e convenções internacionalmente aceitas para a avaliação da incerteza de medições.

Outro guia que merece destaque é o guia Eurachem/CITAC para a quantificação da incerteza de medições em química (Eurachem/CITAC, 2012) que, desde a sua primeira edição em 1995, pretende sugerir como se aplica o GUM a medições em química. Esse guia discute a avaliação detalhada e pragmática da incerteza de ensaios químicos, apresentando ferramentas computacionais e exemplos relevantes. Em 2002, a Eurolab (Eurolab, 2002) publicou um guia com os objetivos similares do guia da Eurachem/CITAC, o qual, segundo os autores, tem como destinatários técnicos não familiarizados com o conceito de incerteza. Esse guia sugere simplificações da avaliação da incerteza da medição que se podem revelar inadequadas em algumas situações. Recentemente, a Nordtest (Nordtest, 2004) publicou um guia para a quantificação da incerteza associada a resultados de análises ambientais.

³ De acordo com GUM, a incerteza do tipo B depende de quaisquer outros fatores além da aleatoriedade, tais como o conhecimento que o experimentador tem acumulado sobre seus instrumentos e procedimentos de medição.

Em português tem disponível o guia IPAC OGC007 (OGC007, 2007) que descreve abordagens alternativas de avaliação da incerteza da medição. No Brasil, o guia mais utilizado é o guia do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO, o qual é baseado no GUM (INMETRO, 2008). Com isso, pode-se observar que existem diversos guias para estimativa das incertezas e garantia de qualidade nas medições em química.

Esses guias têm como objetivo dar suporte para que as medições sejam realizadas com qualidade adequada ao seu objetivo específico, que pode variar desde a avaliação da conformidade de um produto até a caracterização de um novo material. O cumprimento adequado do objetivo depende da adequação do valor da incerteza de medição para o uso (Eurachem/CITAC, 2012). Por exemplo, na análise de ácido úrico no soro sanguíneo, a incerteza deve ser suficientemente baixa de modo a permitir a determinação confiável de valores que indiquem situações de doenças. Portanto, ao se definir os requisitos de medição, além de especificar valores limite para características de desempenho tais como a recuperação do item analisado ou a repetibilidade de medição, também é necessário definir um valor alvo para a incerteza (*i.e.* valor de incerteza máxima admissível) (Eurachem/CITAC, 2012).

O Vocabulário Internacional de Metrologia em sua tradução Luso-Brasileira, define a incerteza alvo como a *“Incerteza de medição especificada como um limite superior e escolhida de acordo com o uso pretendido dos resultados de medição”* (INMETRO & IPQ, 2012). A decisão sobre a aptidão de um procedimento de medição para o uso pretendido depende não apenas da incerteza de medição, mas também de outras informações, tais como: 1) a faixa analítica; 2) o custo; e 3) a duração da análise.

Em algumas áreas da química analítica é a especificação e a legislação que define os valores limites para a grandeza determinada, e também define a incerteza-alvo. No entanto, em muitos outros campos, para os quais as medições são da mesma forma importantes, não é definida a incerteza alvo. Um exemplo desta aplicação é nas diretrizes europeias⁴ para solo, ar e água de consumo, como por exemplo para benzeno em ar que a incerteza alvo não deve ser superior a 25 %. Deve ser observado que o simples fato de se relatar a incerteza

⁴ As diretrizes europeias de regulação de valores máximos admissíveis e incerteza alvo estão disponíveis na homepage https://europa.eu/european-union/eu-law/legal-acts_en

associada ao resultado da medição não garante a sua aptidão para o uso pretendido (Eurachem/CITAC, 2012). Uma incerteza de medição metrologicamente correta só é válida se não for maior do que a incerteza-alvo definida, considerando-se o uso pretendido da medição. O guia Eurachem/CITAC para a definição da incerteza-alvo (Eurachem/CITAC, 2015), trata de como se procede para definir esse parâmetro quando esse não é definido pelo cliente ou regulador do setor de atividade (Eurachem/CITAC, 2015).

Como exemplo efetivo de aplicação do conceito de incerteza alvo na medição de ácido úrico em amostras de soro, considera-se que homens e mulheres saudáveis apresentam valores de ácido úrico entre $2,5 \text{ mg dL}^{-1}$ - $7,0 \text{ mg dL}^{-1}$ e $1,5 \text{ mg dL}^{-1}$ - $6,0 \text{ mg dL}^{-1}$, respectivamente (Elin *et al.*, 1982). Portanto, de acordo com a seção 5.1.2 do guia Eurachem/CITAC para a determinação da incerteza de medição do alvo (Eurachem/CITAC, 2015), pode-se seguir a Equação (2) para a determinação da incerteza alvo:

$$U^{tg} = \frac{Q^{max} - Q^{min}}{8} \quad (2)$$

no qual, o valor de U^{tg} é a incerteza alvo expandida, e Q^{max} e Q^{min} são os valores máximos e mínimos de ácido úrico de uma população de indivíduos saudáveis. Assim, partindo-se da Equação (2) e inserindo-se os valores individuais para cada termo presente na equação, a incerteza alvo de medição expandida para medições de ácido úrico será de $U^{tg} = 0,56 \text{ mg dL}^{-1}$. Com isso, a qualidade da medição depende da estimativa correta das incertezas associadas ao processo de medição e compará-la com esse valor máximo admissível.

2.4.4. Métodos de combinação de componentes de incerteza

Para a combinação das componentes de incerteza pode-se utilizar a lei da propagação de incertezas (LPI), e métodos numéricos como o método de Kragten ou simulações de Monte Carlo (MCM), que foram utilizados no presente trabalho, mas além desses, existem outros como o *bootstrapping* (Xu *et al.*, 2017).

2.4.4.1 Lei da propagação de incertezas

A propagação de incerteza consiste na avaliação do impacto da incerteza de uma variável de entrada na incerteza da variável de saída, habitualmente o resultado de uma medição, função desta. Quando as variáveis têm incerteza, cada uma dessas se propaga considerando o impacto que a variação do valor da variável de entrada tem na variável de saída, conforme apresentado na Equação (3) (JCMG, 2008):

$$u(y) = \sqrt{\left(\frac{\partial y}{\partial a}\right)^2 u(a)^2 + \left(\frac{\partial y}{\partial b}\right)^2 u(b)^2 + \left(\frac{\partial y}{\partial c}\right)^2 u(c)^2 + \dots \left(\frac{\partial y}{\partial n}\right)^2 u(n)^2} \quad (3)$$

no qual, $u(y)$ é a incerteza padrão do valor da grandeza medida, y , $u(i)$ é a incerteza padrão da variável de entrada i (*i.e.* a, b, c e n) e $(\partial y / \partial i)$ é a derivada parcial de y em relação à variável i . A $(\partial y / \partial i)$ representa a variação de y quando ocorre uma variação unitária da i . A Equação (3) só é aplicável quando as variáveis de entrada são independentes. As componentes de incerteza combinam-se na forma padrão, representada com a notação “ u ” minúsculo, em que o intervalo $(i \pm u(i))$ deverá incluir o valor verdadeiro da variável com um nível de probabilidade de 68 %. A incerteza combinada, $u(y)$, também está associada ao mesmo nível de confiança.

A aplicação da LPI é mais simples se for considerado casos particulares, como a combinação linear das variáveis de entrada (*i.e.* a soma ou subtração das variáveis) (Equações (4) e (5)) ou combinação de variáveis por meio de expressões multiplicativas (*i.e.* pela multiplicação e/ou divisão das variáveis de entrada) (Equações (6) e (7)) quando as variáveis de entrada são independentes. As Equações (5) e (7) são obtidas pela aplicação da Equação (3) às expressões da Equação (4) e Equação (6), respectivamente.

$$y = k + k_a a + k_b b + k_c c + k_d d \quad (4)$$

$$u_y = \sqrt{(k_a u_a)^2 + (k_b u_b)^2 + (k_c u_c)^2 + (k_d u_d)^2} \quad (5)$$

$$y = \frac{k.a.b}{c.d} \quad (6)$$

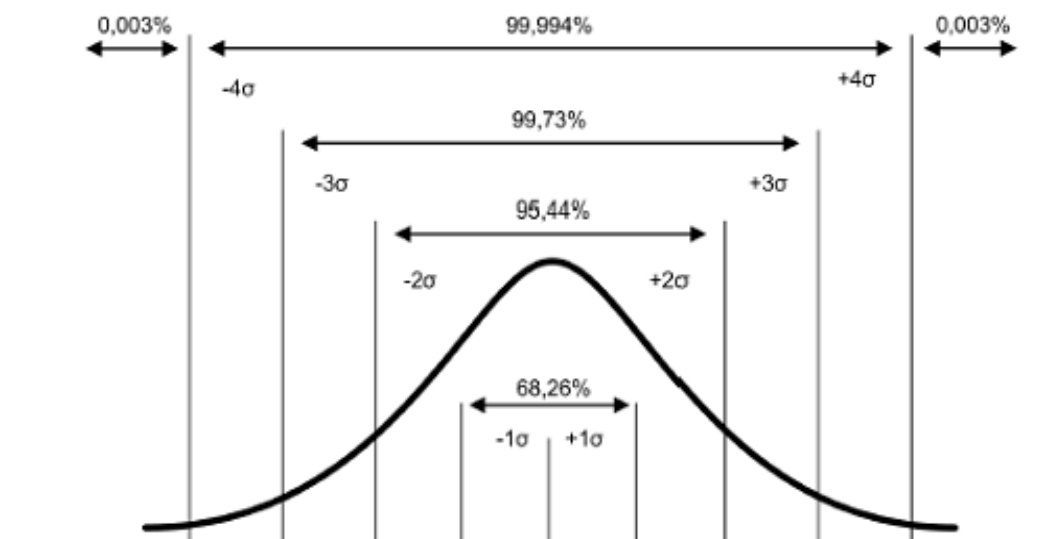
$$\frac{u_y}{y} = \sqrt{\left(\frac{u_a}{a}\right)^2 + \left(\frac{u_b}{b}\right)^2 + \left(\frac{u_c}{c}\right)^2 + \left(\frac{u_d}{d}\right)^2} \quad (7)$$

Sendo que k_i são as constantes das Equações (4) e (6) em que i representa cada uma das variáveis de entrada. As Equações (5) e (7) não podem

ser usadas quando a mesma variável surge varias vezes na expressão usada para estimar a variável de saída. Nesses casos, é necessário recorrer à Equação geral (3).

A incerteza padrão do resultado final, $u(y)$, deve ser expandida para um nível de confiança de 95 % ou 99 %, tipicamente pela multiplicação por um fator de abrangência, k , igual a 2 ou 3, respectivamente, antes de se reportar o resultado. A incerteza expandida é representada por um “ U ” maiúsculo ($U(y) = ku(y)$). Esses fatores de abrangência são definidos assumindo que a estimativa do mensurando tem distribuição normal com base na distribuição t -student. A Figura 6 apresenta as propriedades da distribuição normal (Miller *et al.*, 2005).

Figura 6: Função de densidade de probabilidade da distribuição normal e intervalos de confiança de 68 %, 95,5 % e 99,7%



Fonte: Adaptado de Leito *et al.*, (2017)

A curva de densidade de probabilidade da distribuição normal tem a “*forma de sino*”, e é expressa pela Equação (8) (Leito, *et al.*, 2017):

$$f(y) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(y-\mu)^2}{2\sigma^2}} \quad (8)$$

no qual, $f(y)$ é a probabilidade da curva de distribuição, μ e σ são o valor médio e o desvio padrão da população, respectivamente. O termo μ caracteriza a posição da distribuição normal no eixo y e σ quantifica a largura da função de densidade de probabilidade que representa a dispersão dos valores da variável.

As constantes 2 e π são fatores de normalização, que estão presentes para tornar a área total sob a curva igual a 1 .

A palavra "*população*" descreve um número infinito de valores da variável cuja média e desvio padrão se pretende determinar com um número limitado de determinações; recorrendo a uma amostra estatística da população.

2.4.4.2 Método numérico de Kragten

O método numérico sugerido por Kragten faz uso efetivo de planilha eletrônica para fornecer uma incerteza padrão combinada a partir das incertezas padrão das variáveis de entrada e do modelo de medição (Kragten, 1994).

Um software de planilha como o MS-Excel pode ser usado para simplificar os cálculos das derivadas parciais. Nesse sentido, o procedimento tira proveito de um método numérico aproximado de diferenciação que requer conhecimento somente da equação usada para determinar o resultado final, incluindo quaisquer variáveis de influência ou fatores de correção usados, e dos valores e incertezas padrão das variáveis de entrada. O método de Kragten determina, em alguns casos de forma aproximada, as derivadas parciais apresentadas na Equação (3) pela Equação (9) (Kragten, 1994).

$$\frac{\partial y}{\partial i} = \frac{y(x_i + u(x_i)) - y(x_i)}{u(x_i)} \quad (9)$$

Em que x_i representa o valor da variável i usado para estimar o resultado final, y , e $u(x_i)$ a incerteza padrão associada a x_i . Os termos $y(x_i + u(x_i))$ e $y(x_i)$ representam os resultados estimados considerando que os valores da variável i são $x_i + u(x_i)$ e x_i , respectivamente. Os valores de todas as outras variáveis coincidem com o usado para estimar o valor de grandeza medida, y .

O método numérico de Kragten estima a derivada parcial de forma exata se y varia linearmente com x_i . Caso a variação de y não seja linear em relação a i , a derivada parcial é mais exata quanto menor for $u(x_i)$. Quando nenhuma das condições anteriores for válida, não se deve usar o método de Kragten ou a LPI para combinar as componentes de incerteza. Nesse caso, deve-se usar um método numérico como o método de simulações de Monte Carlo descrito em seguida.

Multiplicando-se a Equação (9) por $u(x_i)$, obtém-se uma estimativa de $(\partial y/\partial x_i)u(x_i)$ apresentado com a notação $u(y, x_i)$, (Equação (10)), sendo esta a derivada parcial numérica.

$$u(y, x_i) = (\partial y/\partial x_i)u(x_i) \approx y(x_i + u(x_i)) - y(x_i) \quad (10)$$

Assim, $u(y, x_i)$ é apenas a diferença entre os valores de y calculados para $(x_i + u(x_i))$ e x_i , respectivamente.

O método de Kratgen é especialmente atrativo quando a aplicação da LPI envolve a determinação de derivadas parciais complexas.

2.4.4.3 Método numérico de Monte Carlo

O método de simulações de Monte Carlo é uma ampla classe de métodos computacionais que dependem da amostragem aleatória e repetida de funções de densidade de probabilidade das variáveis de entrada, para se estimar um conjunto de variáveis de saída. Sua ideia essencial é usar a aleatoriedade para resolver problemas que podem ser deterministas. Eles são frequentemente usados em problemas químicos, físicos e matemáticos e são mais úteis quando é difícil ou impossível usar outras abordagens (Cheng *et al.*, 2017). Em alguns casos, o modelo de medição é computacional não envolvendo a sua explicitação na forma de uma equação matemática.

Na área da química analítica, as simulações de Monte Carlo têm grande utilidade para a combinação de componentes de incerteza. Para tal aplicação, se usa como variáveis de entrada todas as componentes de incerteza, sendo as componentes caracterizadas pela função de densidade de probabilidade da variável. As distribuições mais utilizadas na metrologia em química são as distribuições triangular, retangular e t -Student.

O software simula valores das variáveis de entrada considerando a sua distribuição e combina cada conjunto de variáveis num resultado final. O grande número de resultados simulados permite estimar a variabilidade probabilística da estimativas que se converte numa estimativa do mensurando com incerteza. O intervalo de confiança com um nível de confiança P é limitado pelos percentis $P/2$ e $(1-P/2)$ (Innal *et al.*, 2016). Os limites do intervalo de confiança variam com a série de valores aleatórios considerados, sendo praticamente constantes quando o número de resultados finais simulados é

elevado. Para a maioria das medições em química, a produção de 10.000 a 100.000 simulações produz intervalos de confiança estáveis.

A desvantagem dessa ferramenta é a necessidade de recursos computacionais complexos (Sega *et al.*, 2016). No entanto, em medições químicas que envolvem dezenas de variáveis para as quais é suficiente proceder de 10.000 a 100.000 simulações de combinações dessas variáveis, é possível implementar essas simulações numa folha de cálculo de MS-Excel.

O MCM é aplicável mesmo quando a variável de saída não varia linearmente com os valores das variáveis de entrada, mas requer recursos computacionais que são mais exigentes quando o número de variáveis de entrada é elevado, sendo necessário produzir um grande número de simulações.

2.4.5 Avaliação bayesiana da incerteza da medição

A inferência bayesiana é uma interpretação do conceito de probabilidade em que, em vez de frequência ou propensão de algum fenómeno, a probabilidade é interpretada como expectativa razoável representando um estado de conhecimento posterior a partir de um conhecimento prévio. A interpretação bayesiana de probabilidade pode ser vista como uma extensão da lógica proposicional que permite o raciocínio com hipóteses, isto é, as proposições cuja verdade ou falsidade são incertas. Na avaliação bayesiana, uma probabilidade é atribuída a uma hipótese, enquanto que sob a inferência frequentista, uma hipótese normalmente é testada sem ter uma probabilidade atribuída.

A probabilidade bayesiana pertence à categoria de probabilidades evidenciais, a qual para avaliar a probabilidade de uma hipótese, o probabilista bayesiano necessita de alguma probabilidade anterior, que é então atualizada para uma probabilidade posterior de acordo com evidências relevantes. A interpretação bayesiana fornece um conjunto padrão de procedimentos e fórmulas para executar esse cálculo (Gelman *et al.*, 2014). A avaliação bayesiana consiste na atualização de informação pré-analítica com o resultado da medição para se estimar o valor da grandeza medida.

A avaliação bayesiana fornece uma maneira sistemática de estimar a incerteza de uma ocorrência com base no conhecimento a priori da frequência da ocorrência, e comparando esse conhecimento com informação sobre

evidências recolhidas da ocorrência, visando a produção de informação atualizada sobre o sistema estudado; por exemplo, a realidade material do item analisado (Saffaj *et al.*, 2012).

Embora o campo da estatística bayesiana tenha várias vertentes diferentes, existem duas ideias básicas comuns a todas as abordagens bayesianas: o uso sistemático do teorema de Bayes e o fato de todas as grandezas desconhecidas serem tratadas como variáveis aleatórias. Uma definição útil de variável aleatória é um item que pode ser descrito por uma declaração de probabilidade. Nas avaliações bayesianas baseadas em variáveis discretas ou contínuas, essas declarações são apresentadas na forma de uma probabilidade ou uma função de densidade de probabilidades, respectivamente. Na sua forma canônica, o teorema de Bayes descreve uma relação entre probabilidades condicionais (Gelman *et al.*, 2014) (Equação (11)):

$$Pr(A|B) = \frac{Pr(B|A) \cdot Pr(A)}{Pr(B)} \quad (11)$$

em que $Pr(A)$ representa a probabilidade da ocorrência A (*i.e.* concentração x do item analisado na classe de itens analisados) antes de se recolherem evidência da ocorrência (*i.e.* antes do resultado de medição, y – a evidência, B), $Pr(B)$ representa a probabilidade de ser observada a evidência B independentemente da ocorrência A (*i.e.* probabilidade de se estimar o resultado y) e $Pr(B|A)$, designado como função de verossimilhança, indica a probabilidade de se obter a evidência B quando ocorre A . A $Pr(A|B)$, designada como distribuição posterior (ou *a posteriori*), representa o conhecimento obtido sobre a ocorrência A após reunida a evidência B (Gelman *et al.*, 2014). De acordo com a estatística bayesiana, o resultado de uma medição apenas descreve o processo de medição necessitando de informação prévia sobre o sistema estudado para converter a medição num conhecimento sobre a realidade material do item analisado.

Quando as variáveis estudadas são contínuas, a Equação (11) torna-se mais explícita na forma da Equação (12):

$$Pr(a_1 \leq A \leq a_2 | b_1 \leq B \leq b_2) = \int_{a_1}^{a_2} \int_{b_1}^{b_2} p(B|A)p(A)dBdA \quad (12)$$

em que $Pr(a_1 \leq A \leq a_2 | b_1 \leq B \leq b_2)$ é a probabilidade da ocorrência A assumir valores entre a_1 e a_2 quando a evidência B assume valores entre b_1 e b_2 , e os p minúsculos (*i.e.* $p(B|A)$) representam funções de densidade de probabilidade.

A $Pr(a_1 \leq A \leq a_2 | b_1 \leq B \leq b_2)$ pode ser determinada de forma analítica (*i.e.* pelo cálculo da integral dupla) quando, por exemplo, $p(B|A)$ e $p(A)$ têm distribuição normal, ou recorrendo a métodos numéricos. Para esta avaliação é possível a utilização das simulações *Markov chain Monte Carlo* (MCMC). Este método é uma classe de algoritmos para amostragem de uma distribuição de probabilidade baseada na construção de uma cadeia de Markov que possui a distribuição desejada como sua distribuição de equilíbrio. O estado desta cadeia após uma série de etapas é então usada como uma amostra da distribuição desejada. A qualidade da amostra melhora com o aumento do número de simulações/interações.

O desenvolvimento recente do método MCMC tem permitido a utilização da estatística bayesiana para o estudo de problemas que envolvem a integração de centenas ou mesmo milhares de parâmetros desconhecidos (Malve *et al.*, 2007).

A abordagem bayesiana é controversa por causa da dificuldade em especificar distribuições prévias aceitáveis e significativas. Em uma avaliação bayesiana, uma distribuição prévia completa deve ser especificada para cada parâmetro desconhecido. Uma das maiores objeções à abordagem bayesiana é o alto grau de subjetividade associado à seleção dessas distribuições. Na área clínica, pode-se aplicar a estatística bayesiana em função do histórico de doença de um paciente, de uma população ou de um sintoma apresentado (Theodorsson, 2017). Em análises clínicas, a avaliação bayesiana é importante para avaliação de risco em exames laboratoriais, em particular para avaliar os riscos nos cuidados de saúde. No entanto, a abordagem bayesiana é, em muitos casos, difícil de implementar, pois é baseada em conceitos abstratos e em modelagem.

Mas ela também se mostra eficiente para análise de risco, sendo uma ferramenta simplificada e tornada mais acessível, concentrando-se em previsões de quantidades observáveis e realizando avaliações de incerteza dessas quantidades usando probabilidades subjetivas (Aven *et al.*, 2007). A abordagem bayesiana preditiva fornece uma estrutura para assegurar a qualidade da análise de risco. Esta abordagem reconhece que o risco não pode ser adequadamente descrito e avaliado simplesmente por referência ao resumo das probabilidades.

O risco é definido pela combinação de possíveis consequências e incertezas associadas.

Uma das vantagens da avaliação bayesiana em casos que envolvem procedimentos de análise com etapas de transferência de massa (*e.g.* extração do item analisado), é a forma como podem ser geridas eventuais das perdas no processo de medição. Os dados da avaliação prévia de perdas reunidos durante a validação da medição, podem ser entendidos como conhecimento prévio de um modelo bayesiano condicionado o valor a estimar para o resultado da amostra desconhecida. Com isso, a avaliação bayesiana da incerteza da medição se mostra uma ferramenta útil para análises clínicas e outros tipos de determinações.

2.4.6. Avaliação da incerteza em etapas unitárias

A abordagem *bottom-up* de avaliação da incerteza da medição envolve a estimativa e combinação da incerteza associada às variáveis que afetam o resultado da medição. Muitas destas variáveis coincidem com as etapas analíticas e, em alguns casos, são descritas por modelos metrologicos complexos. As incertezas de medição podem assim ser segmentadas de acordo com as diferentes etapas do procedimento. A abordagem *bottom-up* exige uma descrição clara da relação entre o valor da grandeza medida e todas as variáveis de que esta depende. Estas variáveis podem ser valores medidos (*i.e.* valores de massa, volume ou concentração), fatores de correção ou variáveis de influência. Geralmente, o levantamento das fontes de incerteza é realizado seguindo o fluxograma das etapas do procedimento de medição e produzindo a fórmula usada para calcular o valor de grandeza medida (Song *et al.*, 2017).

A representação gráfica desta informação é muitas vezes realizada por diagramas de Ishikawa ou de espinha de peixe (Salvador *et al.*, 2004) que facilitam a identificação das fontes de incerteza e das suas correlações, evitando o esquecimento ou a contabilização repetida das componentes de incerteza (seção 4.8.1). A vantagem da abordagem *bottom-up* é a discriminação de todos as componentes de incerteza de forma separada, permitindo saber quais são as componentes mais relevantes e evitar de superestimar a incerteza pela simplificação da quantificação das componentes. Esta abordagem tem como

desvantagem a dificuldade de aplicação a medições com etapas difíceis de modelar como etapas de extração do item analisado ou digestão da matriz da amostra (Song *et al.*, 2017).

As etapas analíticas mais comuns, para as quais foram desenvolvidos modelos de desempenho detalhados, são pesagens, medições de volume e quantificações instrumentais. A extração do item analisado e a digestão da amostra, comuns em alguns setores analíticos, requerem uma modelação experimental indireta como a conseguida pela abordagem diferencial de avaliação da incerteza (Bettencourt da Silva *et al.*, 2000). Cada etapa analítica tem de ser estudada considerando os efeitos aleatórios e sistemáticos que afetam o seu desempenho.

A determinação da massa real de uma porção de amostra ou padrão, recorrendo a uma pesagem ao ar (não em vácuo), envolve a determinação de um peso que consiste na força que a massa aplica no prato da balança e resulta da combinação de três forças: 1) força gravítica devida à atração entre a terra e o corpo; 2) a componente da força centrífuga perpendicular à tangente da superfície da terra produzida pela rotação da terra; 3) impulsão estática e 4) outras forças que podem ser eliminadas por uma prática correta de pesagem.

No entanto, na grande maioria dos casos, os laboratórios de ensaios químicos determinam massas convencionais como definido na recomendação R 33 da Organização Internacional de Metrologia Legal (OIML) (OIML R33, 1979). Esta convenção referencia as determinações de pesagens em ar com uma massa específica de $1,2 \text{ kg m}^{-3}$ considerando uma massa específica do corpo pesado de 8000 kg m^{-3} , que corresponde à pesagem de aço-inoxidável ao nível do mar em condições atmosféricas normais. A determinação direta da massa convencional é realizada com o uso de balanças calibradas com massas de referência de aço-inoxidável visto que as variações habituais da massa específica do ar em torno de $1,2 \text{ kg m}^{-3}$ não afetam significativamente a massa determinada.

Se a pesagem for efetuada de acordo com as boas práticas laboratoriais, habitualmente, as fontes de incerteza contabilizadas são as originadas por efeitos aleatórios estimadas pelo desvio padrão da repetibilidade de pesagens, e originadas por efeitos sistemáticos observáveis durante a calibração da balança e resultantes da incerteza associada à sensibilidade e linearidade da

resposta da balança. Quando a pesagem é efetuada por diferença, as fontes de incerteza associadas à repetibilidade e à calibração da balança podem ocorrer duas vezes (Song *et al.*, 2017). A combinação dessas componentes pode ser realizada utilizando a lei da propagação de incertezas (ver seção 2.4.4.1).

Já as fontes de incerteza associadas a medições de volume proveem de efeitos aleatórios, associados à repetibilidade da manipulação do equipamento e estimados num estudo gravimétrico de repetibilidade, e efeitos sistemáticos estimados pela tolerância associada ao valor nominal do material volumétrico e à diferença entre a temperatura da solução medida e a temperatura de referência do valor nominal. Quando se processa a uma diluição volumétrica, a incerteza associada ao efeito da temperatura anula-se quando as medições de volume forem realizadas num curto espaço de tempo (ver seção 4.8.1) (Eurachem/CITAC, 2012).

A incerteza associada a quantificações instrumentais, realizada com equipamento calibrado recorrendo a modelos estatísticos de regressão, pode ser estimada considerando duas componentes de incerteza: 1) a incerteza associada à interpolação ou extrapolação estatística do sinal da amostra na curva de calibração ou da curva de adição padrão, respectivamente, (ver seção 4.8.1) e, 2) a incerteza associada aos valores das referências, tais como padrões químicos, usados na calibração de um procedimento instrumental de análise. Esta componente pode ser desprezável.

Quando é usado o método dos mínimos quadrados (MMQ) para calibrar a instrumentação e para estimar a incerteza padrão de interpolação ou extrapolação é necessário salvaguardar que sejam respeitados todos os pressupostos do modelo de regressão. Os pressupostos do MMQ são a homogeneidade de variâncias e linearidade da resposta instrumental, e irrelevância da incerteza associada ao valor relativo dos padrões de calibração, considerando a razão da repetibilidade da resposta instrumental. A incerteza padrão relativa associada à preparação dos padrões de calibração é estimada, por excesso, pela incerteza padrão relativa associada ao teor do padrão de calibração com menor concentração, pois é o que apresenta a incerteza relativa mais elevada (Bettencourt da Silva *et al.*, 2010).

Para estimar a incerteza associada ao valor de um padrão de calibração, por vezes, é necessário combinar as incertezas associadas à pureza, pesagem

e diluição da substância de referência, por exemplo, recorrendo à lei da propagação de incertezas (Song *et al.*, 2017).

Bettencourt da Silva *et al.* (2010) discutiram como verificar os pressupostos do método dos mínimos quadrados quanto à qualidade dos calibradores, homocedasticidade e linearidade do sinal instrumental quando um procedimento instrumental de análise é sujeito a uma calibração externa. Designam-se como calibrações externas as apresentações de padrões ao procedimento instrumental de análise que visa estimar o sinal necessário à construção de uma curva de calibração aplicável à quantificação de diversas amostras. Mais recentemente, Bettencourt da Silva (2016) desenvolveu um tutorial e uma planilha validada, com o objetivo de projetar, validar e estimar a incerteza de medições com base em calibrações externas construídas pelo MMQ.

Na sequência do trabalho de Bettencourt da Silva *et al.* (2010), Rodrigues *et al.* (2015) discutiram como verificar o cumprimento dos pressupostos do MMQ em calibrações pelo método de adição padrão. Em particular, foi discutido a forma de avaliar a adequação da qualidade da diluição da amostra e adição padrão para utilização deste modelo de regressão na avaliação da incerteza.

2.4.7. Abordagens pragmáticas de avaliação da incerteza

As abordagens *top-down* podem dividir-se em abordagens *top-down interlaboratorial* e *top-down intralaboratorial* dependendo do tipo de parâmetros de desempenho global da medição usados na avaliação da incerteza.

2.4.7.1 Abordagem *top-down interlaboratorial*

A aplicação da abordagem *top-down interlaboratorial* de avaliação da incerteza da medição é mais simples quando a medição é operacionalmente definida ou realizada usando um procedimento de medição utilizado pela generalidade dos laboratórios. Nesses casos, pode-se assumir que os efeitos sistemáticos associados ao princípio físico-químico da medição são nulos.

Se um laboratório utiliza um procedimento normalizado validado, apenas tem de provar que é capaz de aplicar corretamente o procedimento dentro dos

seus limites de repetibilidade e reprodutibilidade, reportando a incerteza recorrendo à reprodutibilidade de medição. Isso pode ser feito participando de um ensaio colaborativo, testes de proficiência ou comparação bilateral (Bai *et al.*, 2009).

Nessa abordagem, o desvio padrão da reprodutibilidade da medição, s_R , estimado em ensaios colaborativos ou em testes de aptidão mono-procedimento, pode ser usado diretamente como incerteza padrão da medição ($u(y) = s_R$). Depois de expandida, com um fator de expansão adequado, k , a incerteza pode ser reportada na forma expandida (Equação (13)).

$$U(y) = k \cdot s_R \quad (13)$$

Se s_R for estimada com um número elevado de graus de liberdade, k será igual a 2 ou 3, que expande a incerteza para um nível de confiança aproximado de $P = 95\%$ ou 99% , respectivamente.

Tendo em conta que essa abordagem superestima a incerteza da medição ao considerar a diversidade de efeitos sistemáticos que afetam as medições de diversos laboratórios e o fato de, muitas vezes, não estar disponível informação interlaboratorial, desenvolveram-se metodologias alternativas, como as apresentadas no programa VAM (*Valid Analytical Measurements*), guia Eurachem/CITAC e guia Nordtest (Ellison *et al.*, 2000; Eurachem/CITAC, 2012; Nordtest, 2004).

2.4.7.2 Abordagem *top-down intralaboratorial*: Programa VAM

Entre 1998 e 2000 foram apresentadas diversas abordagens do tipo *top-down intralaboratorial* dos quais se destacam a abordagem proposta no programa VAM devido ao balanço equilibrado entre simplicidade e rigor da avaliação.

Em 1998, o programa VAM do Reino Unido apresentou a chamada “abordagem de reconciliação”. Esta abordagem baseia-se na combinação da incerteza associada ao resultado da medição estimada por parâmetros de desempenho global da medição, reunidos durante a sua validação intralaboratorial, com a incerteza associada às componentes que são mantidas constantes durante os estudos de validação. Esta abordagem envolve a divisão das fontes de incerteza em três tipos: 1) Incerteza associada à precisão, $u_{precisão}$,

(fontes aleatórias); 2) Incerteza associada à veracidade, $u_{veracidade}$, (fontes sistemáticas), e 3) outras fontes de incerteza não estimadas experimentalmente, u_{outras} (Ellison *et al.*, 2000).

A incerteza da precisão é dada pelo desvio padrão de medições repetidas obtidas em condição de precisão intermediária, $s_{precisão}$, conforme Equação (14) (Ellison *et al.*, 2000).

$$u_{precisão} = \frac{s_{precisão}}{\sqrt{n}} \quad (14)$$

Sendo n o número de medições repetidas realizadas em condições de precisão intermediária (*i.e.* em dias diferentes). Quando o laboratório reporta a média de n repetições obtidas em dias diferentes, deve considerar que a média de n resultados é \sqrt{n} mais precisa que os resultados individuais. Quando são realizados ensaios únicos, n é igual a 1.

O $s_{precisão}$ pode ser estimado agrupando o desvio padrão de precisão intermediária estimado pela análise de t amostras de acordo com a Equação (15) (Ellison *et al.*, 2000).

$$s_{precisão} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^t (n_i - 1) s_i^2}{\sum_{i=1}^t (n_i - 1)}} \quad (15)$$

Sendo que s_i é o desvio padrão de réplicas obtidas em condições de precisão intermediária, da análise do item i ($i=1$ a t).

A incerteza associada à veracidade reflete o impacto dos efeitos sistemáticos que afetam a medição, que pode ser avaliada pelo desvio entre a média de múltiplos resultados repetidos e o valor verdadeiro do mensurando.

Os efeitos sistemáticos são frequentemente avaliados pelo cálculo da recuperação média do valor de referência de um material de referência como um material de referência certificado (MRC) ou uma amostra fortificada no laboratório. A recuperação média é a razão entre a média estimada e o valor de referência.

A incerteza associada à recuperação observada é estimada considerando três componentes: 1) Incerteza associada à recuperação média do valor de referência; 2) Incerteza associada à influência da matriz e/ou valor da grandeza medida na recuperação; e 3) Incerteza associada a diferenças na recuperação observada no item de referência, usado no estudo da recuperação, ou que ocorre nos itens analisados devido a diferenças na especificação ou outros fenômenos de

natureza química. As componentes 2) e 3) são desprezáveis quando os itens de referência usados para determinar a recuperação média são equivalentes às amostras em termos de matriz, valor da grandeza medida e especificação química. Desta forma, apenas será discutida a avaliação da incerteza associada à determinação da recuperação média.

O valor e a incerteza da recuperação média (veracidade) pode ser calculada de acordo com a Equações (16) e (17) (Ellison *et al.*, 2000), respectivamente.

$$\bar{R} = \frac{\bar{y}}{y_{\text{Ref}}} \quad (16)$$

$$u_{\text{veracidade}} = u(\bar{R}) = \bar{R} \sqrt{\frac{s_y^2}{n\bar{y}^2} + \left(\frac{u(y_{\text{Ref}})}{y_{\text{Ref}}}\right)^2} \quad (17)$$

Sendo que \bar{R} é a recuperação média, \bar{y} a média do valor de grandeza medido experimentalmente, y_{Ref} o valor de referência, $u(\bar{R})$ a incerteza padrão da recuperação média, s_y o desvio padrão da precisão intermediária do valor de grandeza medido, $u(y_{\text{Ref}})$ a incerteza padrão do valor de referência e n o número de ensaios de recuperação.

Com os resultados do valor medido e incerteza da recuperação média, é possível fazer uma avaliação da necessidade de correção ou compensação de desvios sistemáticos relevantes por meio de um teste *t*-Student conforme apresentado na Equação (18) (Ellison *et al.*, 2000).

$$t^{95\%} = \frac{|1-\bar{R}|}{u(\bar{R})} \quad (18)$$

Se o valor de $t^{95\%}$ calculado for maior que $t^{95\%}$ tabelado, deve-se corrigir os valores de grandeza medidos por meio da multiplicação pelo inverso da recuperação média ($1/\bar{R}$).

As fontes de incerteza mantidas constantes na sequência dos ensaios experimentais realizados para estimar a precisão e a veracidade da medição, devem ser estimadas, por meio da estimativa da incerteza padrão u_{outras} , e combinadas com as incertezas padrão das outras componentes. Estas componentes de incerteza podem estar associadas à calibração da balança usada nos ensaios e/ou a pureza da substância de referência quando é usada a mesma substância de referência na validação do procedimento (Ellison *et al.*, 2000).

As componentes de incerteza descritas são combinadas na sua forma relativa como componentes de uma expressão multiplicativa conforme apontado na Equação (19).

$$u'(y) = \sqrt{u'^2_{\text{precisão}} + u'^2_{\text{veracidade}} + u'^2_{\text{outras}}} \quad (19)$$

Sendo que o apóstrofo associado a u (i.e. u') indica valores relativos (i.e. $u'_{\text{precisão}} = u_{\text{precisão}}/y$; em que y é o valor de grandeza medido) e $u'(y)$ é a incerteza padrão relativa do valor da grandeza medida.

O projeto VAM só apresenta algoritmos para a avaliação da incerteza da recuperação quando esta é estimada considerando o mesmo tipo de materiais de referência (e.g. um MRC ou a mesma amostra com o item analisado nativo fortificado com o mesmo valor de grandeza). Recentemente, foi publicada uma extensão dos algoritmos propostos no programa VAM que permite a avaliação da incerteza da recuperação estimada pela análise uma grande diversidade de materiais de referência com itens analisados em diversos testes de aptidão (Cordeiro *et al.*, 2017).

2.4.7.3 Abordagem *top-down intralaboratorial* Nordtest

Outra abordagem para uma avaliação pragmática de incerteza da medição é a proposta no guia Nordtest. O guia Nordtest propõe a contabilização de duas componentes de incerteza: 1) precisão intermediária, dada pelas Equações (14) e (15) (idem programa VAM) e 2) veracidade, dado pela Equação (22) e designada como componente “*bias*”⁵. Este guia assume que todas as outras componentes são desprezáveis, o que pode não ser o caso.

No guia Nordtest a incerteza da veracidade é designada como incerteza do erro sistemático (“*bias*” em inglês). De fato, o guia Nordtest não prevê componentes adicionais às componentes da precisão e do “*bias*” porque os dados experimentais usados para estimar estas componentes devem ser obtidos num período alargado de tempo (tipicamente ao longo de seis meses a um ano), em que diversas soluções padrão são usadas, e outros recursos materiais e operacionais variam.

⁵ Segundo VIM, o “*bias*” é dado pela tendência de medição; erro de justeza, sendo estimativa de um erro sistemático.

A componente de veracidade leva em conta os efeitos sistemáticos que causam desvios na medição a longo prazo (dado em condições de precisão intermediária). Estes efeitos podem ser descritos como a combinação do erro sistemático causado pelo princípio físico-químico do procedimento com o erro sistemático causado pela implementação do procedimento no laboratório. De acordo o guia Nordtest, a incerteza da medição é estimada pela Equação (20) (Nordtest, 2004):

$$u'(y) = \sqrt{u'_{\text{precisão}}^2 + u'_{\text{BIAS}}^2} \quad (20)$$

no qual u'_{BIAS} é a incerteza padrão relativa da veracidade da medição, quando a veracidade é avaliada pela análise repetida do mesmo material de referência (e.g. o mesmo material de referência certificado), a u'_{BIAS} é dada pela combinação de três termos. O primeiro é o desvio padrão relativo do “bias”, s'_{BIAS} , dado pelo desvio padrão relativo da precisão intermediária de n medições repetidas do material de referência (Equações (14) e (15)), em que os desvios padrões são trocados por desvios padrão relativos. O segundo termo é a incerteza padrão relativa do valor de referência do material, $u'(y_{\text{Ref}})$, e o terceiro termo a diferença relativa entre o valor médio estimado e de referência (bias'), conforme apontado na Equação (21) (Nordtest, 2004).

$$\text{bias}' = \frac{\bar{y} - y_{\text{Ref}}}{y_{\text{Ref}}} \quad (21)$$

Com estas três componentes é possível estimar a u'_{BIAS} , dados pela Equação (22) (Nordtest, 2004).

$$u'_{\text{BIAS}} = \sqrt{\frac{s'_{\text{BIAS}}^2}{n} + u'(y_{\text{Ref}})^2 + \text{bias}'^2} \quad (22)$$

E com a incerteza de veracidade, precisão e outras fontes, combina-se estas pela lei da propagação de incertezas, de acordo com a Equação (20).

2.4.8 Comparação de abordagens de avaliação da incerteza

A Tabela 1 apresenta as características das abordagens de avaliação da incerteza da medição que mais importa considerar quando se seleciona a estratégia de avaliação *bottom-up* e *top-down*.

Tabela 1: Diferenças relevantes das abordagens *bottom-up* e *top-down*

	<i>bottom-up</i>	<i>top-down interlab.</i>	<i>top-down intralab.</i>
Capacidade de dissecação da medição	Grande	Nenhuma	Pequena
Complexidade da abordagem	Alta	Muito baixa	Baixa
Necessidade de dados interlaboratoriais	Não	Sim	Não
Dimensão da incerteza	Potencialmente não superestimada	Muito superestimada	Superestimada

As abordagens *top-down* têm como vantagem a simplicidade dos princípios e da aplicação, mesmo quando a medição é complexa. Em contrapartida, as suas principais desvantagens estão no fato de não permitirem estimar a contribuição percentual das diferentes etapas analíticas ou efeito passíveis de otimização, e em alguns casos tende a superestimarem a incerteza quando distancia-se o valor medido do valor de referência. A simplificação da avaliação implica superestimar o impacto de alguns efeitos na qualidade da medição. A abordagem *top-down interlaboratorial* tem a desvantagem adicional de necessitar da disponibilização de informação interlaboratorial.

A abordagem *bottom-up* tem como vantagem poder estimar a contribuição percentual das componentes de incerteza que podem ser intervencionados de forma a reduzir a incerteza ou os custos da análise. A desvantagem da abordagem é a maior complexidade dos algoritmos usados por comparação com os cálculos envolvidos nas abordagens *top-down*. As abordagens *top-down* produzem estimativas “grosseiras” da incerteza que muitas vezes são mais elevadas que a incerteza-alvo, tornando a medição inadequada para o uso.

Se o laboratório tem competência e tempo para avaliar o processo de medição de forma detalhada, a abordagem *bottom-up* é geralmente adequada. Por outro lado, caso o laboratório tenha tempo limitado, mas tenha disponíveis

dados da validação do procedimento e do controle da qualidade do ensaio, poderá considerar uma avaliação *top-down* mais adequada.

A grande generalidade dos laboratórios usa a abordagem mais simples disponível que lhe permita reportar uma incerteza de medição menor que a incerteza-alvo. Em alguns casos, esse objetivo só é conseguido pela abordagem *bottom-up*. O objetivo do laboratório é ter adequação ao uso, utilizando a abordagem mais simples desde que esteja abaixo dos valores máximos admissíveis de incerteza.

2.5 DESENVOLVIMENTO METROLÓGICO: MÉTODO DE ADIÇÃO CUMULATIVO DE PADRÃO (MAP-C)

Em muitas aplicações de procedimentos instrumentais de análise, a resposta do instrumento de medição está em função da matriz do item analisado. O item analisado pode ser uma amostra em grande quantidade ou uma pequena porção sujeita a quantificação direta. A matriz são todos os componentes do item analisado, com exceção do objeto de análise (tipicamente, a espécie química analisada). Se a matriz pode ser reproduzida, a calibração do instrumento pode ser baseada em calibradores⁶ preparados com matriz ajustada, ou seja, com itens com valores da grandeza estudada conhecidos e uma matriz equivalente aos itens analisados.

No entanto, em alguns casos, não é possível ou viável do ponto de vista econômico, preparar calibradores com matriz ajustada devido à falta de conhecimento a respeito da composição da matriz e à diversidade de magnitude dos efeitos da matriz nos vários itens analisados (Viana *et al.*, 2011).

Nestes casos, as calibrações podem ser realizadas pelo método de adição de padrão, no qual níveis crescentes e conhecidos da grandeza estudada são adicionados ao item analisado. Tal procedimento é aplicado de modo a se estimar a sensibilidade da resposta do instrumento de medição, isto é, a variação do sinal com a adição de valor de grandeza, e subsequentemente determinar o valor da grandeza medida presente no item analisado.

⁶ Calibrador é o termo referente a todo o processo de preparo das soluções padrões de ácido úrico, desde a preparação da solução estoque até as adições com a micropipeta sobre a amostra analisada.

O valor da grandeza medida no item estudado é estimado pela extrapolação da curva de calibração para uma resposta do instrumento igual a zero; ou seja, considerando o simétrico da abscissa, x , quando a ordenada, y , é igual a zero. O simétrico do nível do item analisado adicionado correspondente à interseção da curva de calibração com o eixo do valor adicionado, eixo x , (a abscissa na origem da curva) no qual permite estimar o valor da grandeza estudada no item analisado (Rodrigues *et al.*, 2015). Nesta descrição mais genérica sobre calibrações analíticas, o termo genérico grandeza (JCGM, 2012) é usado, em vez de exemplos específicos de grandezas tais como concentração molar ou concentração mássica, de modo que a teoria seja aplicável a vários casos.

Uma das desvantagens mais relevantes do método convencional de adição de padrão é a necessidade de uma grande quantidade de item analisado para preparar os calibradores, o tempo demandado, e os produtos químicos necessários para preparar a curva de calibração específica para cada item analisado. Na análise de uma solução é necessário ter um volume suficientemente grande de amostra para preparar várias porções diluídas com incrementos crescentes do valor de grandeza estudado. No entanto, em algumas aplicações, não se dispõem de volumes suficientes de solução para preparar os calibradores como no caso de amostras clínicas com fluídos biológicos (Dadamos *et al.*, 2017).

Se o procedimento instrumental de análise não consumir o volume do item analisado no processo de coleta de sinal, como por exemplo, na espectroscopia molecular, potenciometria e voltametria, a necessidade de um grande volume do item analisado pode ser superada. Tal superação se dá a partir de adições consecutivas de valores da grandeza estudada para a mesma porção analítica de amostra, sendo o sinal instrumental recolhido antes e depois das adições. Tipicamente, o valor da grandeza é adicionado a partir de uma solução estoque de referência (Dadamos *et al.*, 2017).

Numa calibração por adição cumulativa de padrão recorrendo a um procedimento instrumental de análise cujo sinal varia proporcionalmente com a concentração do item analisado, visto que o volume total do sistema aumenta ao longo das adições, considera-se a multiplicação do sinal pelo volume total da solução ($I * v_{ta}$) em função da massa do item analisado adicionada (m_a)

(i.e. $I * v_{ta}$ vs. m_a). Tendo em conta que o sinal, I , é proporcional à concentração de do item analisado, γ , ($I \propto \gamma$) a multiplicação do sinal pelo o volume total ($I * v_{ta}$) será proporcional à multiplicação da concentração adicionada pelo volume total que corresponde à massa do item analisado adicionada, m_a ; ou seja, $I * v_{ta} \propto m_a$. Se o aumento do volume do sistema e, em particular, a diluição do item analisado na porção de amostra não for considerado, o teor do item analisado na amostra pode ser quantificado com um erro considerável.

No entanto, uma vez que a grandeza nativa presente na porção analítica de análise original é diluída à medida que se adiciona um novo volume da solução de referência, a construção da curva de calibração deve tomar a massa da espécie química adicionada, m_a , que representará a variável independente; isto é, o valor da solução de referência adicionada, que é tipicamente uma concentração do mensurando que deve ser multiplicado pelo volume acumulado adicionado (Dadamos *et al.*, 2017).

O volume total da solução cujo sinal é recolhido, v_{ta} , ou seja, o volume da solução analisado somado ao volume acumulado de solução de referência, deve ser multiplicado pelo sinal observado, I_t , ($I_t * v_{ta}$) e este produto considerado como a variável dependente da calibração. A razão entre o simétrico da ordenada na origem, b (coeficiente linear) e o coeficiente angular da curva de calibração ($I_t * v_{ta}$ vs. m_a) representa a massa da espécie química estimada no item analisado, m . Dividindo m pelo volume da solução analisada, v , encontra-se a concentração mássica da espécie γ_s na solução (Equação (23)).

$$\gamma_s = m/v \quad (23)$$

O método de adição cumulativa de padrão também permite estimar concentrações molares se m e m_a forem substituídos por números de mols da espécie química estudada.

Se a diluição do composto de análise nativo com o volume de solução de referência não for considerada, as medições podem ser afetadas por erros significativos. Este erro é maior se o valor da solução utilizada em adições de padrão for semelhante ao valor nativo (Dadamos *et al.*, 2017).

3 OBJETIVO

O principal objetivo do presente trabalho é o desenvolvimento de metodologias de implementação, otimização e validação da medição voltamétrica de parâmetros bioquímicos em pequenos volumes de fluidos biológicos. As medições voltamétricas são das soluções analíticas mais flexíveis e de menor custo sendo, no entanto, suscetíveis a efeitos de matriz. As metodologias desenvolvidas foram aplicadas à análise de ácido úrico em soro humano. A investigação realizada deve ser aplicável ao desenvolvimento de outros sensores eletroquímicos, à caracterização de outras matrizes e ao desenvolvimento de procedimentos de medição baseados em outros métodos instrumentais de análise.

Ademais do objetivo geral, destaca-se os objetivos específicos:

- Construir um eletrodo que obtenha respostas seletivas e sensíveis para a determinação de ácido úrico em soro humano. Esta investigação deve envolver a otimização e o estudo do comportamento eletroquímico do eletrodo;
- Desenvolver uma nova abordagem de calibração de procedimentos instrumentais de análise, suscetíveis a efeitos de matriz, aplicável quando está disponível um pequeno volume de solução a analisar;
- Validar um procedimento de medição eletroquímica de ácido úrico em soro humano que culmine na avaliação da incerteza da medição. A validação deve incluir a avaliação da compatibilidade metrológica de medições eletroquímicas com medições usadas no procedimento espectrofotométrico de referência;
- Desenvolver e aplicar abordagens *bottom-up* de avaliação da incerteza das medições realizadas. As abordagens a desenvolver devem basear-se no modelo de regressão usado ou ser aplicáveis quando os pressupostos do modelo de regressão não são válidos;
- Aplicar abordagens *top-down* de avaliação da incerteza da determinação de ácido úrico em soro humano e comparar as avaliações *top-down* com avaliações *bottom-up*;

- Fazer avaliações bayesianas da incerteza da medição por meio da atualização da prevalência de ácido úrico no soro da população brasileira com resultados de medições eletroquímicas;
- Desenvolver planilhas eletrônicas “amigo-do-utilizador” para a validação e avaliação da incerteza das medições.

4. EXPERIMENTAL

4.1 EQUIPAMENTOS

As medições eletroquímicas de voltametria cíclica foram realizadas utilizando uma cela eletroquímica de 10 mL, contendo três eletrodos, sendo um eletrodo de prata como pseudo-referência e dois eletrodos de nanografite (NG), sendo um como contra eletrodo (0,78 cm²) e outro como eletrodo de trabalho (0,50 cm²), conectado a um potenciostato/galvanostato MPQG-01 (Microchimica) controlado por um microcomputador. Os resultados obtidos foram tratados utilizando o programa Origin da Microcal Inc. 7.0[®].

Para a realização dos experimentos de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), utilizou-se os mesmos materiais das medidas voltamétricas. Os experimentos foram realizados em um potenciostato PGSTAT30/Autolab[®] acoplado a um microcomputador e controlado pelo software FRA. Os espectros de plano complexo foram analisados com o software Electrochemistry-ZView2.

As medições de microscopia eletroquímica de transmissão (TEM) foram realizadas em um microscópio de transmissão de elétrons FEI TECNAI G- F20 operando a 200 kV para verificar a morfologia do material formado.

As medições de espectroscopia no infravermelho (IR) foram realizadas em um espectrofotômetro FTIR-ATR (Perkin-Elmer). O equipamento está disponível no Laboratório de Sucroquímica e Química Analítica (LSQA) do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, (IBILCE/UNESP) campus São José do Rio Preto.

As medições de Difractometria de Raios X (XRD) foram realizadas em um difratômetro de Raios X Mini Flex II X-Ray Diffractometer- Rigaku[®], sob radiação Cu K α = 1,54184 Å, e ângulo incidência com a superfície (θ) de 5 a 40°, 30 kV e 15 mA com velocidade de varredura de 1° min⁻¹ e 0,02° de stepsize, no *Laboratory of Energy Clean Technology- LACETE*, Departamento de Física, IBILCE-UNESP.

As imagens da superfície do eletrodo foram realizadas com um microscópio digital Dino Lite Plus AM-313 com Aumento de 200 X, disponível no Laboratório de Fotoquímica, Departamento de Química e Ciências Ambientais, IBILCE – UNESP.

As folhas de cálculo para validação do procedimento proposto foram realizadas utilizando o programa MS-Excel[®]. As moléculas foram construídas utilizando o software ChemSketch da ACD/Labs[®].

4.2 OBTENÇÃO DA LIGNINA

Foram utilizadas ao longo do presente trabalho a lignina KRAFT (LGK), a lignina KRAFT purificada (LGKP) e a lignina de bagaço de cana (LGB). A lignina KRAFT é um subproduto da indústria de papel celulose, a qual não passou por nenhum tratamento prévio. Para a purificação da lignina KRAFT lavou-se com ácido clorídrico diluído mantendo pH 2,0 para efetuar a troca com os íons de sódio. Após esta etapa, centrifugou-se e deixou-se secando na estufa (Kubo *et al.*, 2005). A lignina de bagaço de cana foi extraída segundo procedimento relatado por Fukushima *et al.* (2001).

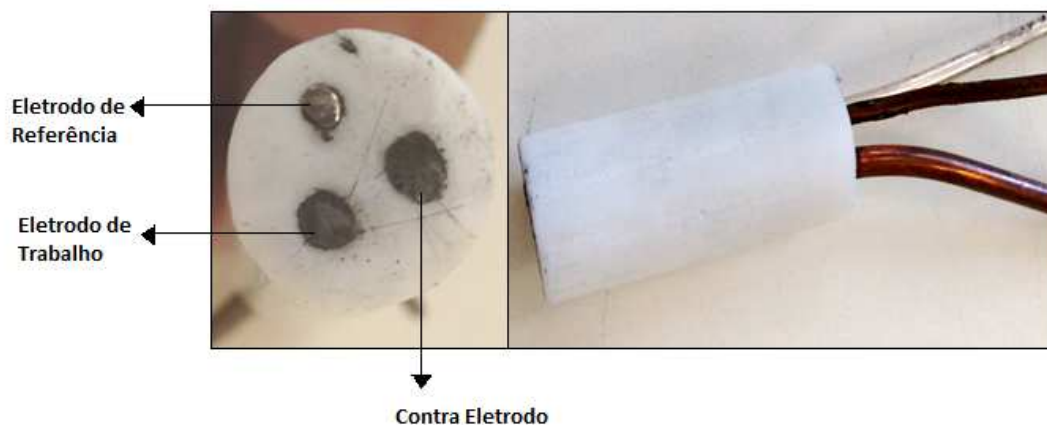
4.3 PREPARAÇÃO E MODIFICAÇÃO DOS ELETRODOS

Para a determinação de ácido úrico em amostras de soro fisiológico (SF) e soro humano (SH) foi desenvolvido um eletrodo de carbono em matriz de teflon. Foi construído o eletrodo conjugado, utilizando-se um tubo de teflon, de diâmetro de 3,5 cm, no qual foram feitos três furos, sendo que dois furos, com maior diâmetro foram utilizados para suportar o eletrodo modificado com Cu-nanografite-lignina (eletrodo de trabalho) e o outro apenas para o eletrodo de nanografite (contra eletrodo). Um destes eletrodos foi utilizado como eletrodo de trabalho, área geométrica, $A_g \approx 0,5 \text{ cm}^2$, e o segundo preparado apenas com nanografite utilizado como contra eletrodo, de $A_g \approx 0,78 \text{ cm}^2$. O terceiro furo recebeu a quente e sob pressão o fio de prata pura, $A_g \approx 0,20 \text{ cm}^2$, sendo este empregado como eletrodo de pseudo-referência. Os contatos elétricos externos foram feitos com fios de cobre conforme apresentado na Figura 7.

Construído o eletrodo conjugado, esse passou por um pré-tratamento da superfície realizado em três etapas. A primeira foi um procedimento químico, seguido pelo polimento mecânico e por último uma etapa eletroquímica. O procedimento químico consistiu na imersão dos eletrodos por um período de 10 minutos em uma solução de 1:3 ($\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{SO}_4$), v/v , concentrados. Posteriormente os eletrodos foram enxaguados com água. O polimento

mecânico foi realizado por meio de polimento em uma folha de papel sulfite branco, virgem, a fim de deixar a superfície lisa e homogênea como evidenciado a partir da Figura 8. A terceira etapa referiu-se ao polimento eletroquímico, realizado por voltametria cíclica em solução de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ até a obtenção de um perfil voltamétrico estável.

Figura 7: Eletrodo conjugado em matriz de teflon



Fonte: Elaborado pelo Autor

Figura 8: Imagem da superfície do eletrodo de nanografite-lignina (Microscópio Digital - Dino Lite Plus AM-313); Ampliação: 200 X



Fonte: Elaborado pelo Autor

Para a preparação do eletrodo de nanografite foi utilizado nanografite de 300 nm. A lignina empregada tem três origens: 1) lignina KRAFT provinda de usina de papel celulose, sem purificação; 2) lignina KRAFT purificada; e 3) lignina de bagaço de cana-de-açúcar extraída e purificada no laboratório.

O eletrodo formado por nanografite-lignina foi preparado em diferentes proporções para a realização da busca da melhor relação entre as diferentes ligninas e o nanografite. Para a preparação do eletrodo com as diferentes ligninas foram misturadas com nanografite, óleo mineral e hexano para a obtenção de uma mistura homogênea. O material permaneceu sob agitação mecânica por 24 horas a temperatura ambiente para evaporação do solvente para garantir a homogeneidade. Após o estudo quimiométrico de otimização da proporção, foi escolhida a mistura composta por 25 % de lignina, 60 % de nanografite e 15 % de óleo mineral, pois apresentaram os melhores sinais de corrente elétrica.

Posteriormente, sobre o eletrodo de trabalho foi eletrodepositado cobre metálico. Para tal, foram realizados 4 ciclos, empregando-se a técnica de voltametria cíclica, no intervalo de potenciais de -1,0 a 1,2 V vs. Ag, e velocidade de varredura, $v_e = 300 \text{ mV s}^{-1}$ em $\text{CuSO}_4 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Em seguida, o eletrodo de trabalho foi caracterizado empregando-se as técnicas eletroquímicas de impedância eletroquímica e voltametria cíclica (utilizou-se diferentes faixas de potencial em função de cada caracterização); e técnicas de análise de superfície como infravermelho; Difratometria de Raios-X; e microscopia eletrônica de transmissão.

A área eletroativa do eletrodo foi calculada a partir do estudo cinético de variação de velocidade de varredura de potenciais, sendo calculada a concentração eletroativa ($\Gamma/\text{mol cm}^{-2}$) nos processos anódicos. As caracterizações do eletrodo por voltametria cíclica também foram realizadas na presença de ácido úrico, estudando seu mecanismo de oxidação e interferentes.

4.4 PLANEJAMENTO FATORIAL

O planejamento fatorial foi elaborado para verificação do comportamento eletroquímico dos íons cobre eletrodepositados sobre a superfície do eletrodo.

A Equação (24) apresenta a matriz utilizada para o planejamento (Pereira Filho, 2015).

$$b_y = (X^T X)^{-1} X^T I_t \quad (24)$$

Para a qual, b_y representa a matriz estudada; X são os níveis -1 e +1 para o planejamento 2^4 e os níveis -1, 0 e +1 para o planejamento 3^3 ; X^T é a matriz transposta dos níveis -1, 0 e +1 e I_t são os sinais elétricos de corrente.

Inicialmente foi realizado um planejamento fatorial completo para avaliar quatro variáveis do comportamento eletroquímico do eletrodo construído, sendo eles: 1) porcentagem de lignina no eletrodo; 2) velocidade de varredura de potenciais empregada para a eletrodeposição de cobre metálico; 3) número de ciclos voltamétricos para a eletrodeposição de cobre metálico; e 4) velocidade de varredura a ser aplicada em solução de cloreto de potássio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ após a eletrodeposição de cobre. Estas variáveis foram estudadas em dois níveis, sendo realizado um planejamento 2^4 em um total de 16 experimentos com uma repetição (Vicentini *et al.*, 2011) como apresentado na Tabela 2.

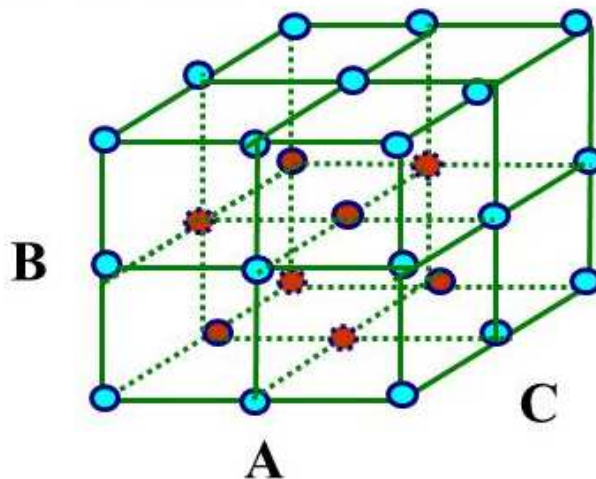
Tabela 2: Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no planejamento 2^4

Variáveis	Nível (-1)	Nível (+1)
% lignina no eletrodo	20 %	25 %
Velocidade de varredura de eletrodeposição de Cu metálico	100 mV s^{-1}	300 mV s^{-1}
Número de ciclos para a eletrodeposição de cobre metálico	3	4
Velocidade de varredura em meio de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$	100 mV s^{-1}	300 mV s^{-1}

Os sinais eletroquímicos são referentes às correntes de pico anódicas obtidas a partir do eletrodo de trabalho. Os experimentos foram efetuados de forma aleatória para evitar erros sistemáticos e a resposta monitorada foi à intensidade de corrente elétrica, obtida a partir dos picos de oxidação dos voltamogramas cíclicos.

Após este estudo preliminar, fixou-se a velocidade de varredura em 300 mV s^{-1} , em meio de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Desta forma passou-se a utilizar um novo planejamento fatorial, mais completo, 3^3 , com três níveis e três variáveis com ponto central (Oliveira, 2017), conforme apresentado na Figura 9.

Figura 9: Planejamento fatorial 3^3 utilizando todas as combinações e todos os níveis. (A) porcentagem de lignina no eletrodo; (B) velocidade de varredura de eletrodeposição de cobre metálico; (C) ciclos voltamétricos para a eletrodeposição de cobre metálico



Fonte: Oliveira (2017)

Os níveis foram: nível inferior (-1), nível superior (+1) e ponto central (0). As variáveis estudadas foram: 1) porcentagem de lignina no eletrodo; 2) velocidade de eletrodeposição de cobre; e 3) ciclos voltamétricos de eletrodeposição de cobre. Os sinais são referentes às correntes de pico anódicas dos eletrodos construídos. Os experimentos foram efetuados de forma aleatória para evitar erros sistemáticos e a resposta monitorada foi à intensidade de corrente com uma repetição. A Tabela 3 apresenta os fatores estudados e seus respectivos níveis.

Tabela 3: Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no planejamento 3^3

Variáveis	Nível (-1)	Ponto Central (0)	Nível (+1)
% lignina no eletrodo	20 %	25 %	30 %
Velocidade de varredura de eletrodeposição de cobre metálico	100 mV s ⁻¹	300 mV s ⁻¹	500 mV s ⁻¹
Número de ciclos de eletrodeposição de Cu metálico	2	3	4

A partir da realização dos experimentos foram construídos os gráficos de probabilidade e os diagramas de superfície de resposta, conforme descrito na seção 5.2.

4.5 VALIDAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

4.5.1 Homocedasticidade da resposta instrumental

Para avaliação da homocedasticidade foi utilizado o teste de Fisher que compara as variâncias dos sinais observados aos níveis de concentração mais baixo e mais alto, sendo mais utilizada para uma avaliação preliminar do desempenho da instrumentação. Também foi utilizado o teste de Levene que avalia a homogeneidade de variâncias considerando a precisão da resposta instrumental ao longo de toda a faixa de calibração informando de forma mais fundamentada sobre o desempenho instrumental. O teste de Levene tem a vantagem adicional de ser mais robusto do que o teste de Fisher a desvios à normalidade dos sinais instrumentais. A Equação (25) apresenta a condição testada no teste de Fisher.

$$\frac{s_{Ip}^2}{s_{I1}^2} \leq F_{vp;v1}^{99\%} \quad (25)$$

No qual s_{Ip} é o desvio padrão da repetibilidade do sinal ao nível mais alto da faixa de calibração, s_{I1} o desvio padrão da repetibilidade do sinal ao nível mais baixo da faixa de calibração e $F_{vp;v1}^{99\%}$ é o valor crítico de um teste de Fisher bicaudal para o nível de confiança de 99 %, e vp e $v1$ graus de liberdade associados a s_{Ip} e s_{I1} , respectivamente. Quando a condição da Equação (25) é válida (*i.e.* s_{Ip}^2/s_{I1}^2 é menor ou igual a $F_{vp;v1}^{99\%}$) conclui-se que os sinais são homocedásticos.

A Equação (26) apresenta a condição avaliada no teste de Levene.

$$W = \frac{[(\sum_{e=1}^p o_e) - p] \left\{ \sum_{e=1}^p o_e \left[\left(\frac{\sum_{f=1}^{o_e} |I_{ef} - \bar{I}_e|}{o_e} \right) - \left(\frac{\sum_{e=1}^p \sum_{f=1}^{o_e} |I_{ef} - \bar{I}_e|}{\sum_{e=1}^p o_e} \right) \right]^2 \right\}}{(p-1) \sum_{e=1}^p \sum_{f=1}^{o_e} \left(|I_{ef} - \bar{I}_e| - \frac{\sum_{f=1}^{o_e} |I_{ef} - \bar{I}_e|}{o_e} \right)^2} \leq F_{p-1; \sum o-p}^{99\%; uni} \quad (26)$$

Em que e é o nível de calibração ($e=1$ a p ; em que p corresponde ao número total de calibradores), o_e o número de sinais repetidos ao nível e , I_{ef} a réplica f ($f=1$ a o_e) do sinal observado ao nível e , \bar{I}_e a média dos sinais obtidos ao nível e ($\bar{I}_e = \sum I_{ef}/o_e$) e $F_{p-1; \sum o-p}^{99\%; uni}$ o valor crítico de um teste de Fisher unicaudal para o nível de confiança de 99 %, e $p-1$ e $\sum o-p$ graus de liberdade para as variâncias do numerador e denominador. Quando a condição da Equação (26) é válida, considera-se que os sinais são homocedásticos.

Caso se conclua que os sinais instrumentais não são homocedásticos, deve-se avaliar os sinais em outra faixa de calibração ou utilizar modelos de avaliação da linearidade da resposta instrumental e de regressão dos sinais dos calibradores aplicáveis a dados heterocedásticos, como modelos ponderados de calibração. A avaliação da homocedasticidade foi realizada depois de eliminar os valores aberrantes dos dados por meio de testes de valores aberrantes únicos e emparelhados de Grubbs (Miller *et al.*, 2005).

4.5.2 Linearidade da resposta instrumental

Caso se comprove a homocedasticidade da resposta instrumental, a avaliação da adequação do modelo de regressão dos mínimos quadrados para descrever a variação do sinal em função do valor de grandeza estudada (tipicamente a concentração do item analisado) é realizada coletando-se sinais repetidos dos calibradores e realizando-se o teste de falta de ajuste ANOVA (ANOVA-LOF). Este teste envolve a avaliação da condição apresentada como Equação (27) (Bettencourt da Silva, 2016).

$$F_{LOF/PE} = \frac{MS_{LOF}}{MS_{PE}} = \frac{\sum_{e=1}^p O_e (\bar{I}_e - \hat{I}_e)^2 / p - 2}{\sum_{e=1}^p \sum_{f=1}^{O_e} (I_{ef} - \bar{I}_e)^2 / \sum_{e=1}^p (O_e - 1)} \leq F_{vLOF; vPE}^{99\%; uni} \quad (27)$$

No qual \hat{I}_e representa o sinal estimado para o nível de calibrador e a partir da regressão linear ($\hat{I}_e = a + bq_a$; no qual a e b são os coeficientes linear e angular da reta de calibração, respectivamente, obtida a partir da regressão dos mínimos quadrados, e q_a é o valor de grandeza estudada); MS_{LOF} é a variância associada à falta de ajuste dos sinais à reta de regressão; MS_{PE} é a variância da repetibilidade do sinal instrumental designada como "erro puro"; e $F_{vLOF; vPE}^{99\%; uni}$ o valor crítico de um teste de Fisher unicaudal para o nível de confiança de 99 %, e os graus de liberdade associados a MS_{LOF} ($vLOF = p - 2$) e MS_{PE} ($vPE = \sum_{e=1}^p (O_e - 1)$), respectivamente. O teste ANOVA-LOF foi aplicado a curvas de calibração construídas com 4 a 5 calibradores para os quais foram coletados 20 sinais repetidos por calibrador. Se a condição da Equação (27) for válida, o método dos mínimos quadrados descreve adequadamente a curva de calibração (Bettencourt da Silva, 2016).

Na determinação de ácido úrico em amostras de soro fisiológico e soro humano utilizando voltametria cíclica, a homocedasticidade e linearidade

da resposta instrumental não é significativamente afetada pelos efeitos da matriz. Portanto, as avaliações realizadas com calibradores de ácido úrico preparados em água ultrapura foram usados para guiar as calibrações de adição padrão realizadas na matriz soro. O método de adição padrão é posteriormente usado na análise dos soros para proceder à compensação dos efeitos de matriz que afetam a análise específica realizada.

A homocedasticidade e linearidade da resposta instrumental foi avaliada em cada calibração por adição cumulativa de padrão realizadas para análise de soros para confirmar o pressuposto definido sobre o impacto da matriz nestes dois parâmetros de desempenho da instrumentação, e será apresentado os resultados com as amostras de soros fortificados e humanos na próxima seção.

4.5.3 Limites de detecção e quantificação

Allegrini *et al.* (2014) desenvolveram um algoritmo que permite estimar o limite de detecção (*LOD*) usando a calibração multi-ponto do procedimento instrumental de análise estudado. Este mesmo algoritmo pode ser usado para estimar o *LOD*, *LOD_{y/x}*, por meio do tratamento de dados de uma calibração pelo método de adição cumulativa de padrão (Equação (28)).

$$LOD_{y/x} = 3,3 \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{1 + \frac{\bar{m}_a^2}{\sum_{e=1}^p \sum_{f=1}^{O_e} (m_{ai} - \bar{m}_a)^2} + \frac{1}{\sum_{e=1}^p O_e}} \quad (28)$$

Em esta equação usa símbolos previamente apresentados. O *LOD_{y/x}* estimado pela Equação (28) tem de ser dividido pelo volume da amostra para se estimar o *LOD* em concentração de ácido úrico no soro. O *LOD* estimado por esta equação coincide com a definição da IUPAC para o menor valor de grandeza que se distingue da ausência dessa grandeza. De acordo com a última edição do Vocabulário Internacional de Metrologia (INMETRO & IPQ, 2012) essa definição é: “valor medido, obtido por um dado procedimento de medição, para o qual a probabilidade de declarar falsamente a ausência dum constituinte num material é β , sendo α a probabilidade de declarar falsamente a sua presença” (α e β = 5 % para um nível de confiança de 95 %). Frequentemente, é utilizada a definição antiga de *LOD* da IUPAC que envolve multiplicar por 3,3 a razão do desvio padrão residual pelo coeficiente angular da curva de calibração

$(3,3 s_{Reg}/b)$. A definição antiga está mais disseminada mas envolve uma descrição estatística diferente da proposta mais recente da IUPAC.

De acordo com Allegrini *et al.* (2014), substituindo o termo 3,3 da Equação (28) por 10, estima-se limite de quantificação LOQ , $LOQ_{y/x}$, (Equação (29)) que corresponde ao menor valor de grandeza medida que se pode estimar com uma precisão considerada aceitável.

$$LOQ_{y/x} = 10 \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{1 + \frac{\bar{m}_a^2}{\sum_{e=1}^p \sum_{f=1}^{O_e} (m_{ai} - \bar{m}_a)^2} + \frac{1}{\sum_{e=1}^p O_e}} \quad (29)$$

Como para a Equação (28), a Equação (29) estima o valor de grandeza em massa do item analisado na porção de amostra. As Equações (28) e (29) só são válidas se a dispersão do sinal for pequena, dada a faixa de sinais do intervalo de calibração. Esta condição deve ser testada pela Equação (30) (Miller *et al.*, 2005).

$$g = \frac{t_{\nu^{LSR}}^{95\%}}{\left(b / \left(\frac{s_{y/x}^2}{\sum_{e=1}^p (m_{ae} - \bar{m}_a)^2} \right)^{1/2} \right)^2} \leq 0,05 \quad (30)$$

Sendo que g a função cujo valor deverá ser menor que 5 %, $t_{\nu^{LSR}}^{95\%}$ o t de student para nível de confiança de 95 % e os graus de liberdade dos parâmetros de regressão, ν^{LSR} ($\nu^{LSR} = N - 2$) e m_{ae} a massa do item analisado adicionada ao nível de calibração e .

4.5.4 Modelo metrológico

A validação do procedimento de medição está em função do modelo metrológico desenvolvido para estimar a incerteza da medição. Neste trabalho, foram definidos quatro tipos de modelos: 1) Modelo de medição baseado na incerteza de extrapolação, da curva de calibração, estimada pelo métodos dos mínimos quadrados (MMQ); 2) Modelo de medição implementado por simulações de Monte Carlo (MCM); 3) Avaliação *top-down interlaboratorial* da incerteza de medição; e 4) Avaliação bayesiana com base no modelo 1). Quando a incerteza é avaliada pelo método MCM, a incerteza de extrapolação é estimada por modelação e não recorrendo a algoritmos do MMQ (Miller *et al.*, 2005). Os modelos 1) e 2) representam duas formas de avaliação *bottom-up* da incerteza da medição.

No caso da utilização de modelos de medição baseados na incerteza de extrapolação estimada pelo MMQ, a validação do procedimento envolveu as seguintes etapas: 1) Avaliação dos pressupostos do MMQ; 2) Definição de um modelo da incerteza da medição; 3) Avaliação do modelo de medição a partir da análise de soros fisiológicos fortificados e de soros humanos caracterizados pelo procedimento de referência.

Quando a incerteza é estimada pelo método MCM ou por uma abordagem *top-down* é necessário cumprir as etapas de validação enunciadas anteriormente apenas em relação à avaliação do pressuposto de linearidade da resposta instrumental do MMQ.

Quando o modelo de medição se baseia na incerteza de extrapolação estimada pelo MMQ, as componentes de incerteza foram combinadas pela lei de propagação de incertezas ou pelo método numérico de Kragten (Kragten, 1994). As avaliações *bottom-up* da incerteza foram implementadas numa folha de cálculo de MS-Excel devido à grande disseminação deste software. Foram realizadas avaliações *top-down intralaboratorial* de acordo com o proposto pelo programa VAM ou guia Nordtest (Nordtest, 1994). Por último, foram realizadas avaliações bayesianas das incertezas estimadas pelas abordagens *bottom-up*.

O método de Kragten foi utilizado para verificar os pressupostos da LPI no que respeita à linearidade da variação do valor da grandeza medida quando as variáveis de entrada variam considerando a respectiva incerteza padrão (Kragten, 1994). O método numérico de Kragten foi particularmente útil para avaliação do pressuposto do MMQ relativo à qualidade dos calibradores. As simulações de Monte Carlo são especialmente úteis quando não é possível respeitar esse pressuposto do MMQ.

As curvas de calibração foram construídas registrando a variação do “*signal eléctrico*volume total*” vs. “*massa do item analisado adicionado*”, $I_t * v_{ta}$ vs. m_a , conforme descrito na seção 2.5.

4.6 PREPARO DOS CALIBRADORES

Foram analisadas sete amostras, sendo cinco amostras de soro fisiológico fortificadas com concentrações conhecidas de ácido úrico e duas outras amostras de soro humano. As amostras de soro humano foram analisadas

usando o procedimento espectrofotométrico de referência (“kit” para determinação de AU da empresa Analisa®).

As amostras de soro fisiológico foram preparadas por diluição a partir de uma solução padrão estoque de $1,68 \text{ g L}^{-1}$ de ácido úrico, diluída uma vez para um volume final de 10 mL de soro fisiológico nas concentrações de 1,0, 3,0, 5,0, 7,0 e $9,0 \text{ mg dL}^{-1}$.

As quantificações foram realizadas em alíquotas de amostras de soro fisiológico e humano de 5 mL e sujeitas a adições cumulativas de $250 \text{ }\mu\text{L}$ da solução padrão estoque de $1,68 \text{ g L}^{-1}$ de AU para preparar as curvas de calibração. As soluções foram homogeneizadas com um agitador magnético após cada uma das adições de padrão.

Os voltamogramas cíclicos para análise de AU foram obtidos utilizando um intervalo de potencial de $-0,6$ a $0,6 \text{ V vs. Ag}$ empregando-se velocidade de varredura, $v_e = 300 \text{ mV s}^{-1}$.

4.7 PREPARO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

As amostras de soro foram obtidas como definido para o procedimento de referência espectrofotométrico utilizado nos laboratórios de análise clínica do país (ANVISA, 2010). Primeiramente foi coletado uma amostra de sangue, retirando-se em torno de 10 mL de sangue do indivíduo. Em seguida, realizou-se a centrifugação do material biológico durante 25 min a 3000 rpm e $25 \text{ }^\circ\text{C}$, e foram recolhidos os 2/3 superiores do sobrenadante. Os soros obtidos foram analisados usando o procedimento espectrofotométrico de referência (Lu *et al.*, 2017) e o procedimento eletroquímico desenvolvido.

A retirada do sangue, separação do plasma e soro, além da quantificação por espectrofotometria no UV/Vis foram realizados nas Clínicas Integradas da Fundação Educacional de Fernandópolis - FEF. O teor de ácido úrico nos soros humanos determinados pelo procedimento de referência foi comparado com o teor estimado pelo procedimento eletroquímico desenvolvido e baseado em adições cumulativas de padrão.

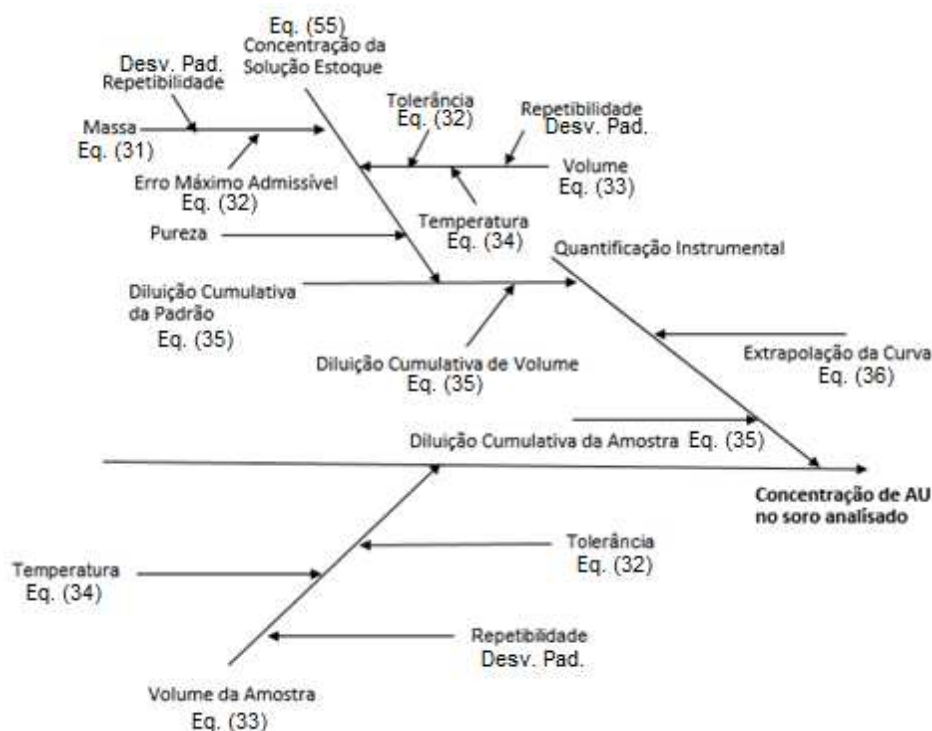
4.8 ESTIMATIVA DA INCERTEZA DA MEDIÇÃO

4.8.1 Abordagem *bottom-up* baseada no método dos mínimos quadrados

Para a estimativa da incerteza da medição, primeiramente foi definido o mensurando, como sendo: “*concentração mássica de ácido úrico no soro do paciente X*”.

Após a definição do mensurando, levantaram-se todas as possíveis fontes de incerteza, utilizando-se para tal o diagrama de Ishikawa (Salvador *et al.*, 2004), conforme apresentado na Figura 10. O diagrama apresentado tem um detalhe adequado a avaliações *bottom-up* mas também é útil para avaliações mais pragmáticas. Uma vez identificadas as fontes de incerteza mais relevantes, utilizou-se um conjunto de equações para quantificar cada componente.

Figura 10: Diagrama de Ishikawa para as fontes de incerteza da determinação eletroquímica de ácido úrico em amostras de soro em condições de repetibilidade



Fonte: Elaborado pelo Autor

A incerteza padrão associada à medição de massa convencional de ácido úrico, u_m (OIML R33, 1979), por pesagem por diferença, da componente relativa

à adição cumulativa de ácido úrico à porção analítica de análise, $u(a)$, foi estimada utilizando a Equação (31):

$$u_m = \sqrt{2(u_m^{cal})^2 + 2(u_m^{rep})^2} \quad (31)$$

em que u_m^{cal} é a incerteza padrão associada ao erro máximo admissível, EMA , usado na aceitação do certificado de calibração da balança que é dada pela Equação (32) assumindo que o EMA está associado a uma distribuição retangular, e u_m^{rep} é a incerteza padrão da repetibilidade da balança estimada pelo desvio padrão de medições repetidas de massa.

$$u_m^{cal} = \frac{EMA}{\sqrt{3}} \quad (32)$$

A incerteza padrão da porção de volume da amostra de soro, u_{v_s} , foi estimada utilizando a Equação (33).

$$u_{v_s} = \sqrt{(u_v^{cal})^2 + (u_v^{rep})^2 + (u_v^{temp})^2} \quad (33)$$

Para a qual, u_v^{cal} é a incerteza padrão associada ao volume nominal da pipeta de vidro estimada usando uma equação equivalente à Equação (32) em que o EMA é substituído pela tolerância do volume nominal fornecida pelo fabricante; u_v^{rep} é a incerteza padrão da repetibilidade da manipulação da pipeta, dada pelo desvio padrão da massa de água despendida pela pipeta, visto que a densidade da água é aproximadamente 1 g mL^{-1} ; e u_v^{temp} é a incerteza padrão devido à utilização da pipeta a uma temperatura potencialmente diferente da temperatura de calibração do equipamento (Equação (34)).

$$u_v^{temp} = \frac{\delta \Delta T V}{\sqrt{3}} \quad (34)$$

Para esta equação o valor δ é o coeficiente de expansão térmica da água e soro ($0,0000207^\circ\text{C}^{-1}$), ΔT a variação de temperatura do laboratório (habitualmente, $\pm 4 \text{ }^\circ\text{C}$) e V o volume nominal da vidraria utilizada.

A incerteza padrão, u_{Fv} , associada a um fator de diluição volumétrica, Fv , relevante para estimar o impacto das adições cumulativas de padrão na diluição da porção de amostra e das porções de padrão anteriores, é dado da Equação (35).

$$u_{Fv} = Fv \sqrt{\frac{(u_{vi}^{cal})^2 + (u_{vi}^{rep})^2}{vi^2} + \frac{(u_{vf}^{cal})^2 + (u_{vf}^{rep})^2}{vf^2}} \quad (35)$$

Para esta equação o V_i é o volume inicial a ser diluído, V_f o volume final da diluição, $u_{v_i}^{cal}$ e $u_{v_f}^{cal}$ são as incertezas padrão associadas aos volumes nominais dos instrumentos de medição usados para medir V_i e V_f , respectivamente, e $u_{v_i}^{rep}$ e $u_{v_f}^{rep}$ as incertezas padrão associadas à repetibilidade das medições dos volumes V_i e V_f , respectivamente. A $u_{v_i}^{cal}$ é estimada considerando a tolerância associada ao valor nominal do material volumétrico de vidro, ou o erro máximo admissível da aceitação da calibração da micropipeta ou outro equipamento automático ou semi-automático usado. O impacto de fatores de diluição na incerteza da diluição cumulativa da porção de amostra e adições de padrão será descrito na seção 5.5.

A incerteza da extrapolação da curva de calibração ($I * v_{ta}$ vs. m_a), u_{ext} , é dada pela Equação (36) (Rodrigues *et al.*, 2015):

$$u_{ext} = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{(I * v_{ta})^2}{b^2 \sum_{i=1}^N (m_{ai} - \bar{m}_a)^2}} \quad (36)$$

em que valor de $s_{y/x}$ é o desvio padrão residual da curva de calibração, b o coeficiente angular da curva de calibração, N o número de sinais coletados para construir a curva de calibração, $\overline{I * v_{ta}}$ a média das multiplicações “sinal”*“volume total de solução”, m_{ai} a massa de AU adicionado pertencente à leitura do calibrador i ($i = 1$ para N) e \bar{m}_a a média dos valores de m_{ai} .

A incerteza padrão da concentração estimada da amostra, $u(\gamma_S)$, é dada pela Equação (37):

$$u(\gamma_S) = \gamma_S \sqrt{(u'(v_S))^2 + (u'(d_1))^2 + (u'(a))^2 + \left(\frac{u_{ext}}{m_S}\right)^2} \quad (37)$$

no qual o valor de $u'(v_S)$ é a incerteza padrão relativa associada ao volume da amostra v_S ; $u'(d_1)$ a incerteza padrão relativa do fator de diluição d_1 da porção analítica na primeira adição padrão, ou seja, a maior incerteza padrão relativa da diluição da porção analítica; $u'(a)$ a incerteza padrão relativa da adição do item analisado; e u_{ext} a incerteza padrão da extrapolação estatística da curva de calibração para estimar m_S . O valor de $u'(a)$ é equivalente à incerteza padrão relativa da concentração do item analisado na solução estoque utilizada na adição do mesmo.

A Equação (37) é aplicável se γ_S variar, pelo menos, aproximadamente linearmente com a variação dos valores das variáveis de entrada, m_a e v_{ta} , considerando a incerteza padrão dessas variáveis. Esta suposição pode ser facilmente testada usando o método numérico de Kragten por comparação da incerteza padrão estimada considerando incrementos positivos ou negativos dos valores das variáveis de entrada (Viana *et al.*, 2011). Se a diferença das incertezas estimadas pelos dois tipos de incrementos for menor que 20 %-30 %, considera-se que o pressuposto de linearidade é válido. Tendo em conta o número de graus de liberdade associados às estimativas de incerteza de medições em química, habitualmente, diferenças de estimativas de incerteza menores que 20 % não são significativas (Eurachem/CITAC, 2015).

A incerteza padrão combinada da fração mássica de ácido úrico $u(\gamma_S)$ pode ser expandida para um nível de confiança de aproximadamente 95 % por meio da multiplicação pelo valor de t da distribuição de student para um nível de confiança de 95 % e os graus de liberdade, $\nu(\gamma_S)$, associados a $u(\gamma_S)$. O valor $\nu(\gamma_S)$ é equivalente aos graus de liberdade associados a u_{ext} (Equação (36)) uma vez que esta componente tem os menores graus de liberdade (em torno de 79 graus de liberdade) de todas as componentes de incerteza contabilizadas. À exceção de $u(\gamma_S)$, todas as componentes de incerteza envolvem avaliações de incerteza Tipo B que, de acordo com convenções definidas no GUM (JCMG, 2008), ficam associadas a um número elevado de graus de liberdade. Assim, $\nu(\gamma_S)$ é estimado pelo número de sinais coletados, N , usado para construir a curva de calibração ($\nu(\gamma_S) = N - 2$).

Quando a Equação (37) é aplicada, a contribuição percentual de cada componente de incerteza que é estimada tomando o quadrado da respectiva incerteza padrão relativa e dividindo-a pelo quadrado da incerteza padrão combinada relativa (ou seja, $((u(\gamma_S)/\gamma_S)^2)$). Por exemplo, a contribuição da porcentagem de incerteza de extrapolação para $u(\gamma_S)$ é estimada pela razão: $((u_{ext}/m_S)^2/(u(\gamma_S)/\gamma_S)^2)$ (JCGM, 2008).

4.8.2 Abordagem *bottom-up* baseada em simulações Monte Carlo

Quando os pressupostos do MMQ não são cumpridos, este modelo de regressão não deve ser usado para estimar a incerteza de extrapolação usando o algoritmo da Equação (36). O pressuposto referente ao preparo dos calibradores merece destaque, visto que se este não for cumprido a Equação (36) pode subestimar a incerteza da extrapolação da curva de calibração.

Quando os pressupostos do MMQ não são cumpridos, pode-se proceder à aleatorização numérica de todas as variáveis de entrada que afetam a estimativa da concentração de ácido úrico na amostra, por meio das simulações de Monte Carlo, para se estimar a distribuição do valor da grandeza medida. Esta aleatorização deve ter em conta a interdependência das variáveis, como os teores do item analisado adicionados, tendo por base a mesma solução estoque, visto que esta interdependência confere correlação matemática às variáveis. As correlações entre variáveis podem aumentar ou diminuir a incerteza da variável de saída dependendo da forma como afetam o resultado final. Assim, todo o processo de produção de calibradores e sinais deve ser reproduzido num modelo de geração de valores aleatórios com distribuições conhecidas ou determinadas experimentalmente.

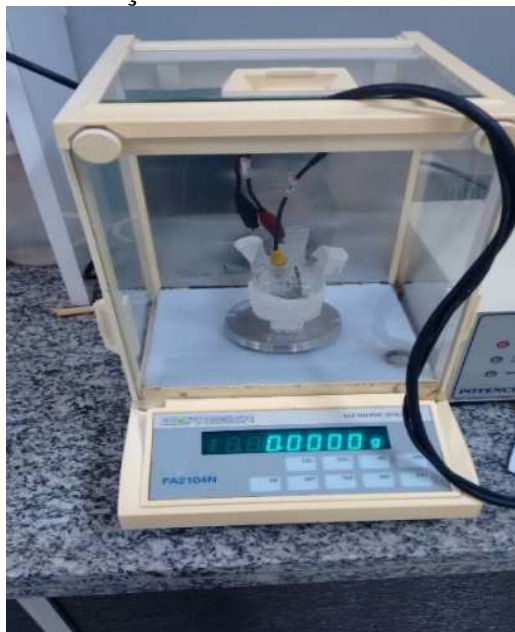
Para testar a necessidade de se desenvolver um modelo de medição alternativo à estimativa da incerteza de extrapolação pelo MMQ, quando o pressuposto do MMQ no que diz respeito à qualidade dos calibradores não é cumprido, desenvolveu-se o trabalho experimental de preparar um soro fisiológico fortificado com $3,0 \text{ mg dL}^{-1}$ de AU, cuja porção da amostra de 5 mL foi sujeita a adições sucessivas de $100 \text{ }\mu\text{L}$, de uma solução estoque de $1,68 \text{ g L}^{-1}$ de AU, usando uma pipeta graduada de 1,0 mL. Visto que a pipeta graduada não permite adições de volume com elevada repetibilidade relativa, tanto a porção de soro como as adições de solução de estoque foram controladas gravimetricamente. Esta etapa foi realizada pesando-se a porção de amostra e os volumes de solução estoque adicionados.

O controle do volume adicionado volumetricamente (usando a pipeta de 1,0 mL) ou gravimetricamente (usando a balança), permitem determinações da massa do item analisado adicionado que não cumprem ou cumprem, respectivamente, os pressupostos do MMQ relativamente à qualidade dos

calibradores. Assim, apenas as medições com adições controladas gravimetricamente podem produzir resultados com estimativas fiáveis da incerteza da medição usando a incerteza de extrapolação determinada pelo MMQ. As simulações de Monte Carlo devem produzir estimativas de incerteza adequadas independentemente da forma de como o teor do item analisado adicionado é estimado. Em particular, não estima-se incerteza demasiadamente baixas quando os calibradores tem incerteza não desprezável considerando a precisão do sinal instrumental.

A aplicação dos dois modelos *bottom-up* de medição (*i.e.* baseados no MMQ (b-MMQ) ou em simulações Monte Carlo (b-MCM)) às duas formas de determinação de adições de padrão (volumetricamente ou gravimetricamente), permitem avaliar experimentalmente a aplicabilidade dos dois modelos de medição. Com isso realizou-se simultaneamente um experimento volumetricamente e gravimetricamente, no qual para a realização deste conjunto de medições, a célula eletroquímica foi inserida no compartimento de uma balança analítica, conforme apresentado na Figura 11.

Figura 11: Experimento de adições sucessivas de AU com controle de pesagem



Fonte: Elaborado pelo Autor

A adequação dos modelos de medição desenvolvidos foram avaliados pela compatibilidade metrológica dos teores estimados e fortificados do soro

fisiológico analisado, utilizando a LPI e as simulações de Monte de Carlo para as medições volumétricas e gravimétricas.

Para as simulações de Monte Carlo, a estimativa de incerteza baseou-se na elaboração de uma folha de cálculo que envolvem a aplicação de algoritmos específicos para gerar aleatoriamente valores de cada variável tendo por base a função de densidade de probabilidade dessa variável (Cox *et al.*, 2006). O princípio baseia-se em inserir cada variável e suas respectivas componentes de incerteza e, em seguida, realizar simulações aleatórias de acordo com o tipo de distribuição de cada uma das componentes. Por exemplo, para a massa, m , de AU da solução estoque deve-se levar em conta a Equação (31) (seção 4.8.1) para estimativa de incerteza da massa, na qual se tem a contribuição da calibração da balança (incerteza padrão, u_{bal}^{cal}) referente aos efeitos sistemáticos, e a contribuição da repetibilidade da balança (incerteza padrão, u_{bal}^{rep}) referente aos efeitos aleatórios.

4.8.3 Abordagem *top-down intralaboratorial* do programa VAM

Para aplicação da abordagem *top-down intralaboratorial* proposta no programa VAM, utilizaram-se as Equações (14) a (19) (ver seção 2.4.7) com intuito de estimar a incerteza das componentes de precisão, veracidade, e incerteza adicionais. A abordagem foi aplicada usando dados do desempenho da medição observados na análise de ácido úrico nas cinco amostras de soro fisiológico fortificadas e nas duas amostras de soro humano. A incerteza da precisão foi estimada pelo desvio padrão da repetibilidade da medição, visto que o número elevado de leituras usadas para construir a curva de calibração permite estimativas da precisão com um número elevado de graus de liberdade e a repetibilidade da medição não varia significativamente ao longo do tempo ou na faixa de sinais estudada.

Assim, a incerteza padrão da precisão, $u_{precisão}$, foi estimada pelo cálculo do desvio padrão agrupado da repetibilidade das medições (Equação (15)) observado na análise das cinco amostras de soro fortificado estudado. A incerteza padrão da veracidade, $u_{veracidade}$, foi estimada considerando a recuperação do item analisado observado nas análises das amostras de soro fisiológico fortificadas e da análise de amostras de soro

humano cujos valores de referência foram estimados pelo procedimento de fortificação ou pelo procedimento espectrofotométrico de referência, respectivamente (Equação (17)). Após esse cálculo foi avaliado o valor da recuperação média estimada pelo teste *t*-student descrito na Equação (18). Foram consideradas como componentes de incerteza adicionais, estimada pela incerteza padrão u_{outras} , a concentração da solução estoque e o volume da amostra. A Equação (19) foi utilizada para combinar as três componentes de incerteza, e a incerteza padrão combinada foi posteriormente expandida para aproximadamente 95 % de confiança considerando um fator de expansão, k , igual a 2,09 para 19 graus de liberdade levando-se em conta o *t*-student para um nível de confiança de 95 %.

4.8.4 Abordagem *top-down* do guia Nordtest

Para aplicação desta abordagem utilizaram-se as Equações (14), (15), (20), (21) e (22) (ver seção 2.4.7) que descrevem a quantificação das incertezas padrão associada às componentes de precisão, veracidade/"*bias*" e adicionais. Na realidade, o guia Nordtest não discute a necessidade de considerar componente de incerteza adicionais, visto basear-se em dados recolhidos ao longo de períodos de tempo alargados (*i.e.* em torno de seis meses) para os quais todos os efeitos são aleatorizados em condições de precisão intermediária. No entanto, tendo em conta que a incerteza foi estimada numa escala de tempo curta, é necessário considerar componentes de incerteza adicionais.

Assim como na abordagem VAM, a incerteza da medição utilizado o Guia Nordtest foi utilizado na análise das cinco amostras de soro fortificado e duas amostras de soro humano. A componente de precisão foi estimada como descrito na aplicação da abordagem proposta no programa VAM. A incerteza padrão, u_{BIAS} , foi calculada considerando os resultados da análise das amostras de soro fisiológico fortificadas e amostras de soro humano considerando os valores de referências definidos pela metodologia de fortificação ou estimados pelo procedimento de referência espectrofotométrico, respectivamente (Equações (21) e (22)). Foi considerada como componentes adicionais de incerteza semelhante da avaliação realizada pela abordagem proposta no programa VAM. As componentes de incerteza foram combinadas e expandidas de forma equivalente ao descrito para abordagem do programa VAM.

4.8.5 Compatibilidade Metrológica

A equivalência metrológica, designada de compatibilidade metrológica no Vocabulário Internacional de Metrologia (INMETRO & IPQ, 2012), apresenta que das duas estimativas do teor de AU nos soros é observada se o valor absoluto da diferença dos valores de grandeza medidas é menor que a incerteza expandida da diferença. A Equação (38) apresenta a aplicação desta avaliação ao caso concreto em estudo.

$$|\gamma_s - \gamma_{Ref}| \leq t_d^{99\%} \sqrt{u^2(\gamma_s) + u^2(\gamma_{Ref})} \quad (38)$$

Em que $t_d^{99\%}$ representa o t de student para um nível de confiança de 99 % e dos graus de liberdade da diferença ($\gamma_s - \gamma_{Ref}$). Os graus de liberdade da diferença são equivalentes aos graus de liberdade da variável, neste caso γ_s , com menor graus de liberdade (*i.e.* $N-2$, em que N representa o número de sinais recolhidos na calibração do sensor eletroquímico).

Se a condição da Equação (38) for válida, os valores estimados por voltametria e de referência são metrologicamente compatíveis. Outra forma de verificar a compatibilidade das estimativas, é avaliar se o intervalo ($|\gamma_s - \gamma_{Ref}| \pm (t_d^{99\%} \sqrt{u^2(\gamma_s) + u^2(\gamma_{Ref})})$) inclui o valor zero (ver secção 5.6.3).

4.9 AVALIAÇÃO BAYESIANA DA INCERTEZA DA MEDIÇÃO

Procedeu-se a uma avaliação bayesiana da incerteza da medição considerando a prevalência de ácido úrico no soro sanguíneo da população brasileira e estimativas pela abordagem *bottom-up* frequentista da qualidade da medição eletroquímica deste parâmetro no soro. As estimativas frequentistas e bayesiana foram comparadas, realizando a estimativa frequentista inicial e o resultado da atualização da prevalência com a estimativa bayesiana.

A estimativa bayesiana foi realizada recorrendo-se a simulação *Markov chain Monte Carlo* (MCMC) que produz uma solução numérica da Equação (12) considerando um nível de confiança de 95 % (secção 2.4.5).

A prevalência de ácido úrico sérico da população brasileira (distribuição *a priori*) considerada neste estudo baseou-se no trabalho de Rodrigues *et al.*, (2012) que avaliaram a distribuição por gênero e fatores de risco cardiovascular. Os autores deste estudo observaram que concentração de ácido

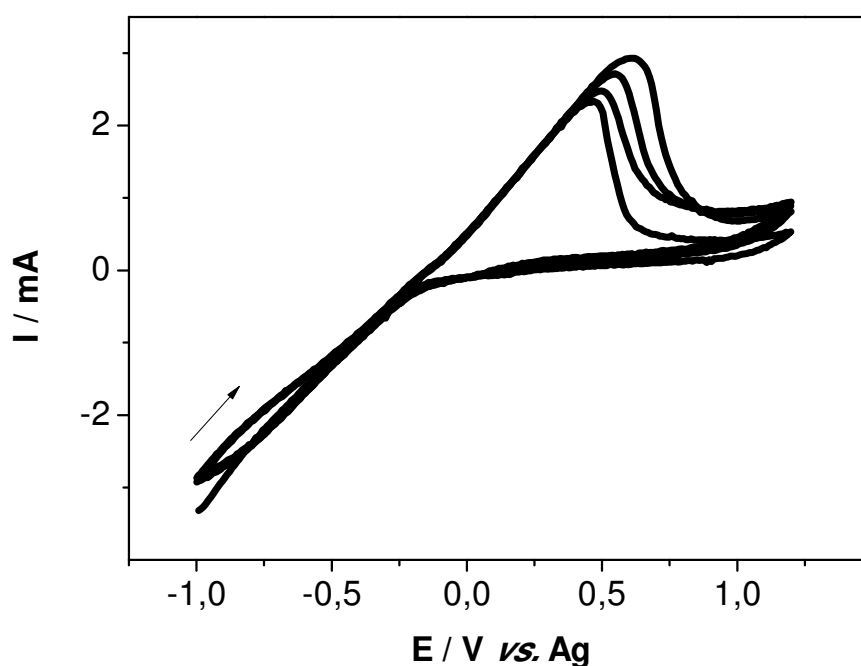
úrico sérico na população brasileira tem os valores médios e desvios padrão (média; desvio padrão) de (5,43 mg dL⁻¹; 1,41 mg dL⁻¹) para homens e (4,00 mg dL⁻¹; 1,10 mg dL⁻¹) para mulheres. A avaliação bayesiana da incerteza da medição foi realizada para as amostras de soro fortificadas, com teores entre 1,0 mg dL⁻¹ a 9,0 mg dL⁻¹, assumindo que foram obtidos de indivíduos, brasileiros, do sexo masculino e feminino. Os teores de ácido úrico mais afastados do valor médio da prevalência são tão raros que a avaliação bayesiana sugere estimativas de valores de grandeza diferentes dos estimados na avaliação frequentista.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ELETRODOS

Considerando o que foi apresentado anteriormente, na seção 4.3, preparou-se um eletrodo contendo nanografite, lignina e óleo mineral, e sobre o eletrodo foi realizada eletrodeposições de cobre metálico. O cobre atuará como mediador de elétrons na determinação eletroquímica de ácido úrico. Desta forma, as eletrodeposições foram realizadas utilizando-se a técnica eletroquímica de voltametria cíclica, no intervalo de potencial de -1,0 a 1,2 V vs. Ag em solução de sulfato de cobre $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, para 4 ciclos de potenciais e velocidade de varredura de $v_e = 300 \text{ mV s}^{-1}$, conforme apresentado na Figura 12.

Figura 12: Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo nanografite-lignina em CuSO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com velocidade de varredura de 300 mV s^{-1}

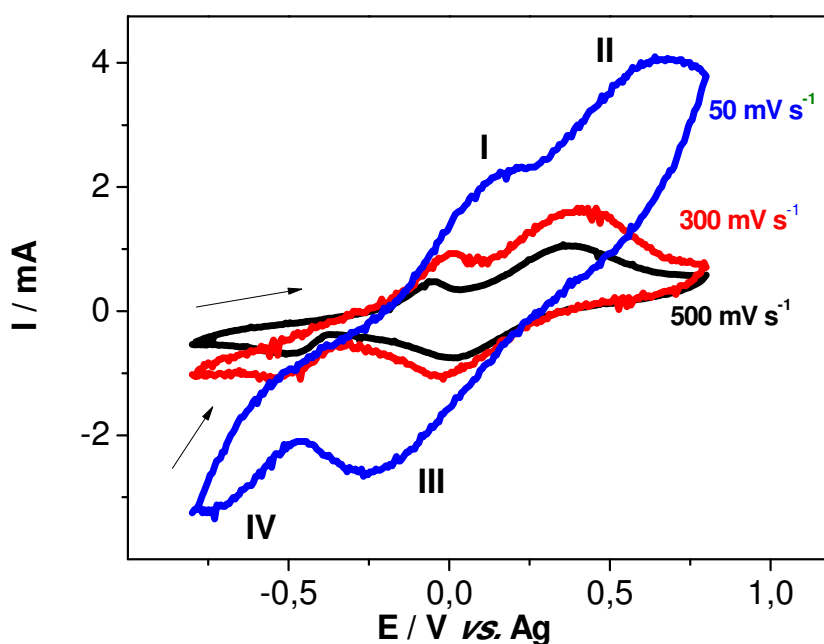


Fonte: Elaborado pelo Autor

Posteriormente a eletrodeposição de cobre metálico sobre o eletrodo, foi realizado o estudo do comportamento eletroquímico do eletrodo de Cu-nanografite-lignina em meio de solução de eletrólito de suporte, KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8).

No entanto, verificou-se a possibilidade de melhoria nos resultados, quanto a intensidade de corrente anódica/catódica nos voltamogramas cíclicos obtidos. Assim, com a finalidade de melhorar o eletrodeposição de cobre metálico sobre o eletrodo passou-se a investigar a velocidade de varredura de potenciais, v_e , na eletrodeposição de cobre em um intervalo de $50 \leq v_e \leq 500 \text{ mV s}^{-1}$, conforme apresentado na Figura 13.

Figura 13: Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de Cu-nanografite-lignina em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8) e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} , para diferentes valores de v_e de deposição de íons cobre: 50 mV s^{-1} (—); 300 mV s^{-1} (—) e 500 mV s^{-1} (—) em CuSO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com 4 ciclos de eletrodeposição utilizando voltametria cíclica no intervalo de potencial de $-1,0$ a $1,2 \text{ V vs. Ag}$



Fonte: Elaborado pelo Autor

Como pode ser observado na Figura 13, o eletrodo de Cu-nanografite-lignina apresenta dois processos anódicos após a eletrodeposição de íons cobre a 300 mV s^{-1} (pico I = $-0,0015 \text{ V vs. Ag}$ e pico II = $0,39 \text{ vs. Ag}$) e dois processos catódicos (pico III = $-0,03 \text{ vs. Ag}$ e pico IV = $-0,52 \text{ vs. Ag}$). Os picos I e IV são referentes ao processo redox

Cu(0)/Cu(I) e os picos II e III referente ao processo redox Cu(I)/Cu(II) (Dadamos *et al.*, 2009).

De acordo com alguns trabalhos na literatura, como por exemplo de Pourbeyram *et al.*, (2016), estes processos apresentados na Figura 13 são referentes aos processos redox de Cu(0)/Cu(I)/Cu(II), não ocorrendo o processo redox de Cu(II)/Cu(III), pois para que este processo possa ocorrer é necessário correntes em regiões mais anódicas.

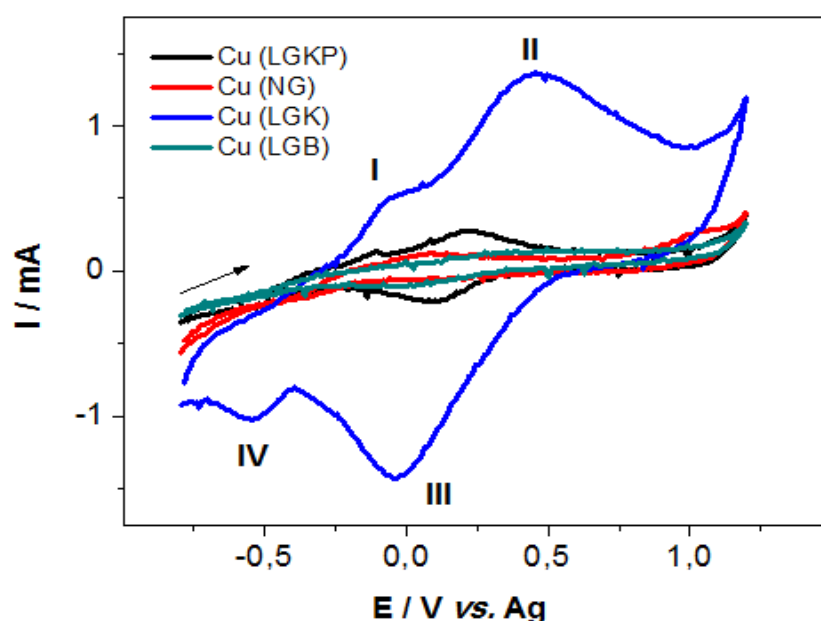
Para baixas velocidades de varredura (inferior a 50 mV s^{-1}) foi possível observar, visualmente, a mudança da cor da superfície do eletrodo. Tal mudança ocorreu devido à eletrodeposição maciça de cobre metálico. Sob tal condição, evidencia-se que praticamente toda superfície do eletrodo de nanografite-lignina encontra-se recoberta com cobre metálico. A formação praticamente de um filme de cobre sobre o eletrodo favorece o aumento da resistência de transferência de carga, o que é evidenciado a partir do perfil do voltamograma cíclico para $v_e = 50 \text{ mV s}^{-1}$ (Zhang *et al.*, 2017). Assim, as velocidades inferiores a 100 mV s^{-1} foram descartadas, considerando o fato de que o objetivo neste ensaio é de obter estruturas de cobre metálico sobre o eletrodo e não um filme.

Para velocidade de varredura acima de 400 mV s^{-1} , observou-se que a intensidade de corrente de pico diminui. A diminuição da intensidade de pico para altas velocidades é devido a escala de tempo das reações eletroquímicas, não havendo tempo suficiente para a nucleação e crescimento de cobre metálico sobre a superfície do eletrodo (Zhang *et al.*, 2017). Assim, valores de velocidade de varredura de potenciais maiores que 400 mV s^{-1} foram descartados. Desta forma, a melhor condição de eletrodeposição de cobre metálico foi de $v_e = 300 \text{ mV s}^{-1}$, que posteriormente foi confirmado com o estudo quimiométrico de otimização (ver seção 5.2).

Definida a velocidade de eletrodeposição de cobre, partiu-se para o estudo voltamétrico preparando-se o eletrodo a partir dos três diferentes tipos de lignina, sendo: 1) lignina KRAFT; 2) lignina de bagaço de cana-de-açúcar; e 3) lignina KRAFT purificada. Este estudo se fez necessário devido a variação na estrutura da lignina de acordo com a fonte pela qual foi obtida. Com esses três diferentes tipos de extração e purificada da lignina foram feitos os eletrodos conforme apresentado na seção 4.3 e realizada a caracterização eletroquímica

dos eletrodos de Cu-nanografite-lignina. Na Figura 14 estão apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos.

Figura 14: Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodos de 85 % nanografite e 15 % óleo mineral (—), Cu (NG); 25 % de lignina KRAFT, 60 % de nanografite e 15 % de óleo mineral (—), Cu (LGK); 25 % de lignina KRAFT purificada, 60 % de nanografite e 15 % de óleo mineral (—), Cu (LGKP); e 25 % de lignina de bagaço de cana, 60 % de nanografite e 15 % de óleo mineral (—) Cu (LGB); KCl 0,1 mol L⁻¹ (pH 8); $v_e = 100 \text{ mV s}^{-1}$. As eletrodeposições de cobre metálico foram em CuSO₄ 0,1 mol L⁻¹ com 4 ciclos voltamétricos de -1,0 a 1,2 V vs. Ag com $v_e = 300 \text{ mV s}^{-1}$



Fonte: Elaborado pelo Autor

A partir dos voltamogramas cíclicos (Figura 14) é possível evidenciar que o eletrodo de Cu-nanografite-lignina KRAFT (Cu(LGK)) apresentou o melhor comportamento eletroquímico. O voltamograma obtido para esta composição revelou a presença de dois pares de picos redox; tais picos apresentaram uma considerável intensidade nos valores de máximo de correntes e melhor definição em comparação com os demais voltamogramas. Assim, esta composição foi escolhida como a ideal a ser utilizada nos estudos posteriores. Este fato deve-se pela origem da lignina, pois como é uma macromolécula com composição variável (Figura 2), ela pode variar sua composição de acordo com a fonte no qual foi extraída. Em comparação com a lignina purificada sugere-se

que a lignina sem purificação tem um perfil mais bem definido por ter grupos condutores inalterados. Este fato, corrobora o trabalho de Buoro *et al.*, (2013), no qual os autores estudam o comportamento condutor da lignina, e eles confirmaram que a lignina na sua forma oxidada tem um comportamento eletroquímico mais bem definido. E no eletrodo sem a presença de lignina, somente contendo Cu-nanografite, observa-se que o pico de oxidação do cobre ocorre em potenciais próximos a 1,0 V vs. Ag, demonstrando o efeito facilitador de transferência eletrônica causado pelo lignina.

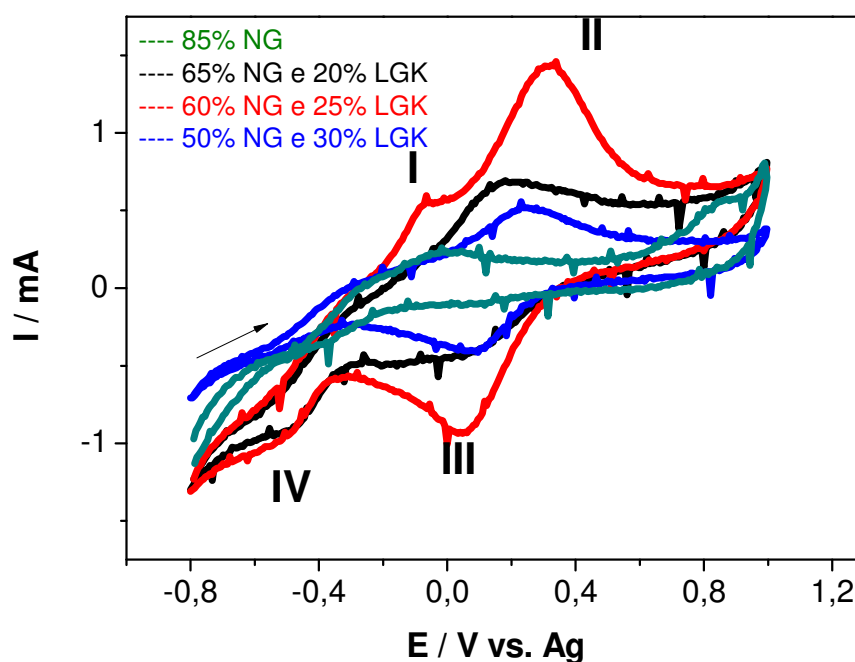
Os picos de I a IV nos voltamogramas da Figura 14 têm pequenos deslocamentos de potenciais em relação aos mesmos picos da Figura 13 para os processos redox de Cu(0)/Cu(I)/Cu(II). Estes deslocamentos são causados pela utilização de um pseudo-referência de prata, que faz com que ocorra essas variações de potenciais em função da atividade e força iônica do meio. Para as análises posteriores de AU, este efeito não acarreta problemas, visto que é utilizada adição cumulativa de padrão, tendo efeito similar a cada nova adição do item analisado (AU). Escolheu-se um pseudo-referência, pois utilizou-se um eletrodo embutido (Figura 7), sendo inviável o uso de um eletrodo de Ag/AgCl ou um eletrodo de calomelano saturado (ECS).

Escolhida a lignina adequada, passou-se ao estudo para se obter a melhor proporção de nanografite-lignina no eletrodo. Para tal, variou-se as proporções de lignina KRAFT de 15 % a 55 %, mantendo-se fixa a proporção de óleo mineral em 15 %. Na Figura 15 estão apresentados os voltamogramas cíclicos referentes ao comportamento dos diferentes eletrodos modificados na presença de cobre eletrodepositado.

A partir da Figura 15 foi possível obter-se a melhor combinação em valores de porcentagem dos compostos utilizados para a preparação do eletrodo. Assim, em termos de sensibilidade e resolução do sinal eletroquímico foi selecionada a combinação preparada a partir de 60 % de nanografite, 25 % de lignina KRAFT e 15 % óleo mineral. Para os eletrodos com valores de porcentagem de lignina KRAFT acima de 35 %, verificou-se que o eletrodo apresentou alta resistência, observando-se apenas correntes resistivas, não sendo observada a presença dos picos redox. Isso ocorre, pois com a diminuição da porcentagem em massa de nanografite (condutor) causa um isolamento

maior da superfície, ocasionando aumento de resistência do eletrodo (Isaacs *et al.*, 2017).

Figura 15: Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodos de 85 % nanografite e 15 % óleo mineral, Cu (—); 65 % nanografite, 20 % de lignina KRAFT e 15 % óleo mineral, Cu (—); 60 % nanografite, 25 % de lignina KRAFT e 15 % óleo mineral, Cu (—); e 50 % nanografite, 30 % de lignina KRAFT e 15 % óleo mineral, Cu (—); em KCl 0,1 mol L⁻¹ (pH 8); $v_e = 100$ mV s⁻¹. As eletrodeposições de cobre metálico foram em CuSO₄ 0,1 mol L⁻¹ com 4 ciclos voltamétricos de -1,0 a 1,2 V vs. Ag com $v_e = 300$ mV s⁻¹



Fonte: Elaborado pelo Autor

Escolheu-se esta configuração de eletrodo contendo nanografite, lignina, óleo mineral e cobre, pois o nanografite tem a função de ser o condutor, a lignina como facilitador da transferência eletrônica, o óleo como agente aglutinante e o cobre como mediador de elétrons na reação com o ácido úrico. Esse comportamento da lignina como facilitador de transferência eletrônica pode ser comprovado pelo voltamograma da Figura 15, no qual observa-se que sem a presença de lignina o potencial de oxidação de cobre ocorre em regiões mais anódicas, em torno de 0,8 V vs. Ag, similar ao observado na Figura 14.

Em contrapartida, na presença de lignina, os potenciais de oxidação de cobre ocorrem próximos de 0,3 V vs. Ag.

Com o intuito de analisar a viabilidade e confirmar a estabilidade mecânica e eletroquímica do eletrodo modificado para a composição definida anteriormente foram realizados 50 ciclos sucessivos de varredura de potenciais empregando-se o eletrodo modificado em solução aquosa de KCl 0,1 mol L⁻¹ (pH 8). Como resultado foi observado uma variação em torno de 5 %-15 % na intensidade de corrente de pico II, evidenciando a estabilidade do eletrodo.

Considerando a estabilidade do eletrodo modificado passou-se a estudar a reprodutibilidade no processo de eletrodeposição das estruturas de cobre sobre o eletrodo. Para tal, foram repetidas sete preparações de eletrodos de Cu-nanografite-lignina e realizada as mesmas condições de eletrodeposições conforme descrito anteriormente. A Tabela 4 apresenta os dados de corrente elétrica em cada um dos quatro ciclos de eletrodeposição em CuSO₄ 0,1 mol L⁻¹ com 4 ciclos de eletrodeposição e 300 mV s⁻¹ de velocidade de varredura após modificação de vários eletrodos.

Tabela 4: Reprodutibilidade da superfície do eletrodo de nanografite-lignina para a eletrodeposição de cobre metálico em solução de CuSO₄ 0,1 mol L⁻¹ com 4 ciclos de eletrodeposição e 300 mV s⁻¹ de velocidade de varredura

Reprodutibilidade	Corrente anódica (I_t) / mA	Desvio padrão de corrente (s_{I_t}) / mA
Ciclo 01 em solução de CuSO₄ 0,1 mol L⁻¹	2,3	0,02
Ciclo 02 em solução de CuSO₄ 0,1 mol L⁻¹	2,5	0,20
Ciclo 03 em solução de CuSO₄ 0,1 mol L⁻¹	2,7	0,17
Ciclo 04 em solução de CuSO₄ 0,1 mol L⁻¹	3,0	0,14
I_{pa} em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹	1,45	0,45

Após a obtenção das estruturas de cobre sobre o eletrodo de Cu-nanografite-lignina, este foi lavado com água, observando-se a formação de um material insolúvel de cobre como apresentado nas caracterizações voltamétricas, permitindo confirmar-se que o produto da eletrodeposição é um material eletroativo que será utilizado para a mediação de elétrons nas aplicações analíticas para determinação de ácido úrico (Dadamos *et al.*, 2009).

5.2 PLANEJAMENTO FATORIAL PARA OTIMIZAÇÃO DO ELETRODO

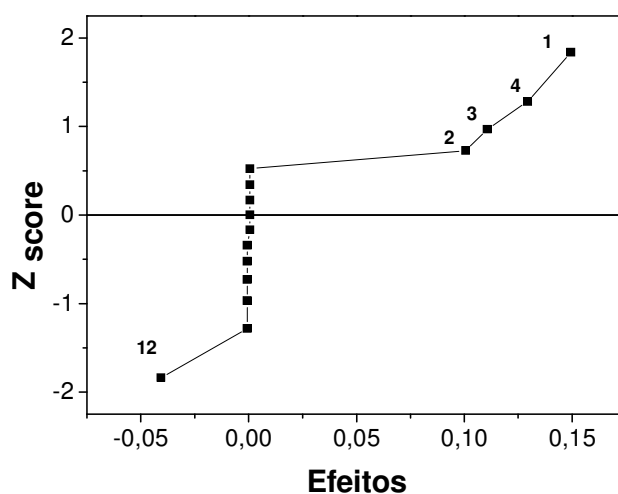
Para a realização do planejamento fatorial escolheram-se os melhores parâmetros anteriormente estudados na seção 5.1, sendo eles: 1) Porcentagem de lignina no eletrodo; 2) Velocidade de eletrodeposição de cobre; 3) Ciclos voltamétricos de eletrodeposição de cobre; e 4) Velocidade de varredura em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹.

Com estas variáveis foi realizado um planejamento completo de dois níveis com as quatro variáveis estudadas (2⁴) (Vicentini *et al.*, 2011). Os resultados obtidos no planejamento fatorial 2⁴ mostraram que todas as variáveis tiveram efeitos significativos, mas pouca interação entre elas. O modelo de regressão calculado está apresentado na Equação (39):

$$Y = 1,02 + 0,13x_1 + 0,10x_2 + 0,11x_3 + 0,15x_4 - 0,04x_{12} \quad (39)$$

no qual x_1 é a porcentagem de lignina no eletrodo, x_2 a velocidade de deposição de cobre, x_3 o número de ciclos de eletrodeposição, x_4 a velocidade de varredura em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ e x_{12} a interação linear entre a porcentagem de lignina no eletrodo e a velocidade de eletrodeposição de cobre. Os outros termos de interação não foram significativos, não sendo apresentados na Equação (39). Para comprovação das interações foi construído um gráfico de probabilidade dos efeitos de cada interação em função do Z_{score} com nível de confiança de 95 % conforme apresentado na Figura 16 (Pereira Filho, 2015).

Figura 16: Probabilidade de interação em função dos efeitos do planejamento fatorial 2⁴ com 95 % de confiança



Fonte: Elaborado pelo Autor

Das variáveis estudadas, foi fixada a velocidade de varredura de 300 mV s^{-1} por apresentarem melhores respostas eletroquímicas e as outras três variáveis foram submetidas a um planejamento fatorial completo 3^3 (Oliveira, 2017). Neste planejamento cada variável foi estudada em 3 níveis diferentes. Os dados do novo planejamento foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para 95 % de confiança conforme apresentado na Tabela 5 (Oliveira, 2017).

Tabela 5: Tabela ANOVA para o planejamento 3^3 com 95 % de confiança

Estatística de regressão					
R múltiplo		0,9866			
R-Quadrado		0,9733			
R-quadrado ajustado		0,9567			
Erro padrão		0,0434			
Observações		27			

ANOVA					
	ν_{ANOVA}	SQ	MQ	F_p	$F_{tab}^{99\%}$
Regressão	10	1,10	0,11	58,399	2,978
Resíduo	16	0,03	0,002		
Total	26	1,13			

ν_{ANOVA} – graus de liberdade; SQ – Soma Quadrática; MQ – Média Quadrática; F_p – Coeficiente de variação de Fischer calculado; $F_{tab}^{99\%}$ - Coeficiente de variação de Fischer tabelado.

Verificou-se, a partir dos dados contidos na Tabela 5, que o modelo para análise apresentou um bom ajuste. No caso a MQ da regressão e a MQ do resíduo, o teste F mostrou que estas duas médias quadráticas são estatisticamente diferentes, demonstrando que o modelo é significativo com um $F_p > F_{tab}^{99\%}$ (Pereira Filho, 2015).

Os valores de p -valor (ver folha de cálculo “5.2 - Planejamento fatorial para otimização do eletrodo”) foram maiores que 0,05 para as variáveis significativas (Equação (40)), demonstrando que a hipótese nula não pode ser rejeitada e que o modelo se encaixa aos dados experimentais. O erro padrão foi de apenas 4,3 % e os valores de R múltiplo (0,9866), R-Quadrado (0,9733) e R-quadrado ajustado (0,9567) apresentaram boa correlação da equação de segunda ordem representado pela Equação (40) (Pereira Filho, 2015):

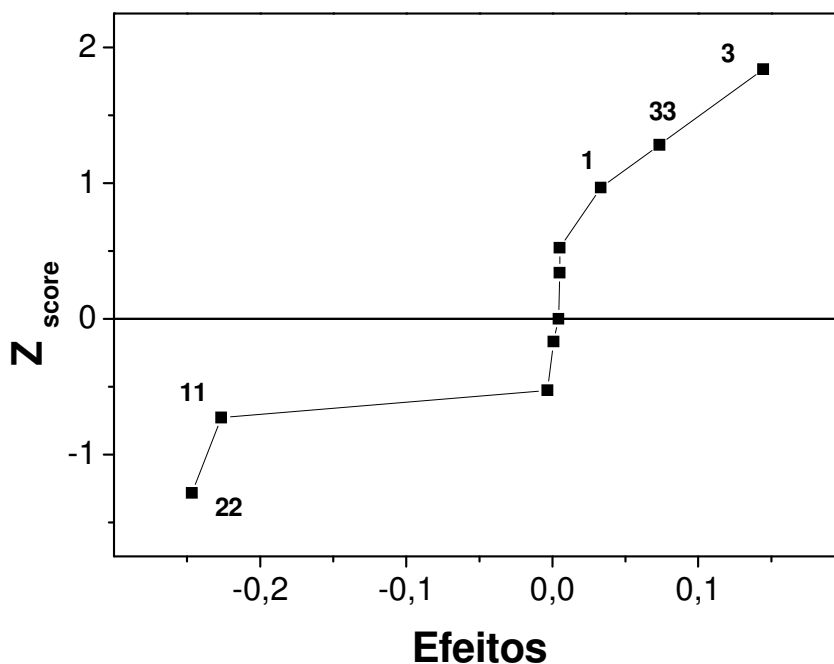
$$Y = 1,31_{(\pm 0,05)} + 0,03x1_{(\pm 0,02)} + 0,14x3_{(\pm 0,02)} - 0,23x11_{(\pm 0,04)} \quad (40)$$

$$- 0,25x22_{(\pm 0,04)} + 0,073x33_{(\pm 0,04)}$$

no qual $x1$ é a porcentagem de lignina no eletrodo, $x3$ o número de ciclos de eletrodeposição, $x11$ a interação quadrática da porcentagem de lignina no eletrodo, $x12$ a interação quadrática da velocidade de eletrodeposição de cobre sobre o eletrodo e $x33$ é a interação quadrática do número de ciclos de eletrodeposição de cobre sobre o eletrodo. Os outros termos de interação não foram significativos, não sendo apresentados nesta equação.

Com os dados provenientes da Equação (40) foi possível relacionar as interações em um gráfico de probabilidade dos efeitos de cada interação em função do Z_{score} para 95 % de confiança como pode ser visto a partir da Figura 17.

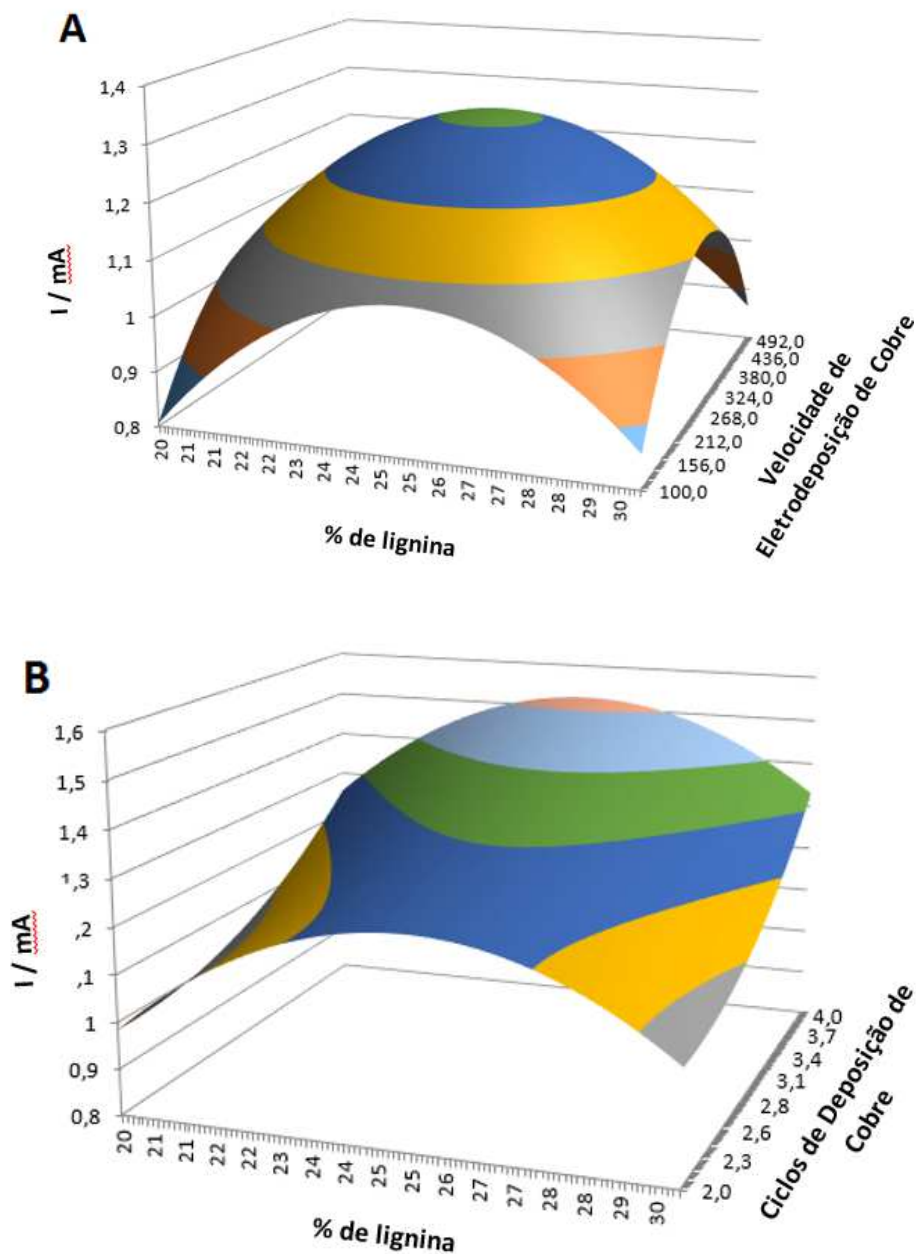
Figura 17: Probabilidade de interação em função dos efeitos do planejamento fatorial 3^3 com 95 % de confiança

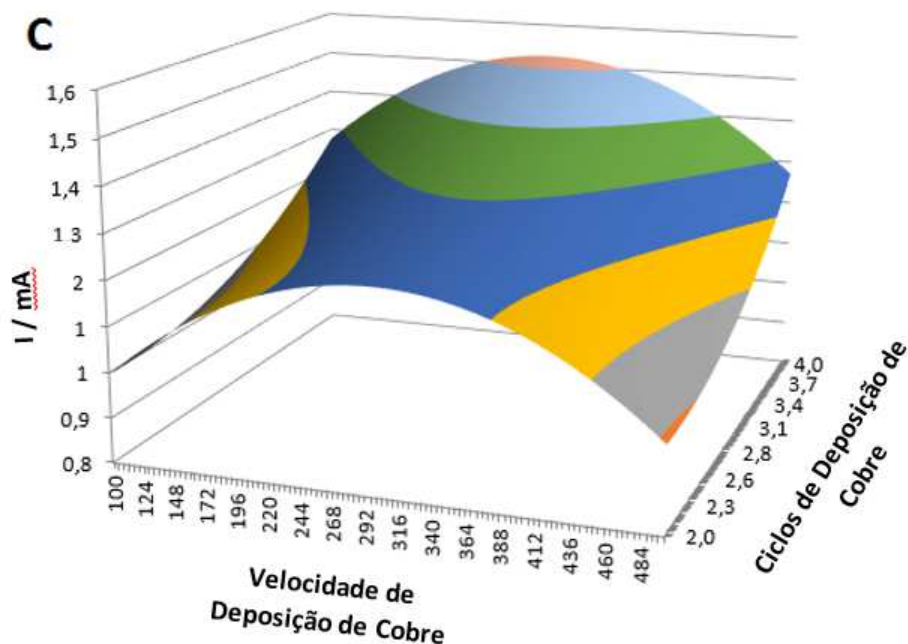


Fonte: Elaborado pelo Autor

Com o auxílio da Equação (40) foi, ainda, possível a construção dos gráficos de contorno, Figura 18. Este gráfico foi obtido com o intuito de otimizar as variáveis estudadas (Vicentini *et al.*, 2011).

Figura 18: Gráfico de contorno obtido para a otimização das variáveis: (A) Interação entre porcentagem de lignina no eletrodo (x_1) e velocidade de varredura, v_e para a eletrodeposição de cobre (x_2); (B) Interação entre porcentagem de lignina no eletrodo (x_1) e número de ciclos para a eletrodeposição de cobre metálico (x_3); e (C) Interação entre velocidade de varredura, v_e , para a eletrodeposição de cobre metálico (x_2) e número de ciclos para a eletrodeposição de cobre metálico (x_3). Os valores numéricos apresentados no gráfico de contorno referem-se à corrente elétrica





Fonte: Elaborado pelo Autor

A partir da Equação (40) e Figura 18 foi possível definir as regiões com valores de máximo de intensidade de corrente (voltamograma cíclico), para uma composição de 25 % de lignina, usado no eletrodo de trabalho, uma velocidade de varredura, v_e , para a eletrodeposição de 300 mV s^{-1} e quatro ciclos voltamétricos.

Estes resultados, os quais forneceram o melhor valor de intensidade de corrente para os voltamogramas foram, então, empregados para as etapas de modificação e aplicação do eletrodo usado nos ensaios para a determinação quantitativa de ácido úrico em amostras de soro fisiológico e humano. Tais resultados foram aplicados, posteriormente, às etapas de caracterização eletroquímica e de superfície dos sistemas sob investigação e apresentados na próxima seção.

As folhas de cálculo utilizadas para esta seção estão contidas como arquivo “5.2 - Planejamento fatorial para otimização do eletrodo” no material suplementar.

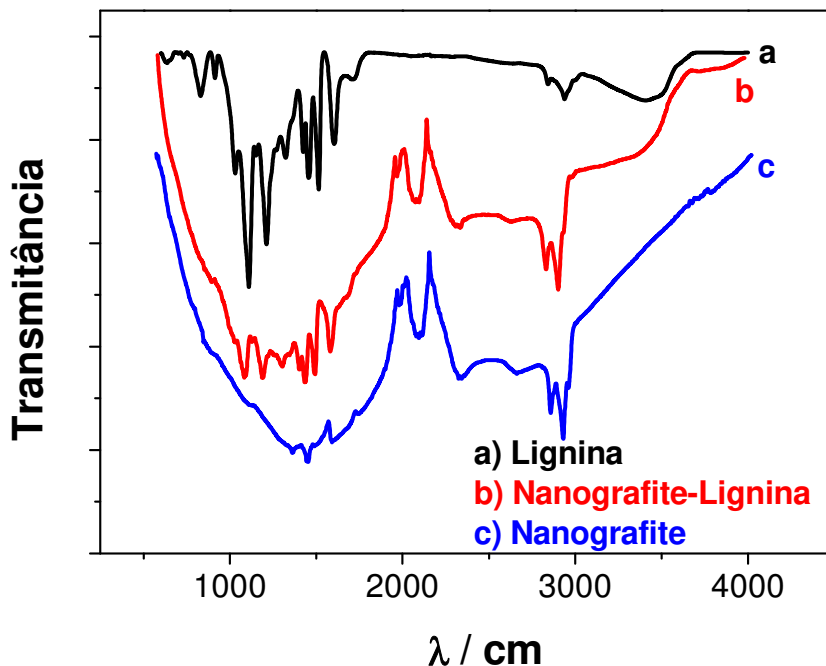
5.3 CARACTERIZAÇÃO DO ELETRODO

As caracterizações aplicadas aos eletrodos de Cu-nanografite-lignina e do eletrodo de nanografite-lignina foram efetivadas empregando-se as técnicas de

espectroscopia no infravermelho, Difractometria de Raios X, microscopia eletrônica de transmissão, impedância eletroquímica e voltametria cíclica.

Na Figura 19, o espectro de infravermelho obtido para o nanografite e para a lignina apresenta picos de estiramento característicos da presença de grupos: O-H (3500 cm^{-1}); C=C (1600 cm^{-1}); e C-H (2900 cm^{-1}) (Tolstoy *et al.*, 2003). Para o material contendo nanografite-lignina, pode-se observar a presença de picos referentes ao nanografite e a lignina, porém apresentando deslocamentos para valores de energia maiores (intervalo: $1000 - 1800\text{ cm}^{-1}$), além das alterações nos sinais presentes tanto no nanografite quanto na lignina, no intervalo de $2850 - 3100\text{ cm}^{-1}$, permitindo sugerir a interação entre as espécies, o que foi corroborado pelas técnicas de Difractometria de Raios X e pela microscopia eletrônica de transmissão, apresentadas mais adiante neste texto.

Figura 19: Espectros de infravermelho obtidos para: a) lignina KRAFT (—); b) nanografite-lignina (—); e c) nanografite (—); pastilhas preparadas em KBr 1:100 (m/m)

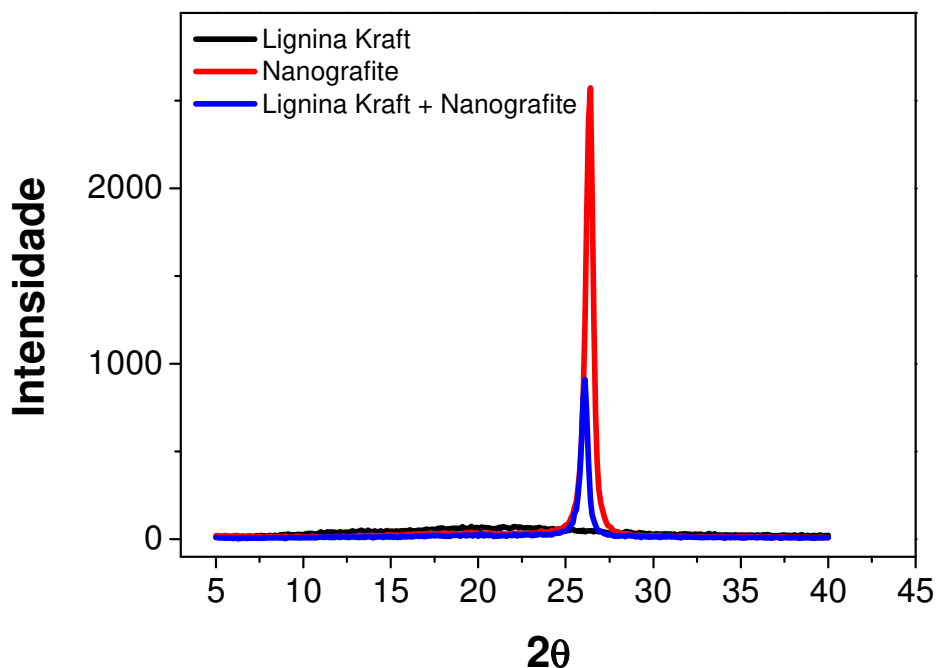


Fonte: Elaborado pelo Autor

A Difractometria de Raios X dos compostos individuais e para a mistura nanografite-lignina apresentados na Figura 20 mostram a presença de um único

pico em 27° que está relacionado ao plano cristalino (002) de materiais grafiticos, relacionado com a distância entre as folhas concêntricas do material (Zhao *et al.*, 2006). Para o difratograma obtido para a amostra de lignina Kraft não se observa a presença de reflexões, devido à ausência de cristalinidade. O plano cristalino (002) do nanografite permanece o mesmo após a mistura com lignina, no entanto, ocorre uma diminuição da intensidade do pico em 27° mostrando que este plano já não é preferencial em um sistema anisotrópico, pois a propriedade física depende da direção cristalográfica.

Figura 20: Difratograma de Raios X obtidos para: nanografite (—); lignina KRAFT (—); e nanografite-lignina (—)



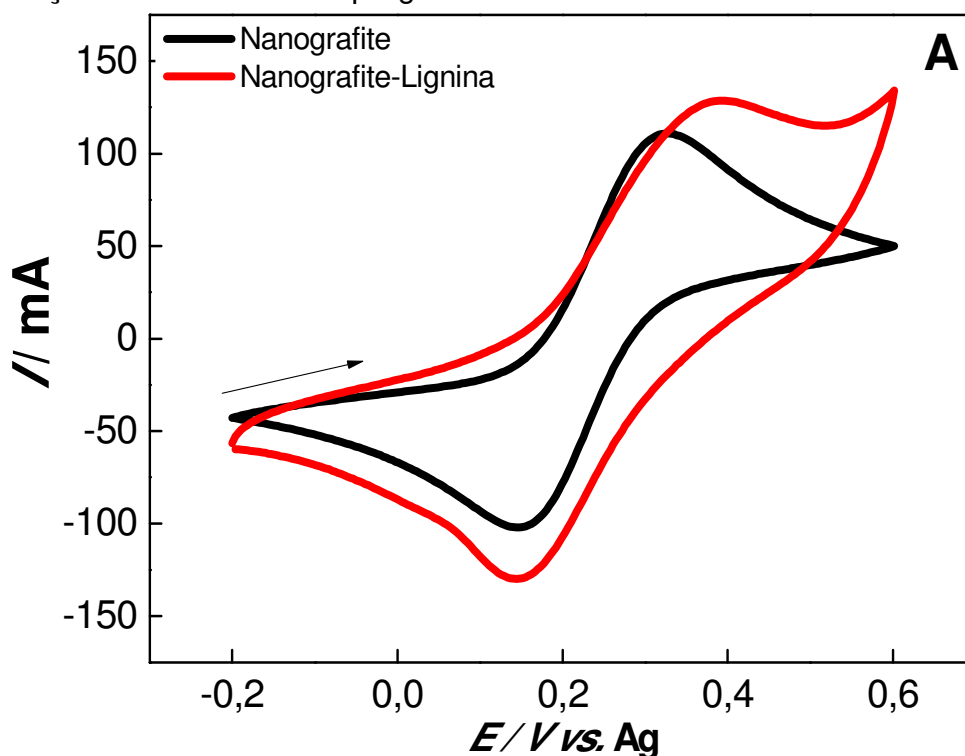
Fonte: Elaborado pelo Autor

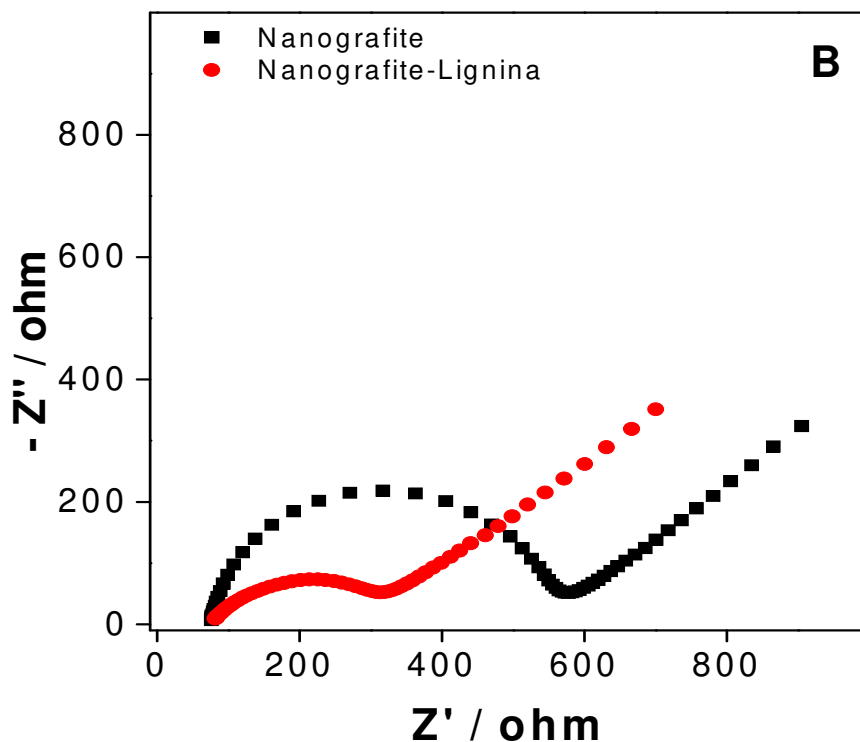
A comparação dos difratogramas de Raios X obtidos para o nanografite e para a lignina com o difratograma da mistura nanografite-lignina, é possível notar-se que a proporção de nanografite, pico em 27° , diminui consideravelmente em intensidade, ~60 %; e que há um deslocamento nos valores dos picos das raias obtidas para a amostra do nanografite e para a mistura de nanografite-lignina. Tais observações permitiram sugerir a forte interação entre o nanografite e a lignina, em concordância com os ensaios de infravermelho,

espectroscopia de impedância eletroquímica, microscopia eletrônica de transmissão e voltametria cíclica.

A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica foi utilizada para caracterizar o eletrodo de nanografite-lignina. Utilizou-se uma solução de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de ferricianeto de potássio e ferrocianeto de potássio em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ sobre o eletrodo de nanografite e nanografite-lignina. Para os ensaios foi aplicado uma onda senoidal com 10 mV de amplitude no potencial de pico. Este valor foi originado a partir de ensaios prévios de voltametria cíclica para o par redox ferricianeto de potássio/ferrocianeto de potássio conforme apresentado na Figura 21A para uma faixa de frequência (f_e) de 100 kHz a $0,1 \text{ Hz}$. As comparações dos resultados experimentais obtidos para os eletrodos ensaiados estão evidenciados na Figura 21B.

Figura 21: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de nanografite (—): e nanografite-lignina (—) em $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de ferrocianeto/ferricianeto de potássio em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8); $v_e = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Espectros de plano complexo obtidos para o eletrodo de nanografite (\square) e eletrodo de nanografite-lignina (\circ) em $100 \text{ kHz} \leq f_e \leq 0,1 \text{ Hz}$; onda senoidal, amplitude 10 mV aplicada no E de meia onda obtido a partir da voltametria cíclica. As linhas ultrapassando os identificadores são os resultados de simulação com software empregando o circuito de Randles modificado

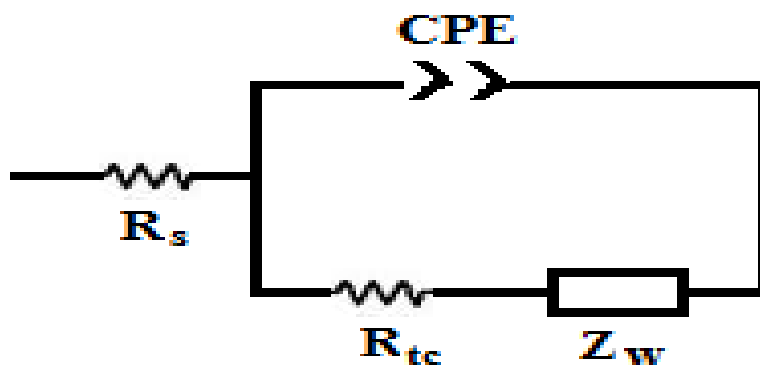




Fonte: Elaborado pelo Autor

Para a interpretação/investigação dos espectros apresentados na Figura 21, foi aplicado o circuito modelo proposto por Randles $R_s(CPE[R_{tc}Z_w])$ (Retter *et al.*, 2003) e os resultados desta aplicação estão apresentados na Figura 22. Para este sistema R_s é a resistência da solução, R_{tc} a resistência de transferência de carga, Z_w a impedância de Warburg e CPE é o elemento constante de fase que representa a capacitância da dupla camada.

Figura 22: Modelo de circuito equivalente utilizado para análise dos dados obtidos com os gráficos de plano complexo obtidos com a espectroscopia de impedância eletroquímica



Fonte: Elaborado pelo Autor

Os efeitos avaliados, a partir da modificação do eletrodo base, de nanografite (unicamente), para nanografite-lignina, com respeito à cinética de transferência eletrônica fica evidenciado a partir da Figura 21. Deve-se considerar para tal entendimento o deslocamento dos potenciais de pico anódico/catódico dos voltamogramas e na intensificação dos sinais de corrente de pico.

A simulação dos resultados obtidos para os diferentes tipos de eletrodos, aplicando um circuito de Randles modificado $R_s(CPE[R_{tc}Z_w])$ utilizando-se o software *Electrochemistry-ZView2*, forneceu os parâmetros para a interpretação dos resultados sob avaliação. Os resultados do tratamento empregando o modelo segundo Randles estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Dados obtidos com os espectros de plano complexo da Figura 21

Eletrodo	R_s (Ω)	CPE (F)	R_{tc} (Ω)	W	$k_{app}(\times 10^{-3})$ (cm s^{-1})
Nanografite	75,59	$9,14 \times 10^{-7}$	473,7	0,465	11,2
Nanografite-Lignina	76,63	$2,8 \times 10^{-5}$	242,9	0,468	21,9

A Tabela 6 apresenta os valores de resistência e capacitância observados para cada eletrodo e permitiu sugerir que estes valores dos sistemas avaliados variam para cada eletrodo, demonstrando assim a modificação do mesmo com a presença da lignina. Os valores de resistência da solução R_s e impedância de warburg W foram similares, visto que utilizou-se um circuito igual para tratamento dos dados e a solução foi a mesma em ambas configurações do eletrodo.

O valor da resistência de transferência de carga R_{tc} , relacionada ao eletrodo de nanografite-lignina, revelou uma diminuição em comparação ao eletrodo preparado unicamente com o nanografite. Este comportamento permitiu sugerir a efetiva modificação do eletrodo com a adição da lignina. Este comportamento de diminuição da resistência de transferência de carga se deve ao fato de que a lignina presente no eletrodo atua como facilitador no processo de transferência eletrônica para as espécies eletroativas presentes em solução (Buoro *et al.*, 2013).

Outro papel importante da presença da lignina é a função de proteção da superfície contra impurezas presentes nas amostras, que possam se adsorver

na superfície dos eletrodos de grafite. Com tal impedimento não há alteração na resistência do sistema (Wang *et al.*, 2016), sendo condizente com os voltamogramas obtidos na Figura 21A.

A aplicação de ondas senoidais de baixa amplitude, Figura 21B, possibilitou uma boa separação entre as regiões de frequência; região de controle cinético e de controle de transporte de massa, observados para os processos de oxidação/redução. Considerando as diferentes regiões de frequência e a Equação (41) foi possível a determinação da constante de velocidade de transferência eletrônica heterogênea aparente (K_{app}) conforme apresentado na Tabela 6 (Sabatani *et al.*, 1987).

$$K_{app} = \frac{RT}{F^2 R_{tc} C A_g} \quad (41)$$

Sendo F a constante de Faraday (96485 C mol^{-1}); C a concentração de ferrocianeto de potássio e ferricianeto de potássio em solução ($1 \times 10^{-5} \text{ mol cm}^{-3}$); R a constante física dos gases ($8,314 \text{ C V K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$); T a temperatura em Kelvin (298 K); A_g área do eletrodo ($0,50 \text{ cm}^2$); e R_{tc} a resistência de transferência de carga obtida a partir da simulação dos resultados da Figura 21.

Avaliando-se os valores de K_{app} apresentados na Tabela 6 fica evidente que o eletrodo de nanografite-lignina apresenta um valor de K_{app} duas vezes maior do que o eletrodo preparado unicamente com o nanografite. Este resultado permite confirmar-se que o processo de transferência eletrônica é consideravelmente mais rápido quando se trata do eletrodo nanografite-lignina, o que corrobora os resultados das técnicas discutidas anteriormente.

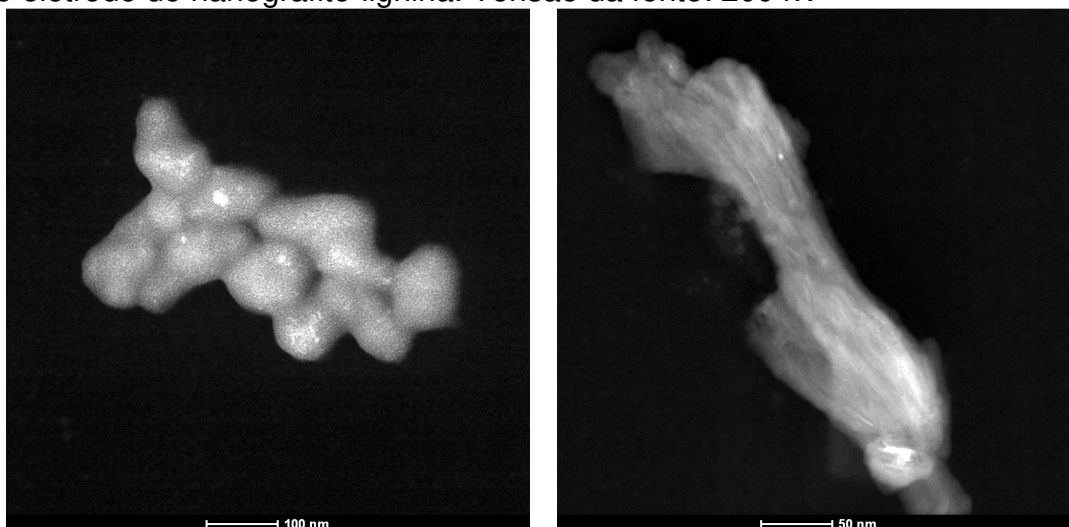
Posterior aos estudos de espectroscopia de impedância eletroquímica, partiu-se para a caracterização do eletrodo modificado utilizando a microscopia eletrônica de transmissão (TEM), conforme apresentado na Figura 23.

Fica evidente, a partir da Figura 23, a diferença na morfologia das partículas de nanografite, observando-se um agregado de partículas com geometria esférica (característico do nanografite) e posterior a formação da mistura nanografite-lignina apresentando geometria “cilíndrica”, sem a evidência da presença efetiva das esferas do nanografite.

A partir das imagens apresentadas na Figura 23 é possível observar a indicação de escala e apropriar-se da dimensão das estruturas de grafite; sendo as mesmas da ordem de 300 nm, o que confirma a dimensão de nanoestrutura

para o eletrodo de nanografite-lignina. Este resultado de imagens TEM corroboram os resultados apresentados anteriormente para as demais técnicas empregadas na caracterização do eletrodo desenvolvido.

Figura 23: Microscopia eletrônica de transmissão do eletrodo de nanografite e do eletrodo de nanografite-lignina. Tensão da fonte: 200 kV



Fonte: Elaborado pelo Autor

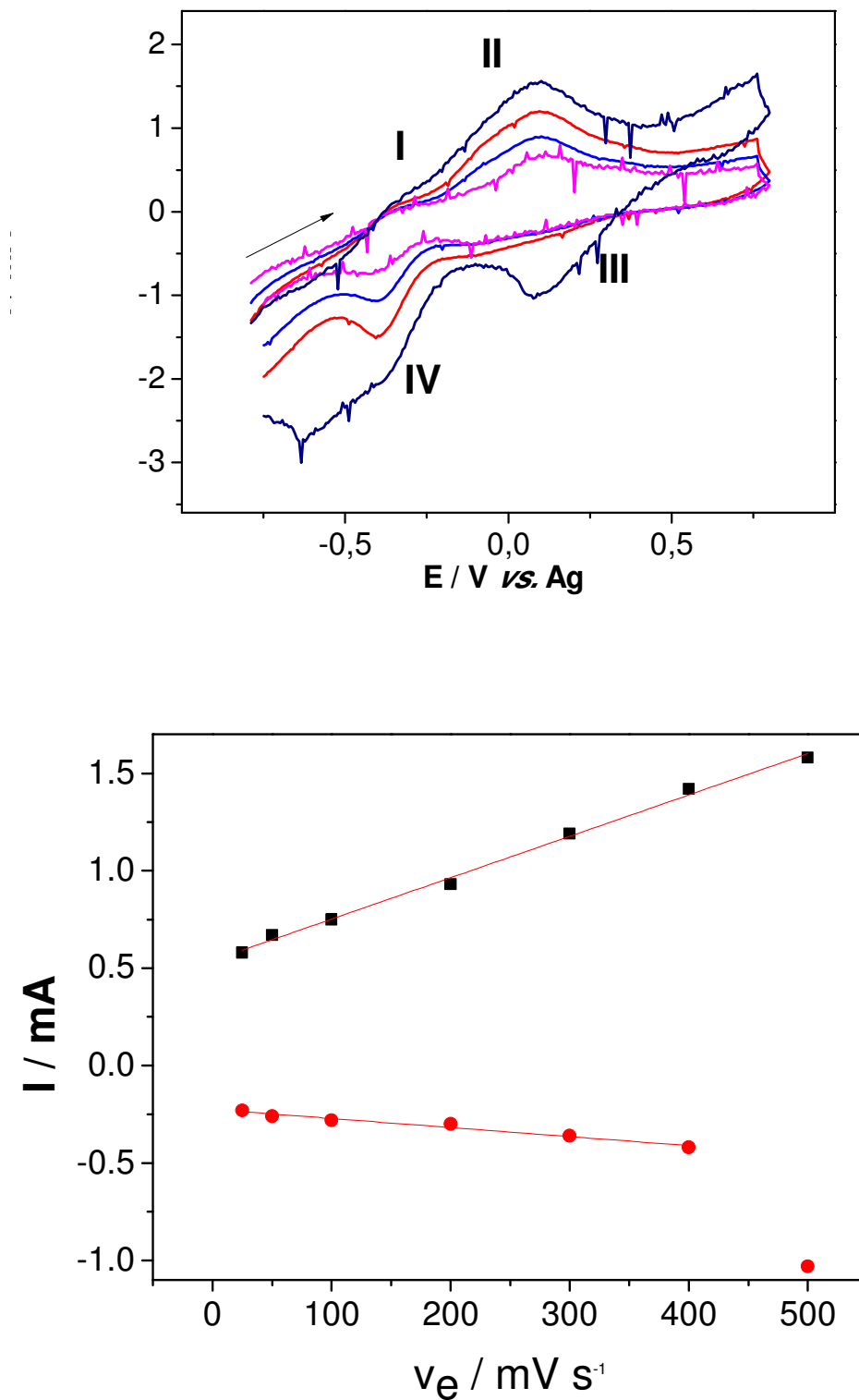
A partir dos valores das intensidades de corrente observadas para os picos I a IV dos voltamogramas apresentados nas Figuras 13, 14 e 15, foi realizado uma investigação com o objetivo de se inferir quanto ao controle do processo de transferência de massa nos ensaios eletroquímicos. Assim, foram preparadas as curvas apresentadas na Figura 24, para a correlação de correntes de pico anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}) como função da velocidade de varredura de potenciais (v_e).

A partir da avaliação visual do aspecto geral da Figura 24 é possível concluir que há dependência, para ambos os picos, da intensidade de corrente com o aumento dos valores de v_e . Comportamento desta natureza permite sugerir que o processo de transferência de massa é controlado por adsorção da espécie eletroativa na superfície do eletrodo (Dadamos *et al.*, 2009). Assim, as relações lineares das retas anódicas e catódicas para o eletrodo de Cu-nanografite-lignina podem ser representadas pelas Equações (42) e (43).

$$I_{pa}(mA) = 0,54 + 0,002v_e (mV s^{-1}) \text{ anódico} \quad (42)$$

$$I_{pc}(mA) = -0,23 - 4,64v_e (mV s^{-1}) \text{ catódico} \quad (43)$$

Figura 24: Efeito da velocidade de varredura, v_e na resposta voltamétrica do eletrodo Cu-nanografite-lignina em KCl 0,1 mol L⁻¹, pH 8, com a dependência das intensidades de correntes de pico anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}) com a v_e para os picos II e III dos voltamogramas cíclicos



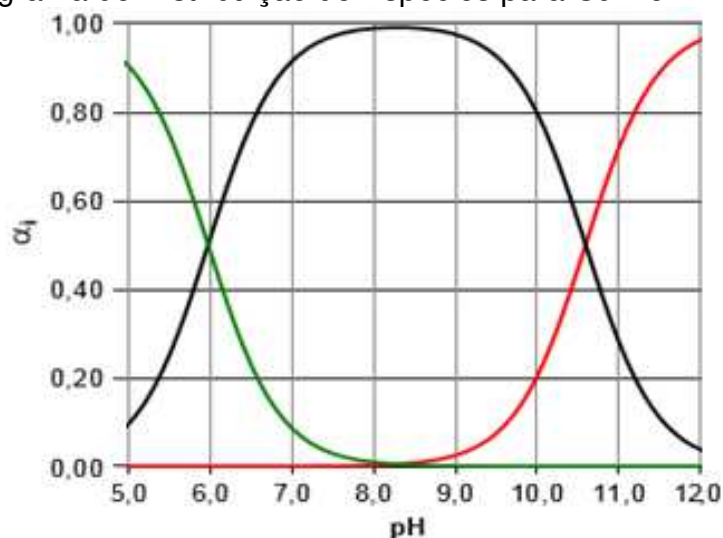
Fonte: Elaborado pelo Autor

Ademais do processo de transferência de massa, a separação entre os valores dos potenciais de pico anódico (E_{pa}) (pico II - 0,097 V vs. Ag) e catódico (E_{pc}) (pico III - 0,083 V vs. Ag), ΔE , foram inferiores a 15 mV, mesmo para elevados valores de velocidades de varredura. Estas observações permitem sugerir que o par redox está associado a um processo eletroquímico reversível e controlado por adsorção da espécie eletroativa presente na solução (Bard *et al.*, 1980).

A partir dos resultados relatados anteriormente foi possível sugerir que as espécies Cu(0) presentes na superfície do eletrodo (Cu-nanografite-lignina) é parcialmente oxidada a espécie Cu(I) e posteriormente reduzida a Cu(0) (picos I e IV- Figura 24). Estas espécies de Cu(I) na sequência da varredura de potenciais são oxidadas a espécie Cu(II), a qual será posteriormente reduzida a Cu(I) (picos II e III- Figura 24).

O pico III referente a redução Cu(II)/Cu(I) tem uma menor intensidade de corrente em relação a oxidação Cu(I)/Cu(II). Para tal fato, permite-se sugerir a formação do dímero $[\text{Cu}_2(\text{OH})_2]^{2+}$ de acordo com Baes & Mesmer (1976) em seu livro “*Hidrólise de Cátions*”, no qual os autores estudam o diagrama de distribuição de espécies dos íons Cu^{2+} em solução aquosa em função do pH, e observa-se a formação deste dímero na faixa de pH estudada. O Diagrama de Distribuição de espécies para o cobre nestas condições está apresentado na Figura 25.

Figura 25: Diagrama de Distribuição de Espécies para Cu^{+2} em meio alcalino

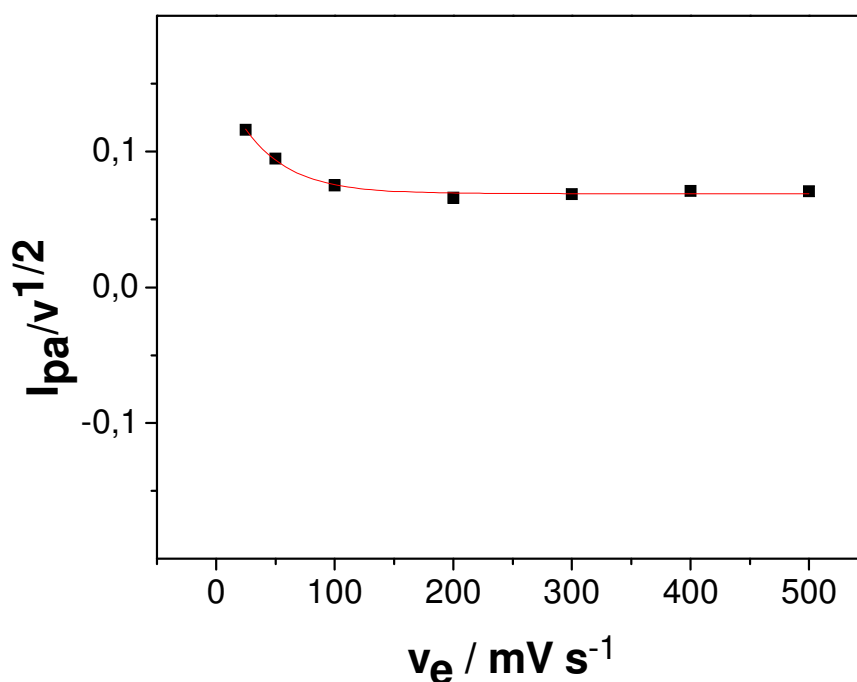


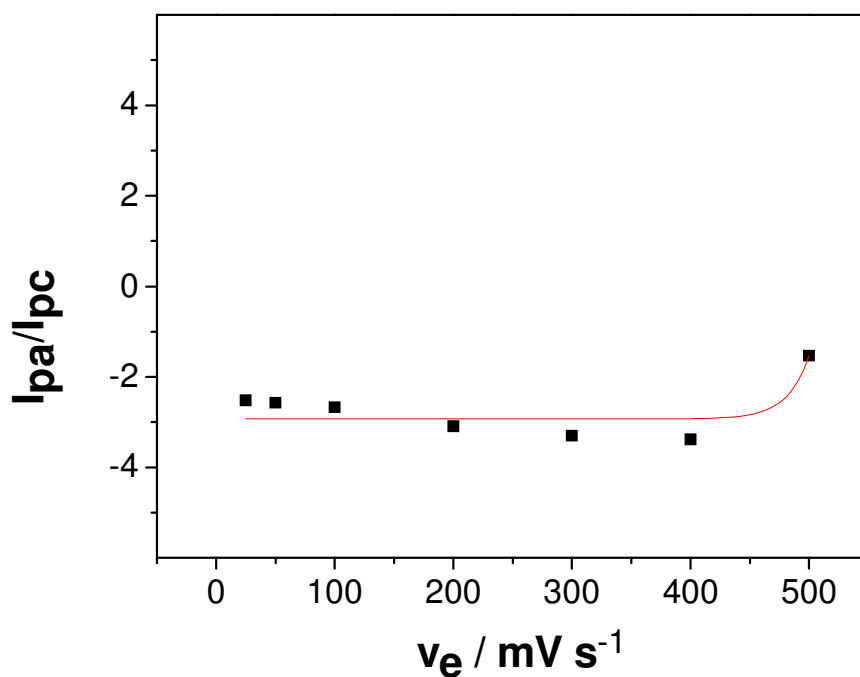
Fonte: Adaptado Baes *et al.* (1976) e utilizando programa CurtiPot

Se não ocorresse a formação do referido dímero, a redução Cu(II)/Cu(I) (pico III) teria uma área voltamétrica similar a oxidação Cu(I)/Cu(II) (pico II) conforme pode ser observado para altas velocidades de varredura (500 mV s^{-1}). Quando a velocidade de varredura de potenciais é alta, sugere-se que não se tenha tempo suficiente para formação do dímero $[\text{Cu}_2(\text{OH})_2]^{2+}$ (Baes *et al.*, 1976), tendo uma limitação cinética para esta formação.

A Figura 26 apresenta outra característica que evidencia a formação do dímero é o mecanismo envolvido na transferência eletrônica, sendo um mecanismo Eletroquímico-Químico (EC).

Figura 26: Relação de dependência de $I_{pa}/v_e^{1/2}$ com velocidade de varredura de potenciais v_e e dependência de I_{pa}/I_{pc} com velocidade de varredura de potenciais v_e , obtidos dos voltamogramas da Figura 24





Fonte: Elaborado pelo Autor

Este mecanismo pode ser evidenciado conforme destacado por Robinson *et al.* (1985), no qual os autores observaram a dependência de I_{pa}/I_{pc} aumenta com o aumento da velocidade de varredura de potenciais v_e , e $I_{pa}/v_e^{1/2}$ diminui com o aumento da velocidade de varredura de potenciais v_e , conforme apresentado na Figura 26.

Com isso, permite-se sugerir a etapa eletroquímica $\text{Cu(I)} \rightarrow \text{Cu(II)}$ e a etapa química $2\text{Cu(II)} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow [\text{Cu}_2(\text{OH})_2]^{2+} + \text{H}_2$. Este mecanismo também é destacado no trabalho de Pan *et al.*, (2017) que propõem mecanismo similar. Comportamento desta natureza é característico de um processo eletroquímico reversível com controle de transferência de massa controlado por adsorção da espécie eletroativa.

Conhecido o mecanismo redox proposto para o eletrodo foi possível a determinação da quantidade estimada de cobre metálico eletrodepositada (adsorvida) sobre a superfície do eletrodo denominada por Γ (mol cm^{-2}). Para efetivar esta determinação foi utilizada a Equação (44) (Kamyabi *et al.*, 2008).

$$I_{pa} = \frac{n_e^2 F^2 A_g \Gamma v_e}{4RT} \quad (44)$$

Para a qual, R é a constante dos gases, I_{pa} corrente de pico anódica, F a constante de Faraday, A_g a área de eletrodo, v_e a velocidade de varredura de potenciais, n_e número de elétrons envolvidos e T a temperatura em Kelvin. Aplicado os valores das constantes a fórmula e feita à inserção dos dados de intensidade de corrente de pico e v_e , experimentais, o valor da concentração eletroativa (Γ) foi determinada sendo de $\Gamma = 4,26 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$. Considerando que a espessura da camada de difusão em sistemas sem agitação mecânica seja em torno de $1 \mu\text{m}$ (Bard *et al.*, 1980), a concentração de cobre metálico na superfície do eletrodo será de aproximadamente 40 mmol L^{-1} .

5.4 CARACTERIZAÇÃO DO ELETRODO NA PRESENÇA DE ÁCIDO ÚRICO

Inicialmente, buscou-se investigar a atividade redox do ácido úrico, presente em solução aquosa, sobre a superfície do eletrodo de nanografite, na ausência e na presença de lignina e cobre eletrodepositado. O comportamento eletroquímico de ácido úrico foi estudado em um intervalo de potencial de $-1,0 \leq E \leq 1,0 \text{ V vs. Ag}$, empregando-se uma velocidade de varredura de potenciais, $v_e = 300 \text{ mV s}^{-1}$ em pH 8.

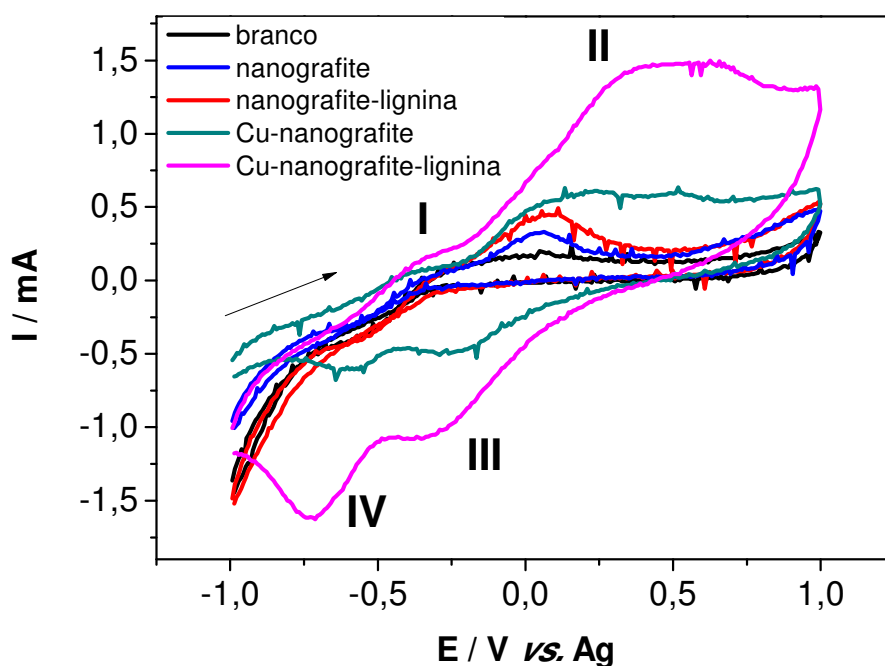
Foram investigadas duas situações: em ausência de ácido úrico; e em presença de ácido úrico $5,0 \text{ mg dL}^{-1}$; e fazendo-se uso de quatro configurações diferentes de eletrodos: 1) nanografite; 2) Cu-nanografite; 3) nanografite-lignina; e 4) Cu-nanografite-lignina; e na Figura 27 estão apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

A partir da avaliação do perfil dos voltamogramas da Figura 27 pode ser evidenciado que para os eletrodos na presença de cobre ocorrem dois processos eletroquímicos, semelhante ao das Figuras 13, 14 e 15, estando estes processos atribuídos as etapas de oxidação/redução das espécies Cu(0)/Cu(I)/Cu(II).

Fica nítida a intensificação da corrente de pico anódica de aproximadamente três vezes, para a preparação Cu-nanografite-lignina, em comparação a preparação Cu-nanografite, a qual apresenta uma intensidade de corrente de pico superior as preparações anteriores. Nos eletrodos sem a presença de cobre, observa-se apenas um pico de oxidação, referente a oxidação de ácido úrico, estando em potencial próximo a $0,0 \text{ V vs. Ag}$, e na

presença de íons cobre, este potencial se desloca para regiões mais positivas, em torno de 0,25 V vs. Ag.

Figura 27: Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de nanografite (—); nanografite-lignina (—); Cu-nanografite (—); Cu-nanografite-lignina (—) e na ausência de AU; “branco” (—), em KCl 0,1 mol L⁻¹ (pH 8); $v_e = 300$ mV s⁻¹; 5,0 mg dL⁻¹ de AU



Fonte: Elaborado pelo Autor

Este deslocamento de potenciais se deve a formação do complexo de Cu-AU, que adsorve sobre a superfície do eletrodo, dificultando o processo de oxidação. Este deslocamento de potenciais para regiões mais anódicas é compensado pela maior intensidade de corrente, dando ao processo maior sensibilidade. Com a formação deste complexo, diminui-se significativamente a interferência de outras espécies, conforme será discutido adiante.

A intensificação na corrente de pico para o eletrodo Cu-nanografite-lignina, em presença de ácido úrico, pode ser atribuído a esta espécie, possivelmente, devido à presença de um processo catalítico e, ou facilitado, pelo substrato e, especificamente, atribuído a presença do cobre metálico. Neste sentido, é importante notar-se que para os eletrodos preparados

na ausência de cobre metálico verifica-se unicamente a presença de um processo de oxidação, sendo este processo atribuído a oxidação/redução da molécula de ácido úrico, porém, sem a mediação eletrônica do cobre.

Considerando-se as discussões anteriores e o fato específico de observar que para o eletrodo de Cu-nanografite-lignina tem um aumento significativo na intensidade de corrente de pico, evidencia-se que a inserção de cobre ao eletrodo de nanografite-lignina proporciona um material promissor na determinação de ácido úrico.

Estudos recentes apresentados na literatura evidenciam as dificuldades enfrentadas na análise de ácido úrico via eletroquímica conduzidas em amostras biológicas devido às interferências causadas por outras substâncias presentes nessa matriz, por exemplo, glicose, frutose, alguns sais, ácido ascórbico (AA) e dopamina (DA) (Khajehsharifi *et al.*, 2017). A modificação do eletrodo, na presença de cobre foi uma tentativa de minimizar tais interferências.

Quanto à interferência da glicose e frutose, em eletrodos contendo óxido e/ou hidróxido de cobre (conforme proposto na seção anterior), tem-se uma interferência significativa, pois é evidenciado na literatura diversos trabalhos que determinam estas espécies sem utilização de enzimas (Pourbeyram *et al.*, 2016; Muralikrishna *et al.*, 2015). Neste caso, no eletrodo desenvolvido a interferência da glicose e frutose não é significativa, mesmo sendo sugerido a formação do dímero $[\text{Cu}_2(\text{OH})_2]^{2+}$, pois a oxidação destas espécies ocorre em potenciais mais anódicos e envolvem a reação catalítica Cu(II)/Cu(III), e no eletrodo proposto a oxidação do cobre é Cu(0)/Cu(I)/Cu(II) (Tian *et al.*, 2014).

Em relação a interferência de sais, estes também não interferem significativamente, visto que estes não possuem picos de oxidação/redução. A maior interferência destas espécies presentes no soro humano seria no deslocamento de potenciais e/ou mudança na corrente de pico do branco do eletrodo de trabalho, pois é utilizado um pseudo-referência de prata como eletrodo de referência. Mas estas interferências são minimizadas com a utilização de voltametria cíclica e com análises por adição cumulativa de padrão para as análises das amostras, sofrendo efeitos iguais quando analisado fluidos biológicos.

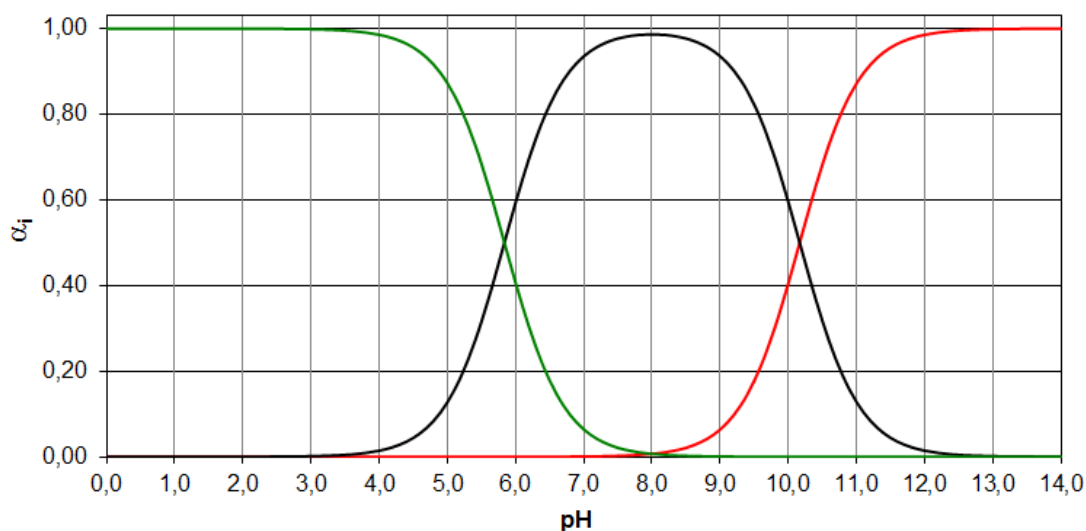
Quanto a interferência de ácido ascórbico e dopamina, ela é significativa para sistemas biológicos, visto que estas espécies possuem potenciais de

oxidação menores que do AU (Zou *et al.*, 2017). Em pH ácidos, em torno de 2,0, a dopamina teria uma interferência significativa, visto que ela poderia ser detectada seletivamente nesta região com eletrodos de cobre, sem a interferência de AU. Este fato ocorre, pois o AU neste pH precipitaria, visto que o pka_1 e pka_2 do AU é 5,7 e 10,3, respectivamente. Com isso, pode ser evidenciado que em pH menores que 5,0, a solubilidade de AU é baixa, estando protonado e sem carga. Mas como as medições são realizadas em pH fisiológico (em torno de 7,0), não tem-se interferências significativas dessa natureza (Oztekin *et al.*, 2012).

Em pH fisiológico, tanto AA como DA podem oxidar e interferir na determinação de AU, mas a utilização do eletrodo de cobre tende a minimizar essas interferências, conforme apontado no trabalho de Sakamoto *et al.* (2011). Neste trabalho, os autores propõem o emprego de cobre de modo a minimizar a interferência, específica, de ácido ascórbico, AA, na determinação de ácido úrico. Os autores apontam que a molécula de AA é oxidada a partir da espécie Cu(II) presente sobre o eletrodo de trabalho. Os íons Cu(II) são gerados por via eletroquímica durante a varredura de potenciais. O mecanismo proposto permite sugerir que os íons Cu (II) formados pela oxidação eletroquímica são reduzidos pelo AA a íons Cu(I) e estes íons Cu (I) são complexados pelo ácido úrico, formando um complexo Cu(I)-AU no eletrodo, fornecendo, então, o sinal para a determinação do AU seletivamente.

A formação de complexos entre íons cobre e ácido úrico também é sugerido por outros autores, como Meotti *et al.*, (2011) que estudam ácido úrico em doenças inflamatórias. Com isso, a formação deste complexo Cu(I)-AU minimiza a interferência das espécies AA e DA que oxidam em potenciais menores. Este complexo tende a precipitar na superfície do eletrodo, devido a sua neutralidade, visto que é formado por íons cobre I, com carga positiva (+1) e por AU com carga negativa (-1). A carga negativa de AU é evidenciada pelo diagrama de distribuição de espécies (Figura 28), que em pH próximo da neutralidade, a maior porcentagem de espécies de AU está na sua forma aniônica com a perda de um próton.

Figura 28: Diagrama de distribuição de espécies para ácido úrico; $pka_1 = 5,7$ e $pka_2 = 10,3$

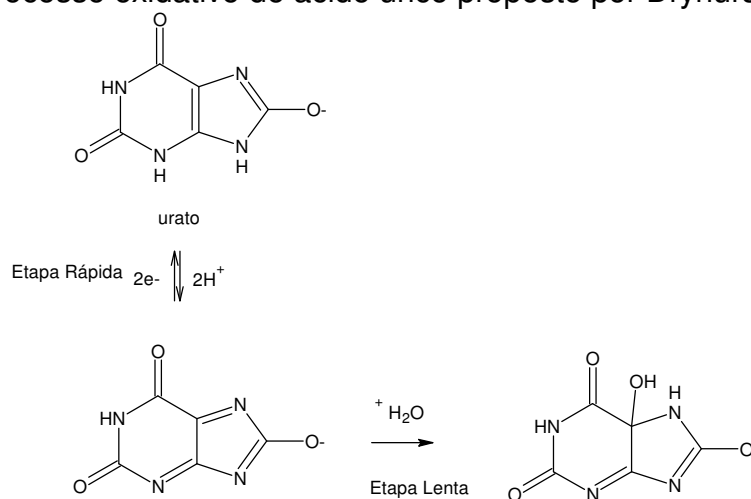


Fonte: Elaborado pelo Autor com auxílio programa CurTiPot

A formação deste complexo insolúvel na superfície do eletrodo corrobora os voltamogramas da Figura 27, visto que na presença de cobre os potenciais de oxidação de ácido úrico são maiores (devido a complexação), dificultando os processos de transferência eletrônica, mas em contrapartida, minimizando interferências significativamente.

Considerando a espécie de interesse analítico, ácido úrico, proposta no trabalho, apresenta-se na Figura 29 uma proposta para o processo de oxidação do ácido úrico a partir dos resultados de voltametria obtidos e discutidos anteriormente.

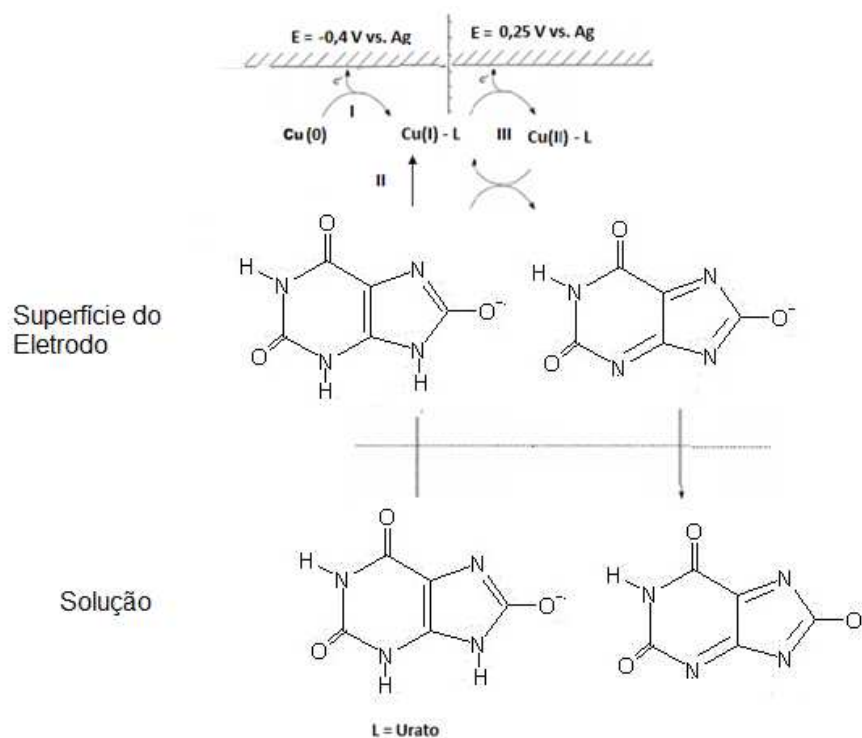
Figura 29: Processo oxidativo de ácido úrico proposto por Dryhurst



Fonte: Adaptado de Dryhurst (1972) utilizando software ChemSketch

Nesta proposta, pode-se sugerir a conversão da molécula de ácido úrico em seu sal, o urato, envolvendo várias etapas, conforme apontado por Dryhurst (1972) e modificado em função do pH estudado. De acordo com Dryhurst (1972), a primeira etapa trata-se da etapa rápida da reação, sendo a segunda etapa a etapa lenta, portanto controlando a velocidade da reação. Considerando-se o fato de que os ensaios de voltametria cíclica são realizados empregando-se altas velocidades de varredura de potenciais, propõe-se que o processo é reversível envolvendo apenas a primeira etapa da reação. O mecanismo proposto na superfície do eletrodo está representado na Figura 30.

Figura 30: Mecanismo proposto para o funcionamento do eletrodo modificado com Cu-nanografite-lignina para oxidação de ácido úrico



Fonte: Elaborado pelo Autor

Conforme apresentado na Figura 30, o mecanismo de oxidação do ácido úrico em presença de cobre na superfície do eletrodo (Cu-nanografite-lignina), segue um mecanismo de três etapas, sendo um mecanismo Eletroquímico-Químico-Eletroquímico (ECE), sendo estas:

- I- Na primeira etapa, etapa eletroquímica, ocorre a oxidação do Cu(0) a Cu(I);
- II- Na segunda etapa, etapa química, ocorre a formação do complexo Cu(I)-urato (Cu(I)-AU) na interface do eletrodo-solução;
- III- Na terceira etapa, etapa eletroquímica, ocorre a oxidação do complexo (Cu(I)-AU).

Na Figura 30 está apresentada a proposta de mecanismo considerando a presença do processo atribuído à catálise eletroquímica, conforme discutido anteriormente.

A proposta deste mecanismo está calcada no trabalho de Sakamoto *et al.* (2011) e Meotti *et al.* (2011), conforme discutido anteriormente, no qual os autores apontam para a formação do complexo entre Cu(I)-AU, minimizando as interferências dos outros compostos presentes nas amostras biológicas.

Para evidenciar tal mecanismo foi realizado um estudo de velocidade de varredura de potenciais, v_e , na presença de 5,0 mg dL⁻¹ de ácido úrico, no perfil do voltamograma e, por conseguinte, avaliar a dependência entre as intensidades de correntes de pico anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}) com a velocidade de varredura de potenciais (v_e), conforme apresentado na Figura 31.

A dependência das intensidades de corrente de pico (pico II e III) com a velocidade de varredura, ensaiadas para os picos redox, permitem sugerir que o processo de transferência de massa é controlado por adsorção (Chen *et al.*, 2006). As relações lineares obtidas a partir dos ensaios, para o eletrodo de Cu-nanografite-lignina, estão apresentadas nas Equações (45) e (46).

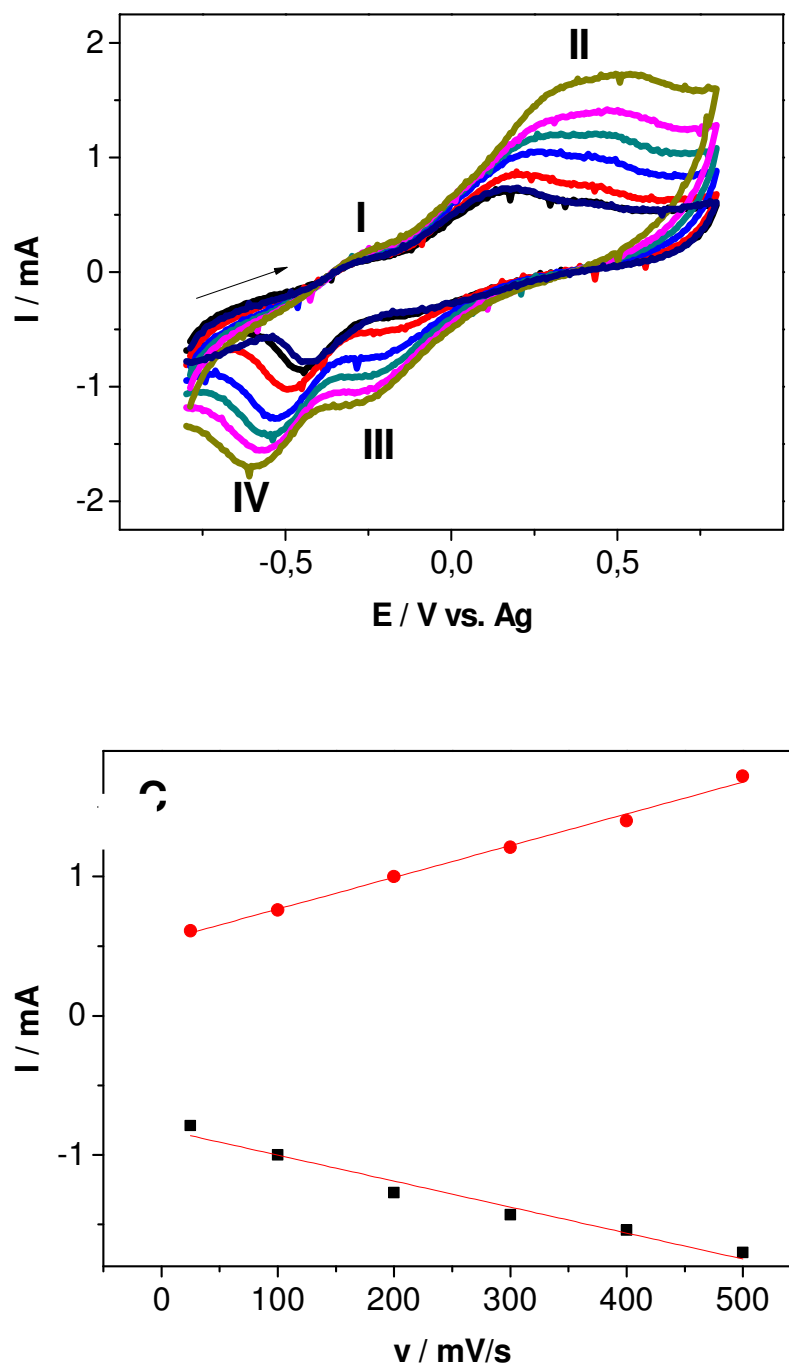
$$I_{pa}(mA) = 0,53 + 0,0023 v_e (mVs^{-1}) \text{ anódico} \quad (45)$$

$$I_{pc}(mA) = -0,81 - 0,0019 v_e (mVs^{-1}) \text{ catódico} \quad (46)$$

Os resultados dos ensaios de velocidade de varredura evidenciaram a dependência linear da intensidade de corrente com a velocidade de varredura de potenciais, permitindo, assim, sugerir-se que o processo eletroquímico é controlado por adsorção; e, portanto, as reações eletroquímicas ocorrem na superfície do eletrodo. Esta proposição permite evidenciar-se que a determinação de ácido úrico ocorre superficialmente com a formação prévia do

complexo Cu(I)-AU. Se não ocorresse a formação do complexo, possivelmente o mecanismo de transferência de massa seria controlado por difusão.

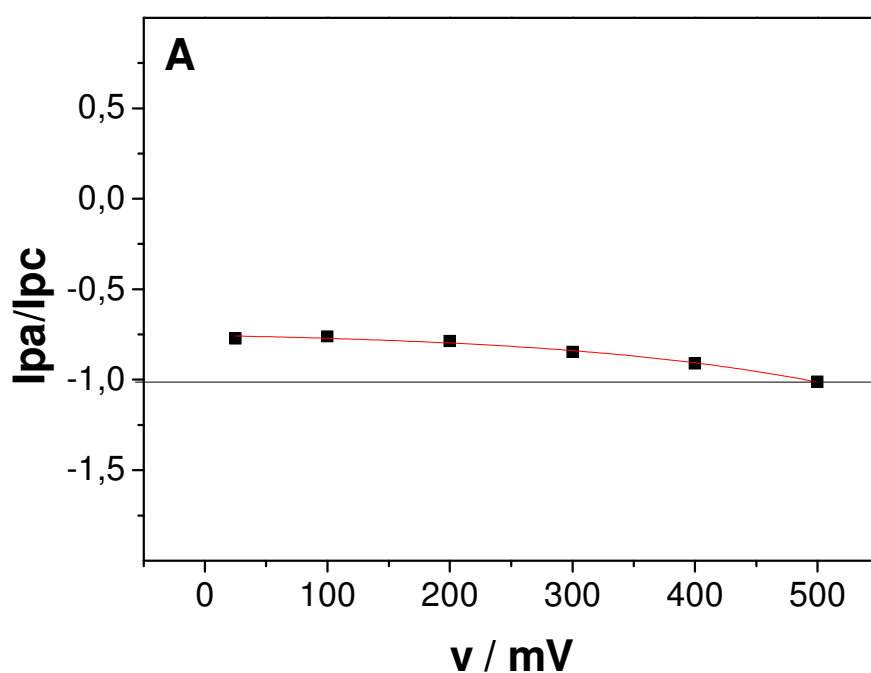
Figura 31: (A) Efeito da velocidade de varredura de potenciais sobre a resposta voltamétrica do eletrodo Cu-nanografite-lignina na presença de $5,0 \text{ mg dL}^{-1}$ de AU em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a dependência das intensidades de correntes de pico anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}) com a v_e para os picos II e III dos voltamogramas cíclicos

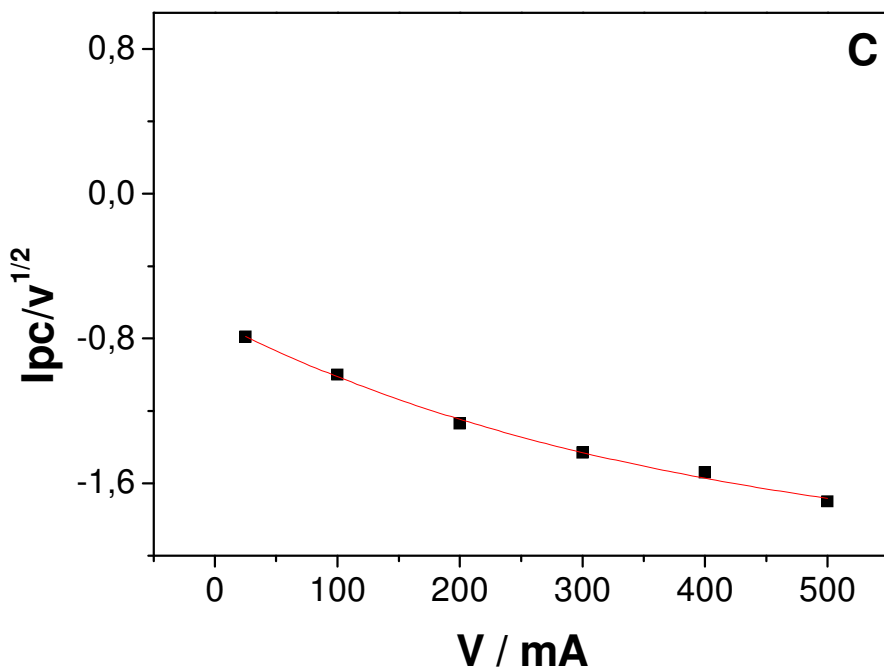
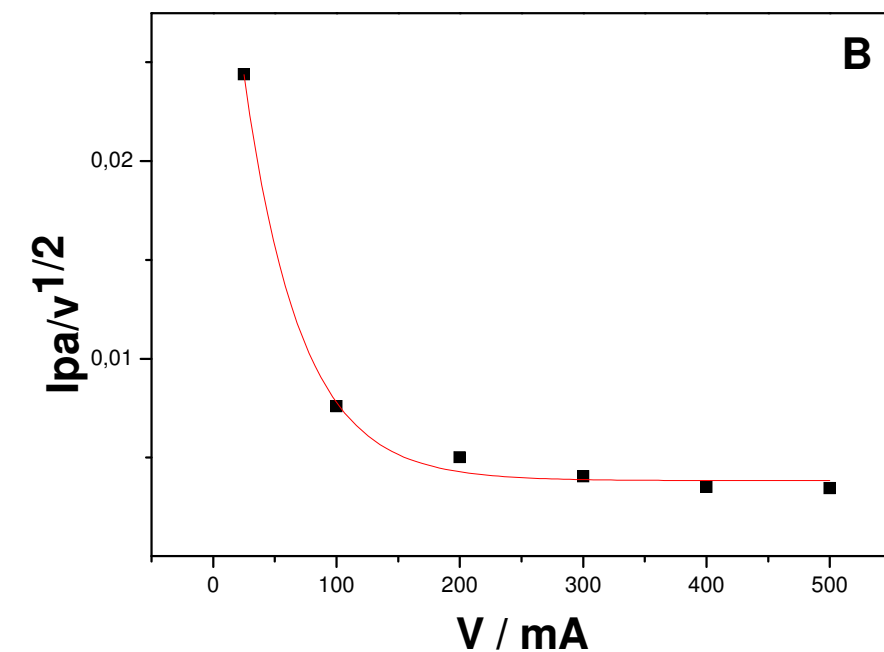


Fonte: Elaborado pelo Autor

Com o estudo de velocidade de varredura de potenciais é possível sugerir o mecanismo proposto na Figura 30, no qual tem-se 3 etapas: (a) eletroquímica; (b) química e (c) eletroquímica (ECE). O mecanismo ECE pode ser evidenciado na Figura 32, no qual tem-se a relação de correntes de pico anódico e velocidade de varredura. De acordo com Robinson *et al.* (1985) em qualquer sistema, no qual tem-se um mecanismo ECE são seguidos alguns requisitos: (a) I_{pa}/I_{pc} decresce em função da velocidade de varredura de potenciais v_e e tende a 1,0 (Figura 32A); (b) $I_{pa}/v_e^{1/2}$ e $I_{pc}/v_e^{1/2}$ decrescem com aumento da velocidade de varredura de potenciais v_e (Figuras 32B e 32C).

Figura 32: Dependência das correntes de pico anódica e catódica em função da variação de velocidade de varredura de potenciais para os picos II e III da Figura 31. (A) Dependência de I_{pa}/I_{pc} vs. v_e (B) Dependência de I_{pa} vs. v_e (C) Dependência de I_{pc} vs. v_e





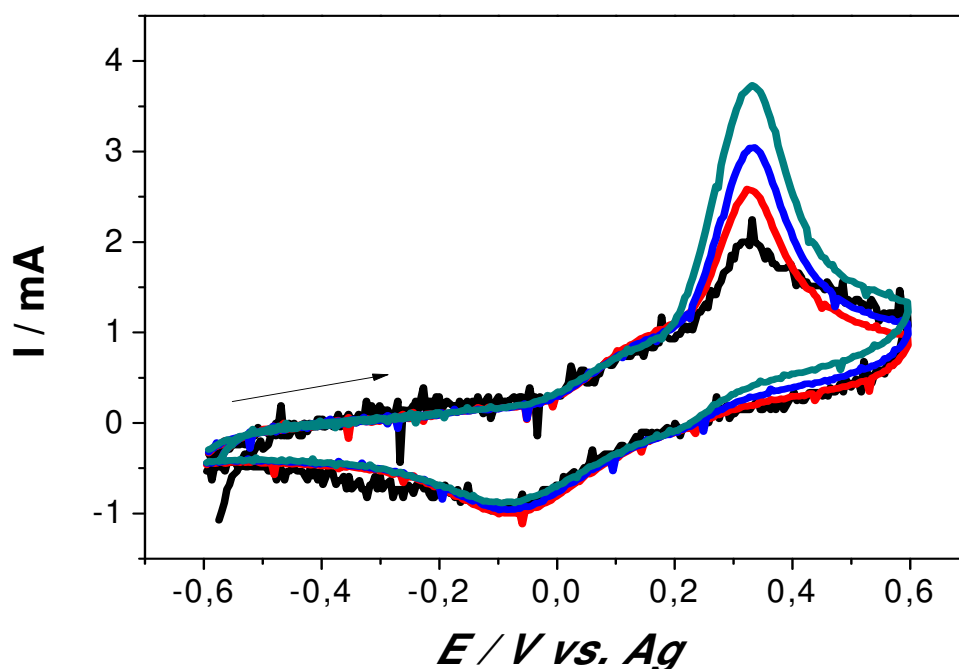
Fonte: Elaborado pelo Autor

Conforme apresentado na Figura 32, pode-se sugerir o mecanismo eletroquímico-químico-eletroquímico proposto por Robinson *et al.* (1985). Este mecanismo também pode ser evidenciado pelos voltamogramas de estudo de velocidade (Figura 31), no qual a razão dos picos anódicos e catódicos são

próximos de 1,0, evidenciando que as espécies Cu(I) são convertidas a Cu(II) e praticamente as mesmas quantidades de Cu(II) são reduzidas a Cu(I). Se não ocorresse a formação do Cu(I)-AU previamente, teria a formação do dímero $[\text{Cu}_2(\text{OH})_2]^{2+}$ ocasionando a diminuição da corrente de pico de redução de Cu(II)→Cu(I) em comparação a oxidação Cu(I)→Cu(II) conforme apresentado na seção 5.3 (Figura 24) (Baes *et al.*, 1976).

Com o objetivo de confirmar a efetiva reação de oxidação do ácido úrico ocorrendo na superfície do eletrodo foram feitas adições sucessivas de ácido úrico na célula eletroquímica conforme apresentado na Figura 33.

Figura 33: Voltamogramas cíclicos obtidos para adições sucessivas de 250 μL de ácido úrico $1,68 \text{ g L}^{-1}$ na amostra de soro humano 01 com o eletrodo de Cu-nanografite-lignina; $v_e = 300 \text{ mV s}^{-1}$



Fonte: Elaborado pelo Autor

A partir dos voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 33 pode-se confirmar que com o aumento da concentração de ácido úrico obtém-se a intensificação significativa da corrente de pico anódica em potencial próximo a 300 mV.

Com estes dados de adições cumulativas de padrão de ácido úrico foi realizado todo um tratamento metrológico adequado para a validação e estimativa da incerteza do procedimento de medição utilizando diversas abordagens, conforme será discutido nas próximas seções.

5.5 VALIDAÇÃO DA CALIBRAÇÃO DO SENSOR

Dos modelos de medição desenvolvidos para a determinação de ácido úrico em soro, o modelo *bottom-up* baseado na estimativa da incerteza de extrapolação pelo MMQ é o que envolve uma validação mais detalhada da calibração devido à necessidade do cumprimento de todos os pressupostos do MMQ. Quando se procedem a avaliações *bottom-up* baseadas na simulação de Monte Carlo de todas as variáveis de entrada ou quando se recorre a avaliações *top-down*, é apenas necessário salvaguardar que o sinal varie linearmente com a concentração do item analisado. Dessa forma, esta seção descreve a seleção e validação da faixa de calibração do sensor para a utilização do MMQ na avaliação da incerteza de extrapolação. Se a calibração for válida para este modelo da incerteza será também válida para o desenvolvimento de modelos de medição com menos requisitos para as condições de calibração.

5.5.1 Avaliação preliminar do limite de detecção

Primeiramente, para selecionar a faixa de calibração do sensor, em particular o ponto mais baixo dessa faixa, foi consultada a bibliografia sobre a faixa de concentração de ácido úrico em soro de humanos saudáveis. De acordo com a bibliografia, a faixa de concentrações de ácido úrico no soro humano varia entre homens e mulheres abrangendo valores de $2,0 \text{ mg dL}^{-1}$ a $8,0 \text{ mg dL}^{-1}$ (Ferraz *et al.*, 1988). Tendo em conta que os teores de ácido úrico podem ser ligeiramente mais baixos e mais altos que o intervalo mencionado na bibliografia, considerou-se que o eletrodo de Cu-nanografite-lignina deve apresentar uma resposta satisfatória entre $1,0 \text{ mg dL}^{-1}$ e $9,0 \text{ mg dL}^{-1}$. Foi avaliado, em particular, a viabilidade do ponto mais baixo da faixa de calibração visto que os teores mais altos podem ser facilmente quantificados em faixas mais baixas por diluição das amostras.

Desta forma, testes preliminares, em soro, foram levados a termo para produzir uma estimativa aproximada do limite de detecção, *LOD*.

Para a efetivação deste, foi necessário preparar um calibrador com uma concentração mássica de AU equivalente à concentração esperada para o LOD (i.e. com uma concentração, γ_τ , entre 1/5 e 5 vezes o LOD) e obter, pelo menos, 10 sinais do calibrador em condições de repetibilidade. A média, \bar{I}_τ , e o desvio padrão, $s_{I(\tau)}$, dos n sinais do calibrador são posteriormente calculados. O sinal do branco, I_{bk} , deve também ser conhecido ou determinado experimentalmente a partir da média, \bar{I}_{bk} , de n_{bk} medições repetidas (pelo menos 10). Se I_{bk} é determinado experimentalmente, o limite de detecção, LOD , é calculado a partir da Equação (47) (Currie, 1995).

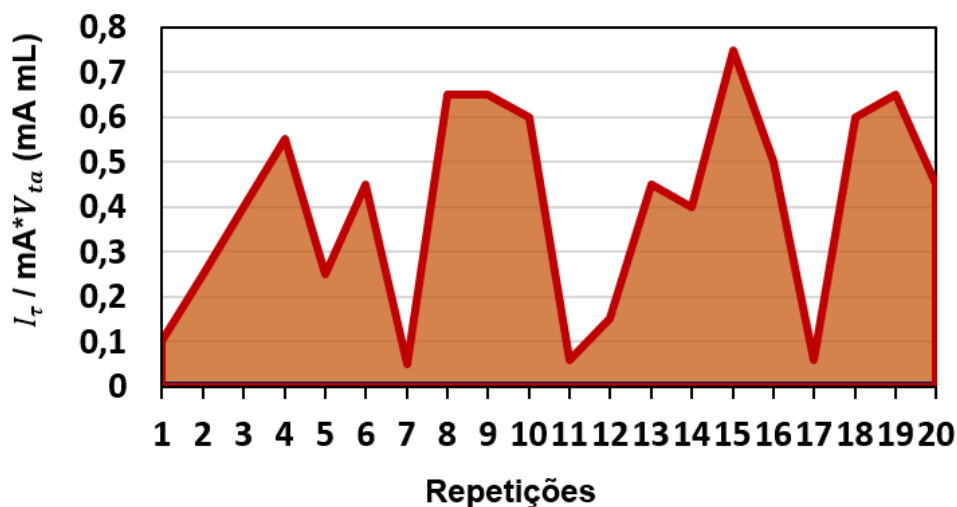
$$LOD = t_{v_{bk}}^{95\%;uni} \left(\frac{s_{I(bk)}\gamma_\tau}{\bar{I}_\tau - \bar{I}_{bk}} \right) \left(\frac{4v_{bk}}{4v_{bk}+1} \right) + t_{v_\tau}^{95\%;uni} \left(\frac{s_{I(\tau)}\gamma_\tau}{\bar{I}_\tau - \bar{I}_{bk}} \right) \left(\frac{4v_\tau}{4v_\tau+1} \right) \quad (47)$$

Para esta equação, $s_{I(bk)}$ é o desvio padrão dos n_{bk} sinais do branco, $s_{I(\tau)}$ é o desvio padrão dos n_τ sinais analíticos, v_{bk} e v_τ são os graus de liberdade de \bar{I}_{bk} e \bar{I}_τ , respectivamente, e $t_{v_{bk}}^{95\%;uni}$ e $t_{v_\tau}^{95\%;uni}$ são os valores de t de uma distribuição t -student unicaudal para um nível de confiança de 95 % e v_{bk} e v_τ graus de liberdade. A concentração γ_τ não deve ser superior a cinco vezes o LOD para garantir que a precisão a ser estimada seja equivalente à esperada junto ao LOD . O LOD deverá variar ligeiramente de dia para dia em função de variações das características do sensor.

Aplicando-se a Equação (47), aos dados experimentais obtidos, foi possível obter a primeira estimativa do LOD do procedimento de medição desenvolvido. O valor obtido para o LOD foi de 0,45 mg dL⁻¹ usando uma solução de concentração γ_τ igual a 1,04 mg dL⁻¹. A variação de sinais em função das 20 réplicas estão apresentadas na Figura 34.

Determinado o LOD , é possível observar que este se encontra abaixo do limite inferior da faixa de trabalho estudada de 1,0 mg dL⁻¹. Deve-se apontar que a razão entre a concentração de ácido úrico estudada, γ_τ , e o LOD (γ_τ/LOD) é de 2,31, o que atende a condição de que a razão $1/5 < \gamma_\tau/LOD < 5$ garantindo que a precisão estimada a γ_τ seja equivalente à estimada ao LOD .

Figura 34: Sinal I das 20 medições repetidas de uma solução de soro fisiológico contendo $1,04 \text{ mg dL}^{-1}$ de ácido úrico



Fonte: Elaborado pelo Autor

A folha de cálculo utilizada nesta seção está contida no arquivo “5.5.1 - Avaliação preliminar do limite de detecção” no material suplementar.

5.5.2 Método de adição cumulativa de padrão

5.5.2.1. Seleção de variáveis da regressão linear

Nesta seção será descrita a variante do método de adição de padrão considerando a adição cumulativa do item analisado. Será discutido, em particular, o impacto da adição volumétrica e/ou gravimétrica de padrão na diluição da concentração inicial da amostra e a forma como esta diluição deve ser compensada. O método de adição cumulativa de padrão é especialmente útil quando está disponível um volume reduzido de amostra, tendo como vantagens adicionais o menor consumo de reagentes e o menor tempo para análise. O método de adição cumulativa de padrão é de aplicação mais direta a procedimentos de medição não destrutivos.

De forma a ilustrar a relevância de se calibrar a instrumentação considerando a relação $I * v_{ta}$ vs. m_a em vez da relação I vs. γ_a , procedeu-se ao tratamento de resultados simulados da determinação de um composto hipotético numa solução com uma concentração definida e considerando diversas adições cumulativas do item analisado. A Tabela 7 apresenta os exemplos reunidos que também foram disponibilizados na planilha “5.5.2 – FC” do material suplementar “5.5.2 – Método de adição cumulativa de padrão”.

Tabela 7: Resultados simulados da quantificação do teor estimado da curva hipotética em 10 mL de uma solução amostra por adição cumulativa de volumes de 0,250 mL de uma solução estoque considerando a concentração extrapolada a partir de uma regressão ($I * v_{ta}$ vs. m_a) ou (I vs. γ_a)

Teor da solução analisada (mg L ⁻¹)	Teor da solução estoque (mg L ⁻¹)	Teor estimado da curva (I vs. γ_a)(mg L ⁻¹)	Teor estimado da curva ($I * v_{ta}$ vs. m_a) (mg L ⁻¹)
1	2	2	1,00
1	5	1,25	1,00
1	10	1,11	1,00
1	50	1,02	1,00
1	100	1,01	1,00
1	1000	1,00	1,00

Nesta simulação, fixou-se a concentração e volume de amostra em 1,0 mg L⁻¹ do item analisado e 10 mL, respectivamente, consideraram-se adições cumulativas de 0,250 mL de uma solução estoque do item analisado e um coeficiente angular de 200 L mg⁻¹ (*i.e.* um incremento de 1 mg L⁻¹ do item analisado corresponde a uma aumento de sinal de 200).

Foram estudados seis exemplos em que a concentração da solução de estoque adicionada varia de 2 mg L⁻¹ a 1000 mg L⁻¹. A Tabela 7 apresenta as estimativas da concentração da amostra considerando a extrapolação da curva ($I * v_{ta}$ vs. m_a) ou (I vs. γ_a). Quando se recorre a uma regressão ($I * v_{ta}$ vs. m_a), é extrapolada a massa do item analisado no volume de amostra que é convertido em concentração depois de dividido pelo volume de amostra.

Como pode ser observado a partir dos dados da Tabela 7, quanto menor a razão de “concentração da amostra/concentração da solução estoque”, maior o erro verificado quando se recorre a uma regressão I vs. γ_a . No exemplo que recorre a uma solução estoque com uma concentração de 2 mg L⁻¹, a regressão (I vs. γ_a) estima o dobro da concentração da amostra (1 mg L⁻¹), enquanto a regressão ($I * v_{ta}$ vs. m_a) produz uma estimativa exata do teor da amostra. Assim, o emprego da regressão mais usual (I vs. γ_a) será apenas uma aproximação válida para situações nas quais a concentração da solução estoque for cerca de 100 a 1000 vezes maior que a concentração do item analisado presente na amostra. Para tal condição, será indiferente recorrer a uma das regressões estudadas.

Quando se recorre a regressões ($I * v_{ta}$ vs. m_a), a estimativa do teor do item analisado na amostra é sempre exata independentemente do teor do item

analisado na amostra e solução estoque. Deve ser lembrado que os dados da Tabela 7 foram simulados sem considerar qualquer incerteza associada às operações analíticas e aos dados experimentais de forma a avaliar os princípios matemáticos da metodologia de calibração desenvolvida.

É possível converter a concentração, $\gamma_{a(I)}$, estimada por meio de uma regressão (I vs. γ_a) na concentração estimada pela regressão ($I * v_{ta}$ vs. m_a), γ_a , usando a Equação (48) quando, foi determinado $\gamma_{a(I)}$.

$$\gamma_a = \frac{\gamma_{a(I)}\gamma_{se}}{\gamma_{a(I)} + \gamma_{se}} \quad (48)$$

Em que γ_{se} é a concentração da solução estoque.

5.5.2.2. Aplicabilidade do método dos mínimos quadrados

Quando a curva de calibração ($I * v_{ta}$ vs. m_a) é construída usando o MMQ e o modelo de regressão é usado para estimar a incerteza de extrapolação, todos os pressupostos do MMQ devem ser cumpridos. Adicionalmente, a sensibilidade da resposta instrumental, quantificada pelo coeficiente angular da curva, observada na curva de calibração deve ser equivalente ao observável junto à ausência do item analisado (muitas vezes o sinal zero) (Rodrigues *et al.*, 2015). Caso o intervalo de calibração usado no método de adição de padrão esteja associado a uma sensibilidade menor do que a observada perto do zero de concentração, o valor da concentração da amostra será superestimado (Rodrigues *et al.*, 2015). Este pressuposto é comprovado pela linearidade de uma calibração que começa na concentração zero (referente a concentração da amostra desconhecida) e termina na maior concentração da faixa analítica avaliada.

Para avaliar os três pressupostos do MMQ (homogeneidade de variâncias, linearidade da resposta instrumental, e razão de valores de calibradores com incertezas desprezáveis considerando a precisão da resposta instrumental), o sinal instrumental foi estudado numa ampla faixa de concentrações a partir de medições repetidas obtidas em condição de repetibilidade. Os calibradores de AU foram obtidos por adições cumulativas de 250 μL de uma solução estoque de AU com uma concentração de 1,68 g L^{-1} em 5 mL de água ultrapura contendo 0,1 mol L^{-1} de KCl e pH 8. Foram realizadas 20 medições repetidas por nível de concentração estudado.

A curva de calibração foi construída pela regressão $I * v_{ta}$ vs. m_a . A homogeneidade de variâncias e a linearidade da resposta instrumental é independente da realização de ensaios em água ultrapura, soro fisiológico ou em soro humano como se confirmou nos ensaios realizados em matriz mais complexa. Os estudos realizados com soluções de AU preparadas em água ultrapura comprovaram que o sinal instrumental varia linearmente com a concentração de AU e a precisão da resposta instrumental é constante, pelo menos, até 30,0 mg L⁻¹ de ácido úrico.

As seções seguintes descrevem os princípios dos testes estatísticos realizados. Optou-se por ilustrar a aplicação dos testes à análise das amostras em vez de apresentar os ensaios preliminares realizados em água ultrapura.

5.5.3. Homocedasticidade e linearidade da resposta instrumental

A homogeneidade de variâncias de resposta instrumental foi avaliada utilizando os testes de Fisher e Levene (Bettencourt da Silva, 2016) e, após provada a homocedasticidade, a linearidade utilizando o teste de falta de ajuste ANOVA-LOF (Bettencourt da Silva, 2016). Os três testes foram realizados para um nível de confiança de 99 %. Esse nível de confiança foi escolhido para que os testes tenham uma probabilidade menor de ter falsos positivos ou negativos.

A Tabela 8 apresenta os parâmetros da regressão linear e de correlação linear estimados para avaliar a homocedasticidade e linearidade do sinal instrumental nas calibrações por adição cumulativa de padrão realizadas para a análise de soros fortificados e soros humanos. As adições de padrão foram realizadas cumprindo os pressupostos do MMQ como será discutido na seção 5.5.4.

Considerando as conclusões do teste de homocedasticidade de Fisher, todas as calibrações possuem sinais homocedásticos. No entanto, o teste de Levene não partilha desta conclusão na calibração da análise do soro SF4 (soro fortificado a 7,0 mg dL⁻¹). Tendo em conta que o soro SF4 tem um teor de ácido úrico intermediário entre os teores dos outros soros que, segundo o teste de Levene, apresentam sinais homocedásticos, considerou-se que a conclusão do teste de Levene para o soro SF4 se deve ao erro Tipo 1 (α) do teste (*i.e.* a probabilidade do teste indicar, erradamente, a heterocedasticidade). Deve-se observar que uma avaliação dos resíduos de regressão em função da

massa de AU adicionado confirmam que os sinais são homocedásticos (a análise de resíduos será discutida mais adiante nesta seção).

Tabela 8: Parâmetros de regressão e correlação linear usados para avaliar a homocedasticidade e linearidade do sinal instrumental nas calibrações por adição cumulativa de padrão usadas para a análise de soros fortificados (SF) e soros humanos (SH)

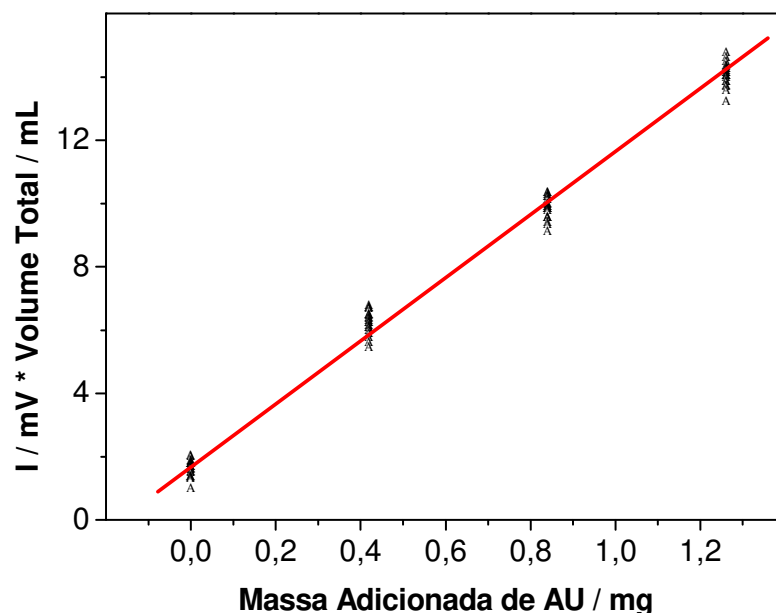
Soros	Parâmetros*					
	<i>a</i> (mA mL)	<i>b</i> (mA mL mg ⁻¹)	<i>r</i>	<i>F_p</i>	<i>W</i>	<i>F_{LOF/PE}</i>
SF1	0,54	10,24	0,997	2,67	1,07	5,06
SF2	1,43	9,43	0,998	2,79	2,18	3,80
SF3	2,41	9,51	0,997	2,20	1,47	4,10
SF4	3,35	9,56	0,995	3,33	8,48	13,58
SF5	4,46	10,0	0,995	2,85	2,30	0,70
SH1	1,87	9,75	0,996	1,99	0,76	14,36
SH2	2,94	9,93	0,997	1,84	1,02	18,91

* *a* e *b* são os coeficientes linear e angular da reta de regressão, respectivamente; *r* é o coeficiente de correlação linear de Pearson, e *F_p*, *W* e *F_{LOF/PE}* são os parâmetros considerados nos testes de Fisher, Levene e ANOVA-LOF cujos valores máximos são 3,43, 4,05 e 4,90, respectivamente.

A falta de linearidade observada em algumas curvas de calibração, considerando o critério do teste ANOVA-LOF, é atribuída a erros grosseiros de manipulação da micropipeta ou à vulnerabilidade da técnica eletroquímica à adsorção reversível e aleatória de interferências na superfície do eletrodo, causando mudanças na área eletroativa do eletrodo e conseqüentemente à variação na sensibilidade instrumental (Salama *et al.*, 2017). O elevado número de medições repetidas torna possível distinguir pequenas variações na sensibilidade do eletrodo. Este efeito parece ser possível de atenuar se as medições repetidas forem mais espaçadas no tempo (por exemplo, de 10 a 30 segundos) uma vez que não é possível ler as repetições dos vários níveis de calibração em ordem alternada.

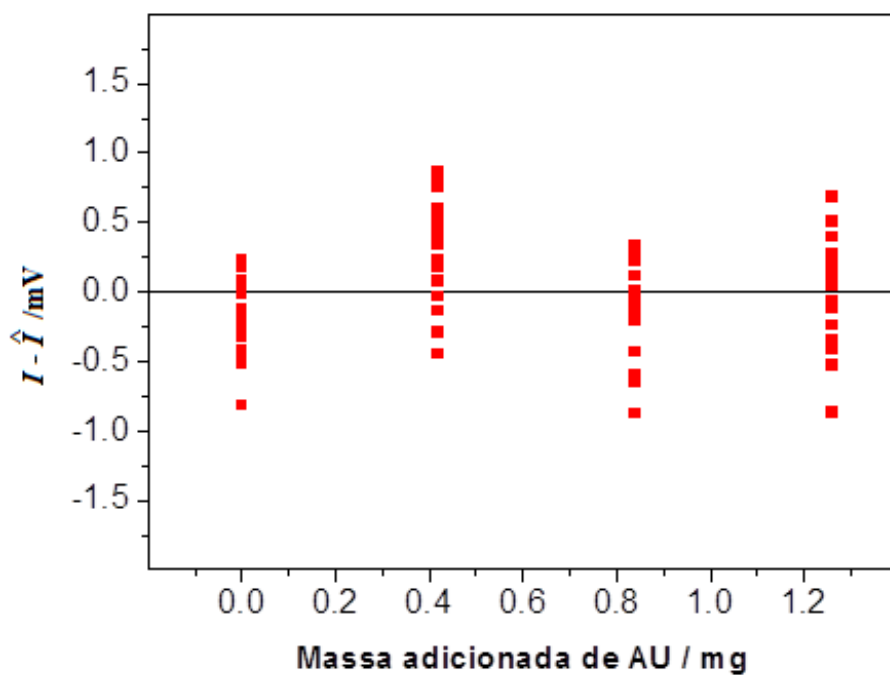
Nas Figuras 35 e 36 é mostrado a curva de calibração e o gráfico de resíduos de regressão da calibração usada na análise do soro SH1 que não passou no teste de linearidade ANOVA-LOF. As outras calibrações que não passaram na avaliação estatística apresentaram um comportamento equivalente.

Figura 35: Curva de calibração obtida para quantificação de ácido úrico na amostra de soro humano SH1 analisada usando o eletrodo de Cu-nanografite-lignina desenvolvido com $v_e = 300 \text{ mV s}^{-1}$; Adições de padrão cumulativas: três adição de 250 μL de solução estoque de $1,68 \text{ g L}^{-1}$ de ácido úrico



Fonte: Elaborado pelo Autor

Figura 36: Resíduos de regressão em função da massa de ácido úrico adicionada na sequência da calibração, por adição cumulativa de padrão, para análise do soro SH1 (curva de calibração apresentada na Figura 35)



Fonte: Elaborado pelo Autor

Conforme mostrado nas Figuras 35 e 36, os desvios à linearidade são irrelevantes e serão certamente contabilizados no desvio padrão residual da curva de calibração considerado na estimativa da incerteza de extrapolação da curva de calibração (Equação (36)). Não se espera que o eletrodo tenha uma resposta que precise ser ajustada a uma curva polinomial de terceira ordem. Na Figura 35 é apresentado o gráfico ($I * v_{ta}$ vs. m_a) que corrobora a decisão de aceitar o modelo de regressão linear neste caso, porque o teste estatístico considera como relevantes pequenos desvios dos sinais instrumentais à linha de regressão em condições de repetibilidade.

O texto acima descrito revela um bom exemplo da necessidade de garantir que o analista não sustente sua decisão exclusivamente nos testes estatísticos. Assim, o conhecimento prévio do sistema estudado deve ter um papel dominante na interpretação dos dados experimentais reunidos. As aproximações realizadas foram posteriormente avaliadas por meio da análise de soros fortificados e soros humanos cujos valores de referência são definidos pelo procedimento de preparação do soro fortificado ou pelo procedimento espectrofotométrico de referência, respectivamente.

As folhas de cálculo utilizadas nesta avaliação estão disponibilizadas no arquivo “5.5.3 - Homocedasticidade e linearidade da resposta instrumental” do material suplementar.

5.5.4. Qualidade dos calibradores

Em atendimento ao terceiro pressuposto do método dos mínimos quadrados, para o qual a incerteza da razão de valores de calibradores consecutivos (eixo das abscissas) seja insignificante em relação à precisão do sinal instrumental (eixo das ordenadas), será trabalhado o pressuposto em seus detalhes.

A incerteza associada à concentração da amostra, γ_s , depende da incerteza associada à massa do item analisado na porção analítica de amostra, m_a , e associada ao volume da porção analítica de amostra, v_a . A incerteza associada a m_a depende da incerteza da extrapolação da curva de calibração construída pelo MMQ e da incerteza de preparação dos calibradores.

De fato, se o MMQ for usado para estimar a incerteza de extrapolação, os calibradores devem ser preparados de forma que a razão do valor de

calibradores consecutivos (*i.e.* a massa do item analisado adicionado) esteja associada a uma incerteza insignificante em relação à precisão do sinal instrumental (*i.e.* multiplicação do sinal pelo volume total do calibrador). Se esta suposição for válida, o modelo de regressão pode ser usado para estimar a incerteza de extrapolação da curva que estima m_a .

Para o método de adição cumulativa de padrão desenvolvido, a qualidade dos calibradores é adequada para regressões pelo MMQ se tanto a diluição da porção de amostra como a determinação da massa do item analisado adicionada cumprirem requisitos referenciados à precisão da multiplicação do sinal pelo volume total de calibrador estimado.

Se $R_{vI_{i,j}}$ corresponde à razão das multiplicações do volume do calibrador com o sinal instrumental observado para os calibradores i e j (Equação (49)), $R_{d_{i,j}}$ é a razão dos fatores de diluição da porção de amostra nos calibradores i e j (Equação (50)) e $R_{a_{i,j}}$ é a razão da massa do item analisado adicionado nos calibradores i e j (Equação (51)), as respectivas incertezas-padrão ($u(R_{vI_{i,j}})$, $u(R_{d_{i,j}})$ e $u(R_{a_{i,j}})$) devem satisfazer as condições apresentadas nas Equações (52) e (53).

$$R_{vI_{i,j}} = \frac{v_i \cdot I_i}{v_j \cdot I_j} \quad (49)$$

No qual v_i e v_j são os volumes totais dos calibradores i e j , e I_i e I_j os sinais instrumentais dos calibradores i e j , respectivamente.

$$R_{d_{i,j}} = \frac{d_i}{d_j} \quad (50)$$

No qual d_i e d_j são os fatores de diluição da porção de amostra nos níveis de calibração i e j , respectivamente.

$$R_{a_{i,j}} = \frac{a_i}{a_j} \quad (51)$$

No qual a_i e a_j são as massas do item analisado adicionadas nos calibradores i e j , respectivamente.

$$\left(\frac{u(R_{d_{i,j}})}{R_{d_{i,j}}} \right) \leq \left(\frac{u(R_{vI_{i,j}})}{R_{vI_{i,j}}} \right) / 5 \quad (52)$$

$$\left(\frac{u(R_{a_{i,j}})}{R_{a_{i,j}}} \right) \leq \left(\frac{u(R_{v_{l_{i,j}}})}{R_{v_{l_{i,j}}}} \right) / 5 \quad (53)$$

Se estas condições forem válidas, a incerteza padrão, $u(\gamma_S)$, associada a γ_S pode ser estimada pela Equação (37) (seção 4.8.1). O fator 5 é usado porque uma componente de incerteza é desprezável se for menor que um quinto da componente majoritária (Eurachem/CITAC, 2012).

Os valores de $u(R_{v_{l_{i,j}}})$, $u(R_{d_{i,j}})$ e $u(R_{a_{i,j}})$ são estimados por meio da combinação das incertezas das medições de massa e volume, e da repetibilidade do sinal instrumental envolvido na estimativa de $R_{v_{l_{i,j}}}$, $R_{d_{i,j}}$ e $R_{a_{i,j}}$, respectivamente. A incerteza das medições de volume e massa foi estimada como proposto no guia Eurachem/CITAC para a quantificação da incerteza de medição (Eurachem/CITAC, 2012).

Assim, a adequação da metodologia de preparação dos calibradores foi avaliada comparando a incerteza padrão relativa, $u'(R_{v_{l_{i,j}}})$, de $R_{v_{l_{i,j}}}$ ($u'(R_{v_{l_{i,j}}}) = u(R_{v_{l_{i,j}}})/R_{v_{l_{i,j}}}$) com a incerteza padrão relativa, $u'(R_{d_{i,j}})$, de $R_{d_{i,j}}$ ($u'(R_{d_{i,j}}) = u(R_{d_{i,j}})/R_{d_{i,j}}$) e com a incerteza padrão relativa, $u'(R_{a_{i,j}})$, de $R_{a_{i,j}}$ ($u'(R_{a_{i,j}}) = u(R_{a_{i,j}})/R_{a_{i,j}}$), para pares de calibradores consecutivos, de acordo com os critérios apresentados nas Equações (52) e (53).

A Tabela 9 apresenta os valores de $R_{v_{l_{i,j}}}$, $R_{d_{i,j}}$ e $R_{a_{i,j}}$ e suas respectivas incertezas-padrão relativas usadas para avaliar a qualidade dos calibradores nas calibrações realizadas. O termo v_S representa a alíquota volumétrica da amostra, e os termos v_{a1} , v_{a2} , v_{a3} e v_{a4} representam os volumes sucessivos adicionados de solução estoque.

A $u'(R_{v_{l_{i,j}}})$ foi estimada combinando o desvio padrão da repetibilidade do sinal instrumental com a incerteza padrão associada ao volume total dos calibradores usando o método de Kragten para a combinação de componentes de incerteza. As $u'(R_{d_{i,j}})$ e $u'(R_{a_{i,j}})$ foram também estimadas por meio da combinação dos componentes de incerteza utilizando o método de Kragten, porque os fatores de diluição e as massas adicionadas do item analisado têm variáveis que se repetem na sua expressão matemática e com isso impedem a aplicação dos casos particulares da lei da propagação de incerteza.

Tabela 9: Parâmetros considerados na avaliação da qualidade dos calibradores para as regressões pelo MMQ realizadas nas calibrações por adição cumulativa de padrão

Nível Calib.	$R_{d_{i,j}}$	$u'(R_{d_{i,j}})$ (%)	$u'(R_{v_{l_{i,j}}})/5$ (%)							
			Soro Fortificado					Soro Humano		
			SF1	SF2	SF3	SF4	SF5	SH1	SH2	
1§	$\frac{v_s}{v_s + v_{a1}} = 0,952$	0,0731	11,4	3,48	2,55	2,04	1,86	3,28	2,22	
2	$\frac{v_s + v_{a1}}{v_s + v_{a1} + v_{a2}} = 0,955$	0,0689	1,69	1,57	1,48	1,24	1,47	1,37	1,25	
3	$\frac{v_s + v_{a1} + v_{a2}}{v_s + v_{a1} + v_{a2} + v_{a3}} = 0,957$	0,0652	1,12	1,00	0,83	0,78	1,01	0,87	0,75	
4	$\frac{v_s + v_{a1} + v_{a2} + v_{a3}}{v_s + v_{a1} + v_{a2} + v_{a3} + v_{a4}} = 0,958$	0,0619	0,77	0,78	-	-	-	-	0,55	
	$R_{a_{i,j}}$	$u'(R_{a_{i,j}})$ (%)								
2	$\frac{v_{a1}(v_s + v_{a1} + v_{a2})}{(v_s + v_{a1})(v_{a1} + v_{a2})} = 0,524$	0,889	11,4	3,48	2,55	2,04	1,86	3,28	2,22	
3	$\frac{(v_{a1} + v_{a2})(v_s + v_{a1} + v_{a2} + v_{a3})}{(v_s + v_{a1} + v_{a2})(v_{a1} + v_{a2} + v_{a3})} = 0,697$	0,490	1,69	1,57	1,48	1,24	1,47	1,37	1,25	
4	$\frac{(v_{a1} + v_{a2} + v_{a3})(v_s + v_{a1} + v_{a2} + v_{a3} + v_{a4})}{(v_s + v_{a1} + v_{a2} + v_{a3})(v_{a1} + v_{a2} + v_{a3} + v_{a4})} = 0,782$	0,332	1,12	1,00	-	-	-	-	0,75	

§ - Sem adição de padrão;

 v_s é a alíquota volumétrica da amostra (5 mL) e, v_{a1} , v_{a2} , v_{a3} e v_{a4} são os volumes adicionados sucessivos da solução de estoque (i.e. 250 µL).

Em alternativa, poderia ter-se usado a fórmula geral da LPI que envolve o cálculo de diversas derivadas parciais ou as simulações de Monte Carlo. Estas alternativas foram utilizadas e está contida na folha de cálculo desta seção (“5.5.4 - Qualidade dos calibradores”) e pode-se observar resultados similares com ambas abordagens. O cálculo utilizando as derivadas parciais para este tipo de expressão envolve expressões matemáticas complexas, e o MCM envolve algoritmos computacionais complexos, tendo maior facilidade de aplicação o método de Kragten para estes casos.

Como pode ser visto a partir da Tabela 9, os valores de $u'(R_{d_{i,j}})$ e $u'(R_{a_{i,j}})$ são inferiores a um quinto do $u'(R_{v_{i,j}})$ demonstrando que a metodologia proposta para a preparação dos calibradores é adequada à aplicação do modelo de regressão dos mínimos quadrados.

As folhas de cálculo utilizadas para esta seção estão contidas no arquivo “5.5.4 - Qualidade dos calibradores” do material suplementar.

5.5.5. Limiares analíticos

Quando os resultados das medições são reportados, de forma completa com incerteza da medição, os conceitos de limites de deteção e quantificação deixam de fazer falta. Eventualmente, o conceito de limite de deteção será útil para comparar o desempenho de duas alternativas analíticas para o mesmo fim, mas depois de selecionada a metodologia analítica, este conceito deixa de ser especialmente útil.

Com o intuito de caracterizar as capacidades analíticas do eletrodo de trabalho desenvolvido, utilizaram-se os dados de desempenho das calibrações realizadas para estimar o limite de deteção de ácido úrico em soros pela instrumentação desenvolvida.

Os valores estimados para os limites de deteção e quantificação com base na calibração realizada para a análise do soro humano SH1 são $0,30 \text{ mg dL}^{-1}$ e $0,92 \text{ mg dL}^{-1}$, respectivamente. Sendo que o valor estimado da função g (Equação (54)), $0,00036$, é menor que $0,05$ provando a validade das Equações usadas nas determinações dos limiares analíticos. Os valores de LOD e LOQ estão em acordo com os limites desejados para quantificação em amostras de soro humano. O valor determinado de LOD ($0,30 \text{ mg dL}^{-1}$; Equação (28)) está

próximo ao valor de LOD inicial ($0,45 \text{ mg dL}^{-1}$; Equação (47)) determinado na avaliação preliminar deste limiar analítico. Os LOD estimados pelas outras curvas de calibração realizadas são equivalentes aos estimados pela análise do soro SH1.

Os cálculos realizados para as determinações de LOD e LOQ por meio das Equações (28) e (29) estão disponíveis na planilha “5.5.5 – Limiares analíticos” do material suplementar.

5.6 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE SORO

5.6.1. Avaliação *bottom-up* da incerteza baseada no método dos mínimos quadrados

As amostras de soro fisiológico e humano foram analisadas conforme descrito nas seções 4.6 e 4.7, sendo analisadas cinco amostras fortificadas de soro fisiológico e duas de soro humano.

Para as amostras de soro fisiológico, uma vez que a mesma solução estoque foi empregada para o preparo das amostras fortificadas de soro e nas adições de padrão da calibração, a sua incerteza não foi considerada na comparação dos valores estimados com os valores de referência. Este procedimento permitiu um controle mais rigoroso das outras componentes de incerteza, uma vez que não são mascaradas pela incerteza da concentração da solução estoque.

A incerteza associada aos resultados do procedimento espectrofotométrico enzimático foi determinada pela abordagem *top-down* baseada em dados interlaboratoriais que utilizam o desvio padrão da reprodutibilidade das medições (Equação (13)) para estimar a incerteza padrão dos resultados (Bai *et al.*, 2009). A reprodutibilidade da medida foi fornecida pelo fabricante do teste (“kit” fornecido pela empresa Analisa[®]). A incerteza padrão foi expandida para aproximadamente 95 % usando um fator de abrangência de 2, uma vez que a reprodutibilidade foi estimada com um grande número de graus de liberdade.

Alternativamente ao procedimento espectrofotométrico de referência, o procedimento eletroquímico desenvolvido foi estudado e a sua incerteza determinada considerando as fontes de incerteza levantadas na seção 4.8.1.

As componentes de incerteza contabilizadas são a concentração de AU da solução estoque, o volume da porção de amostra analisada, a diluição da porção de amostra por adição cumulativa de padrão e a extrapolação da curva de calibração (ver diagrama de Ishikawa na Figura 10). Estas componentes são quantificadas pelas incertezas padrão relativas, $u'(a)$, $u'(v_S)$, $u'(d_1)$ e u_{ext} , respectivamente.

A concentração da solução estoque, γ_{se} , foi estimada tomando a pureza do ácido úrico, p_a , (*i.e.* 99 %), a massa de ácido úrico pesado, m , (*i.e.* 0,0168 g) e o volume da solução estoque de AU (*i.e.* 10 mL), v_{se} , pela Equação (54).

$$\gamma_{se} = \frac{m \cdot p_a}{v_{se}} \quad (54)$$

A incerteza padrão relativa associada a γ_{se} , que corresponde a $u'(a)$, que foi estimada combinando as incertezas padrão das variáveis da Equação (54) e pela Equação (55).

$$u_{(a)} = \sqrt{\left(\frac{u_m}{m}\right)^2 + \left(\frac{u_{pa}}{p_a}\right)^2 + \left(\frac{u_{vse}}{v_{se}}\right)^2} \quad (55)$$

No qual u_m , u_{pa} e u_{vse} são as incertezas padrão associada à massa de ácido úrico, pureza de ácido úrico e volume da solução estoque de ácido úrico, respectivamente. A $u'(a)$ é 4,4 % e correspondem à incerteza padrão relativa da concentração de ácido úrico da solução estoque de 1,68 g L⁻¹, usada para realizar as adições cumulativas de padrão, cujas razões de massa do item analisado adicionadas têm incerteza desprezável, considerando a incerteza associada à multiplicação do sinal pelo volume total.

A incerteza padrão relativa do volume da amostra, $u'(v_S)$, foi estimada pelas Equações (32), (33) e (34) (seção 4.8.1). O valor de u_V^{cal} é 0,0086 mL, sendo calculado pela tolerância da pipeta de 5 mL (*i.e.* 0,015 mL) dividido por $\sqrt{3}$, pois assume-se que a tolerância tem uma distribuição retangular. O valor de u_V^{rep} é 0,043 mL, correspondente ao desvio padrão de dez pesagens consecutivas do volume de água dispensado pela pipeta. O valor de u_V^{temp} é 0,00021 mL, estimado pela multiplicação do coeficiente de expansão térmica da água ($\delta = 0,0000207 \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$), variação de temperatura considerada (*i.e.* $\pm 4 \text{ } ^\circ\text{C}$) e volume da amostra, v_S , (5 mL), dividido por $\sqrt{3}$, pois assume-se que a variação da temperatura tem distribuição retangular. Com isso o valor de $u'(v_S)$ é igual a 0,87 % ($u'(v_S) = u(v_S)/v_S$).

A incerteza padrão relativa da diluição cumulativa da porção analítica da amostra, $u'(d_1)$, foi calculada pelas Equações (49) a (53), no qual se considerou o primeiro fator de diluição, representado pela Equação (56), pois este está associado à maior incerteza padrão relativa.

$$d_1 = \frac{v_s}{v_s + v_{a1}} \quad (56)$$

No qual d_1 é o fator de diluição, v_s o volume da amostra e v_{a1} o volume da primeira adição de padrão. Como o cálculo de d_1 envolve uma soma e uma divisão e a variável v_s surge duas vezes na expressão, foi utilizado o método de Kragten para estimar a sua incerteza padrão relativa, $u'(d_1)$, de 0,073 % ($u'(d_1) = u'(d_1)/R(d_1)$).

A incerteza da extrapolação da curva de calibração, u_{ext} , foi estimada pela Equação (36), sendo seus valores diferentes para cada amostra analisada, devido às diferentes concentrações das amostras. A Tabela 10 apresenta os valores de u_{ext} estimados.

Tabela 10: Componentes de incerteza e incerteza expandida da determinação eletroquímica de AU em soro fisiológico fortificado e soro humano usando a abordagem *bottom-up* baseada no modelo de regressão dos mínimos quadrados

Amostra	Teor AU (mg dL ⁻¹)	$u'(a)$	$u'(v_s)$	$u'(d_1)$ (x10 ⁻⁴)	u_{ext} (mg dL ⁻¹)	$u(\gamma_S)$ (mg dL ⁻¹)	$U(\gamma_S)$ (mg dL ⁻¹)
SF1	1,03	0,044	0,0087	7,3	0,0069	0,14	0,27
SF2	3,03	0,044	0,0087	7,3	0,0079	0,16	0,32
SF3	5,06	0,044	0,0087	7,3	0,0093	0,19	0,38
SF4	7,01	0,044	0,0087	7,3	0,012	0,25	0,49
SF5	8,93	0,044	0,0087	7,3	0,013	0,28	0,56
SH1	3,83	0,044	0,0087	7,3	0,0091	0,25	0,50
SH2	5,92	0,044	0,0087	7,3	0,0092	0,32	0,64

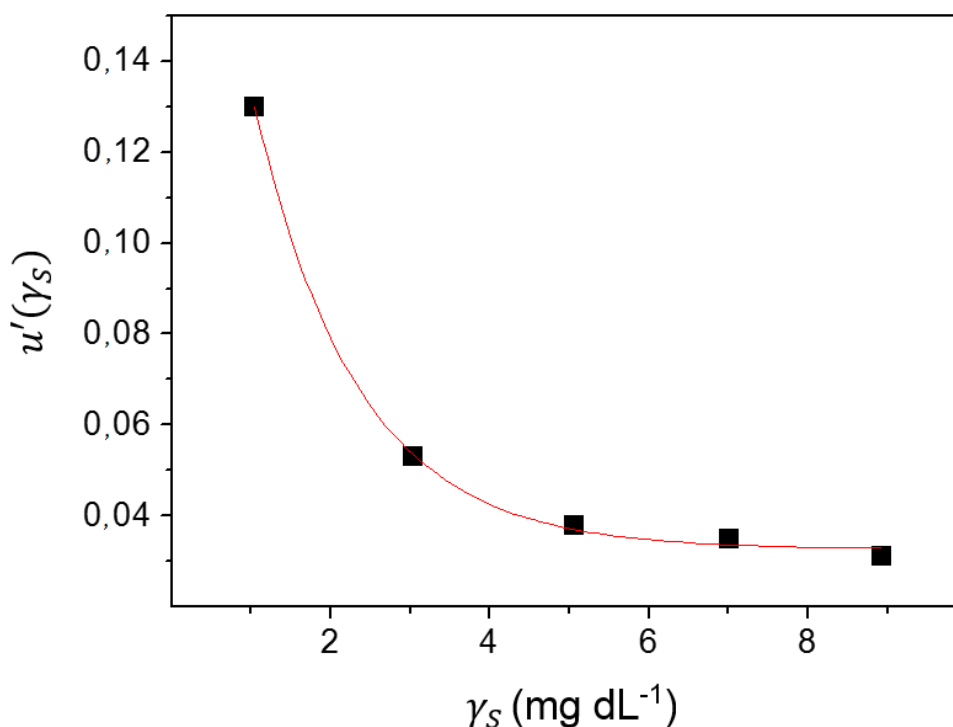
A incerteza padrão combinada da concentração estimada de ácido úrico nos soros, $u(\gamma_S)$ calculada pela Equação (37), está apresentada na Tabela 10. A partir deste valor de incerteza padrão foi calculada a incerteza expandida, $U(\gamma_S)$, por multiplicação de $u(\gamma_S)$ pelo t de student para um nível de confiança de 95 % e $(n-2)$ graus de liberdade. A Tabela 10 reúne os valores de todas as componentes de incerteza e da incerteza expandida.

As incertezas expandidas das determinações de AU nos soros fortificados não são superiores ao valor alvo de $0,56 \text{ mg dL}^{-1}$ (seção 2.4.3), comprovando que as medições eletroquímicas são adequadas para o uso pretendido.

No caso da análise do soro humano do primeiro paciente, SH1, a incerteza expandida é menor que o valor alvo. No entanto, o resultado da medição eletroquímica do soro do segundo paciente, SH2, a incerteza expandida é de $0,64 \text{ mg dL}^{-1}$, ligeiramente acima do valor alvo (*i.e.* 14 % acima). De acordo com o guia Eurachem/CITAC para definir e utilizar a incerteza-alvo, quando esta não está regulamentada, pode ser considerada uma tolerância de 20 %-30 % na comparação da incerteza estimada com a incerteza-alvo (Eurachem/CITAC, 2012). Portanto, pode-se concluir que todos os resultados reportados têm incertezas adequadamente baixas considerando o uso pretendido das medições.

Com as incertezas dos padrão $u(\gamma_S)$ reunidas da análise de soros fortificados, foi representada a variação da incerteza combinada relativa $u'(\gamma_S)$ ($u'(\gamma_S) = u(\gamma_S)/\gamma_S$) com o teor de ácido úrico no soro (Figura 37).

Figura 37: Variação da Incerteza padrão relativa da medição, $u'(\gamma_S)$, com a concentração estimada de ácido úrico no soro, γ_S .

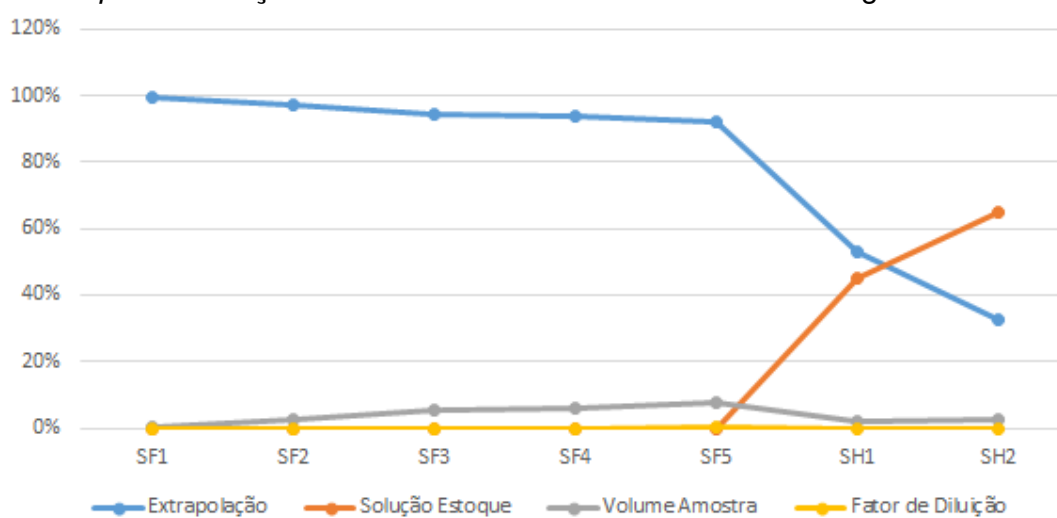


Fonte: Elaborado pelo Autor

Como se pode observar, com o aumento da concentração de AU, diminui a incerteza relativa de γ_S , tendendo esta a ficar constante após cerca de 5 mg dL⁻¹. Para a concentração de 1,0 mg dL⁻¹, a incerteza relativa é elevada, porque a quantificação está próxima ao *LOQ* (0,92 mg dL⁻¹).

Com os dados da Tabela 10, estimou-se a contribuição percentual de cada uma das componentes de incerteza ($u(a)$, $u(v_S)$, $u(d_1)$ e u_{ext}) para a incerteza padrão, $u(\gamma_S)$ conforme apresentado na Figura 38.

Figura 38: Contribuição percentual de cada componente de incerteza para a incerteza da concentração estimada de ácido úrico no soro, usando a abordagem *bottom-up* de avaliação da incerteza baseada no modelo de regressão



Fonte: Elaborado pelo Autor

Com a Figura 38 pode-se observar que a maior contribuição para os soros fortificados é a incerteza que advém da extrapolação da curva de calibração. Esta incerteza pode ser reduzida aplicando-se outras técnicas eletroquímicas na determinação de AU, tais como voltametria de pulso diferencial e/ou voltametria de onda quadrada, pois estas tendem a apresentar picos maiores e mais bem definidos, aumentando a sensibilidade e espaçamento dos sinais. A componente de incerteza menos relevante, é o fator de diluição da amostra por adição de volume da solução estoque, que neste caso pode-se considerar desprezável, sendo comprovado na seção de qualidade dos calibradores (seção 5.5.4.).

A Figura 38 é muito útil, pois a partir das contribuições das diferentes componentes de incertezas, expressas em porcentagem, é possível definir-se estratégias para diminuição da incerteza.

Como observado nesta seção, a avaliação da incerteza da medição baseou-se em medições obtidas em condições de repetibilidade, visto que a calibração do sensor é realizada nestas condições.

As folhas de cálculo utilizadas nesta seção, estão disponíveis no arquivo “5.6 – Análise das amostras de soro” no material suplementar.

5.6.2. Avaliação *bottom-up* baseada em simulações Monte Carlo

Na seção 5.6.1 é apresentada uma abordagem *bottom-up* de avaliação da incerteza da medição que envolve a estimativa da incerteza de extrapolação da curva de calibração recorrendo a um modelo do método dos mínimos quadrados para esta componente da incerteza. No entanto, esta abordagem só é aplicável se todos os pressupostos do MMQ forem cumpridos, em particular o associado à qualidade dos calibradores. Caso os calibradores não sejam devidamente preparados, a incerteza da medição é subestimada por esta abordagem. Com valores subestimados de incerteza, aumenta a chance do intervalo de valores reportado como resultado da medição não incluir o valor “verdadeiro” do mensurando.

É possível fazer estimativas fiáveis da incerteza destas medições, mesmo quando os calibradores não têm os níveis de qualidade requeridos pelo MMQ, se forem utilizados métodos de aleatorização de todas as variáveis de medição por meio de simulações de Monte Carlo. Neste caso, é utilizada uma ferramenta computacional para gerar valores das variáveis, considerando a distribuição conhecida ou esperada dessas variáveis. É importante que os modelos computacionais desenvolvidos tenham em conta a relação entre as variáveis que podem condicionar a correlação dos seus valores.

Para comprovar a não aplicabilidade da abordagem *bottom-up* baseada no MMQ, b-MMQ, quando os calibradores não cumprem com os requisitos de qualidade do MMQ, e provar a capacidade da abordagem *bottom-up* baseada em simulações de Monte Carlo, b-MCM, para estimar a incerteza independentemente da qualidade dos calibradores, procedeu-se ao seguinte experimento.

A célula eletroquímica desenvolvida foi colocada no prato de uma balança analítica com vista a permitir a medição da massa das soluções adicionadas à

célula (Figura 11, seção 4.8.2). Uma porção de amostra de 5 mL de soro fortificado, a $3,0 \text{ mg dL}^{-1}$ de ácido úrico, foi colocado na célula e procedeu-se a adições cumulativas de $100 \mu\text{L}$ de uma solução de estoque de $1,68 \text{ g L}^{-1}$ recorrendo a uma pipeta graduada de $100 \mu\text{L}$. Posteriormente, procedeu-se à construção das curvas de calibração ($I * v_{ta}$ vs. m_a) em que os volumes considerados foram medidos por peso (*i.e.* usando a massa dada pelo leitor digital da balança) ou considerando o indicado pelo material volumétrico usado. Tendo em conta que a densidade do soro e da solução de estoque são equivalentes, não é necessário considerar a densidade das soluções para converter valores de massa em volume exato.

Em ambos os casos, (*i.e.* considerando volumes controlados gravimetricamente ou volumetricamente) foi avaliada a qualidade dos calibradores usando as condições apresentadas nas Equações (52) e (53). Independentemente das conclusões sobre a qualidade dos calibradores, procedeu-se à avaliação da incerteza da medição pelas duas abordagens *bottom-up* (*i.e.* b-MMQ e b-MCM). A qualidade das quatro estimativas do teor de ácido úrico no soro fortificado foi avaliada pelo estudo da compatibilidade metrológica entre o valor estimado e o valor de referência (Equação (38) presente na seção 4.8.5).

No que respeita à qualidade dos calibradores, constatou-se que quando o volume é medido volumetricamente (*i.e.* recorrendo à graduação das pipetas), o valor de $u(R_{a_{i,j}})/R_{a_{i,j}}$ é superior a um quinto de $u(R_{v_{l_{i,j}}})/R_{v_{l_{i,j}}}$ indicando que a utilização da pipeta de vidro para medição das adições cumulativas de solução estoque produz calibradores que não cumprem os requisitos do MMQ. No entanto, quando o volume despendido pelas pipetas é medido gravimetricamente, os calibradores produzidos cumprem os requisitos de qualidade dos MMQ. Esta diferença nos resultados se deve ao fato da incerteza da pesagem com a balança analítica ser inferior à incerteza do volume medido com as pipetas usadas.

A incerteza associada à aceitação do certificado de calibração da balança, quantificada considerando o erro máximo admissível, EMA , observado na calibração, assume que o intervalo ($m \pm EMA$) tem distribuição retangular.

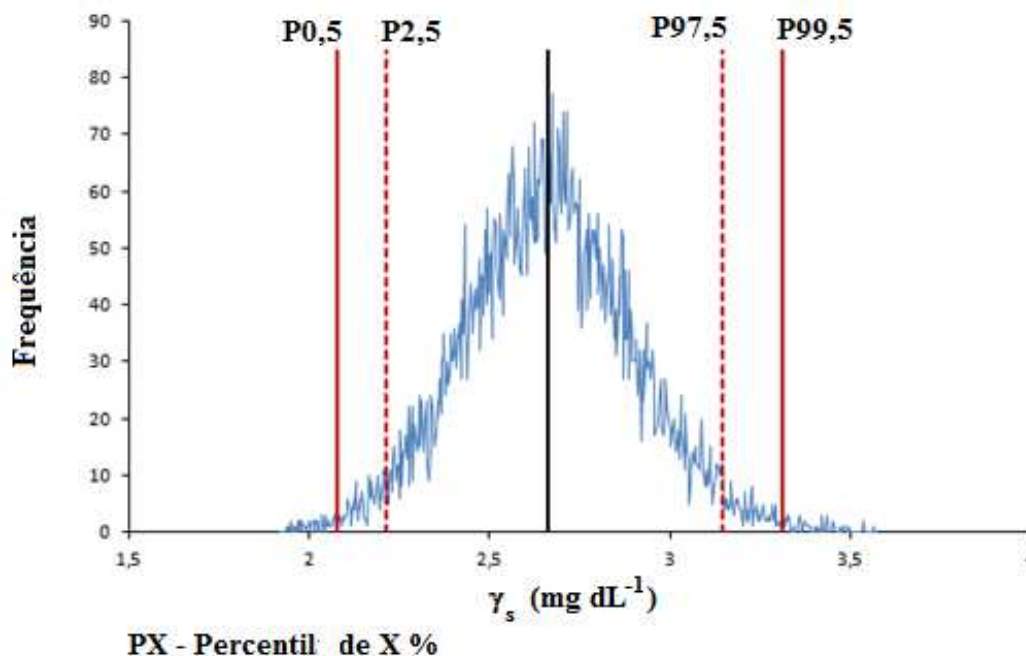
A componente da repetibilidade da pesagem estimada pelo desvio padrão de 20 pesagens sucessivas, s_{bal}^{rep} , é tratada pela geração aleatória de valores no intervalo $(m \pm t * s_{bal}^{rep})$ em que t é t de student para 19 graus de liberdade. As Equações (57) e (58) apresentam as funções de MS-Excel usadas para simular a componente associada ao *EMA* e à repetibilidade da pesagem, respectivamente.

$$m + 2 * EMA(ALEATORIO() - 0,5) \quad (57)$$

$$m + s_{bal}^{rep} * INV.T(ALEATORIO(); 19) \quad (58)$$

Neste estudo, cada variável foi gerada 10.000 vezes garantido distribuições estáveis da estimativa do mensurado. A partir da simulação de todas as variáveis e obtenção de estimativas simuladas do mensurando, pode-se determinar a distribuição da estimativa do mensurando (Figura 39).

Figura 39: Distribuição de frequências de valores simulados da determinação eletroquímica do teor de ácido úrico num soro fortificado a $3,0 \text{ mg dL}^{-1}$, em que os volumes medidos foram controlados volumetricamente.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Os percentis 2,5 e 97,5, e 0,5 e 99,5⁷ da distribuição do mensurando delimitam intervalos de confiança de 95 % e 99 % da estimativa do mensurando. Estes intervalos constituem o resultado reportado pela abordagem b-MCM.

A Tabela 11 apresenta as componentes de incerteza consideradas na aplicação da abordagem b-MMQ a calibrações envolvendo o controle gravimétrico ou volumétrico dos volumes. Não é facultada a informação equivalente para a abordagem b-MCM porque o levantamento de componentes de incerteza é distinto. Os valores estimados para a $u'(d_1)$ do controle volumétrico das adições de padrão são diferentes dos apresentados na Tabela 10, porque neste caso são considerados incrementos de 100 μL e não de 250 μL .

Tabela 11: Avaliação e comparação da medição de AU num soro fortificado a $3,0 \text{ mg dL}^{-1}$, envolvendo o controle gravimétrico ou volumétrico de volumes de calibração, usando as abordagens *bottom-up* baseadas no MMQ (b-MMQ) ou em simulações Monte Carlo (b-MCM). São apresentados os componentes de incerteza da abordagem b-MMQ

	Controle gravimétrico de volumes		Controle volumétrico de volumes	
	b-MMQ	b-MCM	b-MMQ	b-MCM
$u'(vs)$ (%)	0,01	-	0,87	-
$u'(a)$ (%)	4,4	-	4,4	-
$u'(d_1)$ (%) [*]	0,14	-	0,23	-
u'_{ext} (%)	4,0	-	3,4	-
Teor estimado por eletroquímica, γ_s (mg dL^{-1})⁽¹⁾	2,93±0,23	2,90±0,20	2,68±0,19	2,67±0,45
Valor de referência (mg dL^{-1}), γ_{Ref}^{*(1)}	3,02±0,02	3,02±0,02	3,02±0,06	3,02±0,06
Amplitude $\gamma_s - \gamma_{Ref}$ (mg dL^{-1})⁽²⁾	0,09±0,23	0,12±0,40	0,33±0,20	0,35±0,91

^{*} Valor de referência estimado pelo procedimento de fortificação.
⁽¹⁾ Incerteza expandida reportada para um nível de confiança de 95 %.
⁽²⁾ Incerteza expandida reportada para um nível de confiança de 99 %.

⁷ O percentil x é o valor que majora x % dos valores da distribuição.

Como pode ser evidenciado pela Tabela 11, na abordagem b-MMQ as incertezas padrão relativas $u'(v_s)$ e $u'(d_1)$ associada a um controle gravimétrico de volumes são menores do que as mesmas componentes envolvendo um controle volumétrico de volumes, porque a incerteza da pesagem é menor que incerteza da medição de volumes. Este fato não torna significativamente diferentes as estimativas b-MMQ da incerteza da medição de AU no soro, porque a extrapolação da curva de calibração é a componente dominante.

Nos testes de compatibilidade realizados considerando o controle gravimétrico de volumes usando as abordagens b-MMQ e b-MCM, os resultados estimados, γ_s , são compatíveis com o valor de referência, γ_{Ref} , visto que a estimativa do valor absoluto da diferença ($\gamma_s - \gamma_{Ref}$) incluir o valor zero. Os valores de grandeza medida, γ_s , estimados pelas duas abordagens ($\gamma_s(b - MMQ) = 2,93 \text{ mg dL}^{-1}$ e $\gamma_s(b - MCM) = 2,90 \text{ mg dL}^{-1}$) são ligeiramente, diferentes devido ao processo de geração aleatório de variáveis da b-MCM. As incertezas estimadas pelas duas abordagens são muito semelhantes. A equivalência das incertezas estimadas por ambas as abordagens sugerem que o modelo da incerteza de extrapolação da curva de calibração definido pelo MMQ é exato (*i.e.* não envolve um subestimar ou sobrestimar da incerteza). A abordagem b-MMQ produz estimativas fiáveis da incerteza quando todos os pressupostos do MMQ são cumpridos, em particular os associados à qualidade dos calibradores.

Quando os volumes da calibração analítica são controlados volumetricamente (*i.e.* considerando as indicações da graduação das pipetas em vez da resposta da balança), as abordagens b-MMQ e b-MCM subestimam e produzem estimativas fiáveis da incerteza, respectivamente. A abordagem b-MMQ produz estimativas que não são compatíveis com o valor de referência, pois não tem em conta que os calibradores não têm os níveis de qualidade requeridos pelo MMQ, fazendo com que a incerteza de extrapolação subestime a qualidade da calibração. A abordagem b-MCM adapta-se à baixa qualidade dos calibradores estimando uma incerteza mais alta para estas medições que constituem estimativas realistas o valor do mensurando.

Também foi realizado uma avaliação da contribuição porcentual da incerteza associada a cada uma das variáveis aleatorizadas nas simulações de

Monte Carlo (Figura 40), considerando um controle volumétrico dos volumes da calibração analítica para o SH1.

Figura 40: Contribuição porcentual das principais da incerteza associada a cada uma das variáveis aleatorizadas, nas simulações de Monte Carlo considerando um controle volumétrico dos volumes na calibração analítica para o SH1. Foram citadas na legenda as fontes maioritárias



Fonte: Elaborado pelo Autor

Conforme apresentado na Figura 40, quando se aplica a abordagem b-MCM a medições baseadas em um controle volumétrico dos volumes medidos na calibração analítica (SH1), a componente de incerteza mais relevante é a referente a concentração da solução de estoque. Quando se aplica a abordagem b-MMQ às mesmas calibrações, a componente de incerteza mais relevante é a relativa à componente da extrapolação da curva de calibração que tem como paralelo na abordagem b-MCM a combinação das componentes relativas à repetibilidade dos sinais instrumentais (ver Figura 38, seção 5.6.1).

As folhas de cálculo utilizadas nesta seção estão apresentadas no arquivo “5.6.2 - Avaliação bottom-up baseada em simulações Monte Carlo” do material suplementar.

5.6.3. Validação das avaliações de incerteza *bottom-up*

Esta seção descreve a validação das estimativas da incerteza da medição realizadas pela abordagem *bottom-up*, por meio da avaliação da compatibilidade metrológica entre o resultado estimado pela medição eletroquímica e o valor de referência. O valor de referência foi estimado pelo procedimento de fortificação ou pelo procedimento espectrofotométrico de referência. Esta avaliação pode ser realizada sem restrições porque o desempenho da análise dos materiais de referência (*i.e.* soros com valor de referência) não é considerado na avaliação da incerteza da medição, ao contrário do que acontece quando se usam abordagens *top-down*. No caso, da análise de soros fortificados, tendo em conta que a mesma solução estoque foi usada para fortificar os soros e proceder às adições cumulativas de padrão da calibração, as estimativas da incerteza da medição eletroquímica assumem que a incerteza padrão $u(a)$ é desprezável.

A Tabela 12 apresenta os resultados estimados pela medição eletroquímica, em que a incerteza foi quantificada pela abordagem *bottom-up* baseada no MMQ, e os valores de referência considerados. A incerteza dos valores de referência dos soros SF1 a SF5 foi estimada pela combinação *bottom-up* das componentes de incerteza. A incerteza dos valores de referência dos soros SH1 e SH2 foi estimada pela reprodutibilidade da medição espectrofotométrica como discutido anteriormente.

Tabela 12: Resultados da determinação voltamétrica de ácido úrico em soro fisiológico e soro humano e os respectivos valores de referência. A última coluna apresenta o valor absoluto da diferença e a respectiva incerteza expandida

Soros	Teor estimado por voltamétrica, γ_s (mg dL ⁻¹) ^{*(1)}	Valor de referência, γ_{Ref} (mg dL ⁻¹) ^{** (1)}	Amplitude $ \gamma_s - \gamma_{Ref} $ (mg dL ⁻¹) ⁽²⁾
SF1	1,03 ± 0,27	1,000 ± 0,018	0,04 ± 0,28
SF2	3,03 ± 0,32	3,020 ± 0,055	0,01 ± 0,32
SF3	5,06 ± 0,38	5,040 ± 0,092	0,02 ± 0,39
SF4	7,01 ± 0,49	7,06 ± 0,13	0,05 ± 0,51
SF5	8,93 ± 0,56	9,07 ± 0,17	0,14 ± 0,58
SH1	3,83 ± 0,50	4,10 ± 0,11	0,27 ± 0,51
SH2	5,92 ± 0,64	6,20 ± 0,11	0,28 ± 0,65

Conforme a avaliação de compatibilidade apresentados na Equação (38), os valores estimados pelo procedimento eletroquímico são metrologicamente

equivalentes aos valores de referência, demonstrando a confiabilidade das medições eletroquímicas incluindo a avaliação da incerteza.

Portanto, pode-se concluir que o procedimento eletroquímico desenvolvido para a análise de ácido úrico em soro humano, baseado em avaliações de incerteza *bottom-up*, é uma alternativa válida ao procedimento espectrofotométrico de referência. Os resultados da Tabela 12 também permitem concluir que os indivíduos, cujo soro foi analisado, têm valores normais de ácido úrico uma vez que estes estão posicionados dentro do intervalo de 2 mg dL⁻¹ a 8 mg dL⁻¹.

As folhas de cálculo utilizadas nesta seção estão disponíveis no arquivo “5.6 – Análise das amostras de soro” do material suplementar.

5.6.4. Avaliação *top-down intralaboratorial* da incerteza

Os guias do projeto VAM e Nordtest foram utilizados para a estimativa *top-down intralaboratorial* da incerteza da medição. Foram realizados alguns ajustes aos algoritmos propostos no guia Nordtest, visto que a validação da medição foi realizada em condições de repetibilidade.

5.6.4.1. Abordagem do projeto VAM

Primeiramente utilizou-se a abordagem proposta no programa VAM que utiliza as Equações (14) a (19) apresentadas na seção 4.8.3. A incerteza padrão da precisão, $u_{\text{precisão}}$, foi calculada, segundo as Equações (14) e (15), por meio do agrupamento do desvio padrão da repetibilidade da medição observada na análise de todos os soros fortificados, tendo-se estimado um valor de 0,13 mg dL⁻¹. A repetibilidade da medição de cada soro foi estimada pelo desvio padrão da média de vinte estimativas do teor de AU na amostra analisada considerando uma leitura de cada calibrador. O desvio padrão das vinte extrapolações foi dividido pela raiz quadrada de 20 para se estimar a precisão da média, visto que, de acordo com o procedimento definido, todos os calibradores são lidos 20 vezes.

A incerteza padrão da veracidade, $u_{\text{veracidade}}$, foi estimada, separadamente para cada soro analisado, por meio das Equações (16) e (17), sendo que a Equação (17) tem, dentro da raiz quadrada, dois termos: o quadrado do desvio padrão relativo da média das estimativas do valor do item de referência

analisado e o quadrado da incerteza padrão relativa do valor de referência. Para o primeiro termo, considerou-se que s_y igual à repetibilidade da medição do soro específico analisado, s_y , \bar{y} é o teor estimado do soro, γ_S , e n é igual a 20, visto que foram realizadas 20 medições repetidas. O segundo termo dentro da raiz quadrada da Equação (17) é o quadrado da incerteza padrão relativa do valor de referência (*i.e.* teor fortificado ou estimado pelo procedimento espectrofotométrico de referência). A \bar{R} consiste na razão entre γ_S e o valor de referência γ_{Ref} .

Além das duas componentes de incerteza anteriores foi considerada a incerteza padrão relativa, de 4,4 %, do teor da solução de estoque usada na adição padrão (identificada na avaliação *bottom-up* como $u'(a)$) e a incerteza padrão relativa do volume da porção analítica da amostra, de 0,87 % (identificada na avaliação *bottom-up* como $u'(v_S)$). Esta segunda praticamente desprezável. Foi também avaliado o valor da recuperação média por meio da Equação (18) para se ponderar a necessidade de correção da recuperação média observada. A Tabela 13 apresenta os parâmetros relevantes envolvidos na avaliação da incerteza da medição considerando os algoritmos propostos no relatório do programa VAM.

Tabela 13: Parâmetros envolvidos na avaliação *top-down intralaboratorial* da incerteza da medição proposta no programa VAM, incluindo a incerteza expandida para um nível de confiança de aproximadamente 95 %

	SF1	SF2	SF3	SF4	SF5	SH1	SH2
$\gamma_{Ref}/ \text{mg dL}^{-1}$	1,00	3,0	5,0	7,1	9,1	4,1	6,2
$u(\gamma_{Ref})/ \text{mg dL}^{-1} (\times 10^{-2})$	0,91	2,8	4,6	6,4	8,3	5,6	5,6
$\gamma_S/ \text{mg dL}^{-1}$	1,06	3,03	5,08	7,04	8,93	3,85	5,93
$s_y/ \text{mg dL}^{-1}$	0,57	0,45	0,69	0,66	0,62	0,60	0,74
$\bar{R} / \%$	106	100	101	100	98,4	93,8	95,7
$u(\bar{R})$	0,13	0,034	0,032	0,023	0,018	0,035	0,028
$t_{calc}^{95\%}$	0,44	0,12	0,31	0,11	0,89	1,77	1,54
$u(\gamma_S)/ \text{mg dL}^{-1}$	0,20	0,22	0,31	0,38	0,45	0,26	0,34
$U(\gamma_S)/ \text{mg dL}^{-1}\S$	0,41	0,45	0,65	0,79	0,94	0,61	0,81

$u_{precisão} = 0,13 \text{ mg dL}^{-1}$ e $u'(a) = 4,4 \%$; $u'(v_S) = 0,87 \%$; $n = 20$

§ Fator de expansão, $t_{20}^{95\%}$, igual a 2,09.

Em que γ_{Ref} e $u(\gamma_{Ref})$ representam o valor de referência e a respectiva incerteza padrão dos soros analisados, e s_y o desvio padrão da repetibilidade da medição.

Para as amostras fortificadas, a recuperação média observada é metrologicamente equivalente a 100 % para um nível de confiança de 95 %. Quanto ao valor da incerteza expandida estimada por esta abordagem, observa-se que os soros fortificados SF3, SF4, SF5, além dos soros humanos SH1 e SH2, apresentam suas incertezas expandidas acima da incerteza alvo de $0,56 \text{ mg dL}^{-1}$. No entanto, considerando uma tolerância de 30 % na comparação da incerteza estimada com a incerteza alvo, a incerteza estimada para o soro SF4 e SF5, além do soro humano SH2 não é adequada à análise por estar acima de $0,73 \text{ mg dL}^{-1}$ (*i.e.* $1,3 \times 0,56 \text{ mg dL}^{-1}$). Recorda-se que na comparação das estimativas de incerteza *bottom-up* baseadas no MMQ, todas as incertezas expandida estimadas são menores que $0,73 \text{ mg dL}^{-1}$ e apenas uma é superior a $0,56 \text{ mg dL}^{-1}$. Ou seja, quando foi superestimado a incerteza da medição pela abordagem *top-down intralaboratorial*, tornou algumas medições inadequadas ao objetivo, podendo apesar ser utilizada esta abordagem para soros com baixas concentrações.

Também foi realizado um levantamento da contribuição de cada uma das componentes de incerteza desta abordagem (precisão, veracidade, solução estoque e porção analítica da amostra), no qual se concluiu que a contribuição da precisão e veracidade variou de 10 a 50 %, aumentando do SF5 a SF1, no qual o SF1 foi o mais incerto, pois está próximo ao *LOQ*; a componente da solução estoque variou de 5 a 80 %, aumentando do SF1 ao SF5, no qual o SF5 foi o mais incerto, pois as outras componentes de incerteza relativas foram menores, consequentemente aumentando da solução estoque; e a componente de volume da porção analítica da amostra, por ser somente 0,87 % não teve contribuição significativa nas porcentagens.

A componente de precisão poderia ser melhorada realizando um número maior de repetições e a do valor da solução estoque pode ser melhorada preparando uma solução com volumes maiores.

As folhas de cálculo utilizadas esta seção estão armazenadas no arquivo “5.6 – Análise das Amostras de Soro” do material suplementar.

5.6.4.2. Abordagem do guia Nordtest

Em seguida, aplicou-se a abordagem *top-down intralaboratorial*, proposta no guia Nordtest, utilizando as Equações (14), (15), (20), (21) e (22).

Nesta abordagem, assim como na proposta no programa VAM, foram consideradas as componentes da precisão, veracidade, concentração da solução estoque usada na adição padrão e volume da porção analítica da amostra, quantificadas pelas incertezas padrão $u_{precisão}$, u_{BIAS} , $u(a)$ e $u(v_S)$.

A incerteza padrão do valor da solução estoque e volume da porção analítica da amostra (apresentada na abordagem *bottom-up* com a notação $u(a)$ e $u(v_S)$, respectivamente), e a incerteza padrão da precisão, $u_{precisão}$, são as mesmas calculadas para aplicação da abordagem VAM e apresentadas na Tabela 13. Os valores de concentração estimada, γ_S , e de referência, γ_{Ref} , dos soros analisados, além do desvio padrão da repetibilidade, s_{BIAS} , considerada no cálculo de u'_{BIAS} (Equação (22); $s'_{BIAS} = s_{BIAS}/\gamma_S$) são os mesmos usados na abordagem VAM (Tabela 13), somente dividindo-se s_{BIAS} por raiz de 20, pois efetuaram-se 20 medições em condições de repetibilidade.

Para calcular a incerteza padrão relativa u'_{BIAS} utilizaram-se as Equações (21) e (22), estimando a componente *bias'* como ($bias' = (\gamma_S - \gamma_{Ref})/\gamma_{Ref}$) e considerando um n igual a 1 visto que s_γ quantifica a precisão de γ_S . A Tabela 14 apresenta os parâmetros da aplicação desta abordagem excluindo as componentes comuns às abordagens *top-down intralaboratorial* estudadas que estão disponíveis na Tabela 13.

Tabela 14: Parâmetros envolvidos na avaliação *top-down intralaboratorial* da incerteza da medição proposta no guia Nordtest, incluindo a incerteza expandida para um nível de confiança de aproximadamente 95 %

	SF1	SF2	SF3	SF4	SF5	SH1	SH2
$bias'/ \text{mg dL}^{-1}$ ($\times 10^{-2}$)	5,57	1,20	3,50	-1,73	-14,5	-25,4	-26,5
$u_{BIAS}/ \text{mg dL}^{-1}$	0,14	0,10	0,16	0,16	0,22	0,29	0,32
$u(\gamma_S)/ \text{mg dL}^{-1}$	0,20	0,22	0,31	0,38	0,47	0,35	0,42
$U(\gamma_S) /$ $\text{mg dL}^{-1}\S$	0,43	0,46	0,65	0,79	0,98	0,83	1,00

Os parâmetros γ_{Ref} , $u(\gamma_{Ref})$, γ_S , $u_{precisão}$ e $u'(a)$ são os mesmos apresentados na Tabela 13;

O parâmetro s_γ é o mesmo da Tabela 13, somente dividido por raiz de 20;

§ Fator de expansão, $t_{20}^{95\%}$, igual a 2,09.

Conforme apresentado na Tabela 14, as medições de AU nos soros SF3, SF4, SF5, SH1 e SH2 possuem incertezas superiores ao valor alvo de

(0,56 mg dL⁻¹), e os soros SF4, SF5, SH1 e SH2 mesmo considerando uma tolerância de 30 % na comparação com o valor alvo (*i.e.* 0,73 mg dL⁻¹ = 1,3×0,56 mg dL⁻¹) ficaram acima deste valor. Este fato ocorre, porque a abordagem Nordtest superestima a incerteza ainda mais do que a abordagem VAM.

Na próxima seção, será feito um comparativo entre as abordagens *top-down intralaboratorial* e *bottom-up* baseada no MMQ. Como será constatado de seguida, as abordagens *bottom-up* baseada no MMQ e *bottom-up* baseada em simulações Monte Carlo, estimam valores de incerteza equivalentes se todos os pressupostos do MMQ forem cumpridos, em particular, o associado à qualidade da preparação dos calibradores.

As folhas de cálculo utilizadas nesta seção estão armazenadas no arquivo “5.6 – Análise das Amostras de Soro” do material suplementar. Os cálculos destas abordagens estão nas colunas “A a M” para os soros fisiológicos e “XZ a YJ” para os soros humanos, entre as linhas “100 a 170”.

5.6.5 Comparativo de avaliações de incerteza *bottom-up* e *top-down*

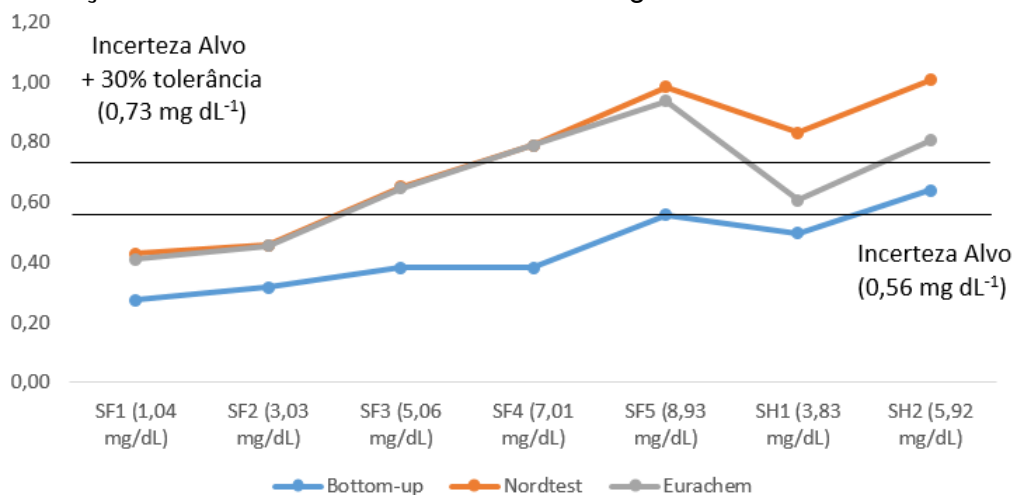
Nas seções 5.6.1 e 5.6.4 foram apresentadas as estimativas da incerteza da medição realizadas pelas abordagens *bottom-up* baseada no MMQ, e *top-down intralaboratorial* proposta no programa VAM e guia Nordtest. Com estes resultados, foi realizado um comparativo dos valores de incerteza que está sumarizado na Figura 41.

Conforme pode ser observado na Figura 41, a incerteza expandida calculada pela abordagem *bottom-up* é inferior à estimada pelas abordagens *top-down*, devido ao fato de ser mais detalhada, evitando superestimar a incerteza pela simplificação da avaliação. As abordagens pragmáticas *top-down* têm a desvantagem adicional de não disponibilizar informação sobre as etapas analíticas ou efeitos que mais contribuem para a incerteza da medição.

Quando se comparam as duas abordagens *top-down intralaboratorial*, observa-se que a baseada no guia Nordtest superestima a incerteza mais do que a abordagem VAM, devido ao fato da componente da veracidade (*i.e.* do “*bias*”) incluir o erro médio de medição. Ao se superestimar a incerteza pelas abordagens *top-down* tornam as medições inadequadas, principalmente

as amostras que a concentração de AU são elevadas, por apresentarem uma incerteza superior ao valor alvo.

Figura 41: Incertezas expandidas estimadas pelas abordagens *bottom-up* e *top-down intralaboratorial* baseadas no programa VAM e guia Nordest para a determinação de ácido úrico em sete soros. A Figura inclui a incerteza alvo



Fonte: Elaborado pelo Autor

A vantagem da abordagem *bottom-up* é a informação detalhada sobre o processo de medição que disponibilizam e o fato da abordagem não implicar a superestimativa da incerteza da medição. A desvantagem desta abordagem é a complexidade da avaliação e dos cálculos. No entanto, quando a modelação *bottom-up* é implementada em tutoriais ou software “amigo-do-utilizador”, pode-se tirar proveito de todas as suas vantagens eliminando-se as desvantagens.

As abordagens *top-down* têm como vantagem a simplificação dos cálculos, em particular quando está disponível informação sobre o desempenho da medição num período alargado de tempo. Quando os dados experimentais não refletem a aleatorização de todas as componentes de incerteza relevantes, é necessário considerar componentes de incerteza adicionais às componentes da precisão e veracidade. Sua principal desvantagem é o fato da utilização de modelos simplistas de desempenho implicando a superestimativa de algumas componentes. E dentre as abordagens *top-down intralaboratorial* estudadas, a proposta no programa VAM é a que menos superestima a incerteza.

As folhas de cálculo utilizadas para esta seção estão contidas no arquivo “5.6 – Análise das amostras de soro” do material suplementar.

5.7. AVALIAÇÃO BAYESIANA DA INCERTEZA DA MEDIÇÃO

A avaliação bayesiana da incerteza da medição envolveu a resolução da aplicação da Equação (12) aos casos concretos estudados recorrendo a simulações de *Markov chain Monte Carlo* (MCMC). Neste estudo, assumiu-se que tanto o conhecimento prévio da grandeza medida quanto a estimativa desta grandeza por intermédio da medição eletroquímica, têm uma distribuição normal.

O conhecimento prévio considerado baseou-se no trabalho de Rodrigues *et al.*, (2012) que estudaram a distribuição de ácido úrico sérico na população brasileira por gênero e fatores de risco cardiovascular. Foram considerados, em particular, os intervalos de concentração de AU sérico em indivíduos saudáveis do sexo masculino e feminino.

A Tabela 15 apresenta os resultados da avaliação, designada frequentista, em que a incerteza da medição foi estimada pela abordagem *bottom-up* baseada no MMQ, e os resultados da avaliação bayesiana da medição após a atualização de informação sobre a prevalência de AU em indivíduos brasileiros saudáveis. A Tabela 15 identifica os resultados de medições que dificilmente poderiam ser obtidas de soros de indivíduos sem sintomas de doença.

Este estudo teve como objetivo avaliar a diferença entre as estimativas frequentista e bayesiana do teor de ácido úrico no soro quando se considera o gênero e o estado de saúde saudável de indivíduos brasileiros na avaliação bayesiana.

Tabela 15: Avaliação frequentista e bayesiana da medição de ácido úrico em soro humano de indivíduos brasileiros saudáveis do sexo masculino e feminino. Os valores frequentistas correspondem às avaliações *bottom-up* da medição eletroquímica de AU nos soros fortificados SF1 a SF5

Estimativa frequentista, γ_s^{**} (mg dL ⁻¹)	Estimativa bayesiana, γ_{s-B}^{**} (mg dL ⁻¹)	Diferença entre estimativas	
		$\frac{\gamma_s - \gamma_{s-B}}{\gamma_{s-B}}$	$\frac{U(\gamma_s) - U(\gamma_{s-B})}{U(\gamma_{s-B})}$
Homens saudáveis §			
1,03 ± 0,27 *	1,08 ± 0,28	-5 %	-4 %
3,03 ± 0,32	3,06 ± 0,32	-1 %	0 %
5,06 ± 0,38	5,07 ± 0,38	0 %	0 %
7,01 ± 0,49	6,96 ± 0,50	1 %	-2 %
8,93 ± 0,56 *	8,79 ± 0,54	2 %	4 %
Mulheres saudáveis §			
1,03 ± 0,27 *	1,08 ± 0,26	-4 %	-25 %
3,03 ± 0,32	3,05 ± 0,32	-1 %	0 %
5,06 ± 0,38	5,03 ± 0,38	1 %	0 %
7,01 ± 0,49 *	6,87 ± 0,48	2 %	2 %
8,93 ± 0,56 *	8,63 ± 0,54	3 %	4 %

§ Prevalência de AU em indivíduos saudáveis (gênero/(média ± 2×desvio padrão) em mg dL⁻¹): (homens/ 5,4 ± 2,8), (mulheres/ 4,0 ± 2,2) (Rodrigues *et al.*, (2012))

* Valores posicionados fora do intervalo (média ± 2(desvio padrão)) da prevalência de AU sérico sugerindo que indivíduos com estes valores teriam sintomas de doença.

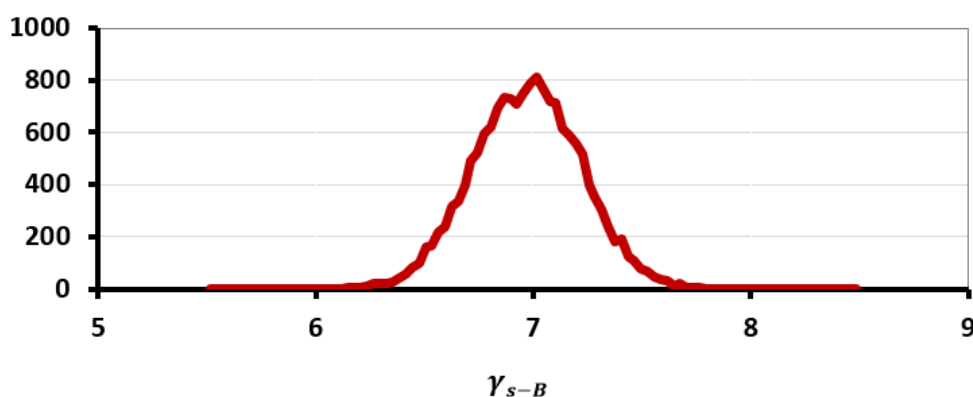
** Os valores de incerteza expandidos para 95 % de confiança

Conforme apresentado na Tabela 15, tanto para homens quanto para mulheres, quando as estimativas eletroquímicas da concentração de ácido úrico estão dentro da variabilidade deste parâmetro em indivíduos saudáveis (ver notas § e * da Tabela 15), as estimativas frequentista e bayesiana são praticamente iguais. Quando o resultado frequentista difere da variabilidade esperada de AU no soro, possivelmente, a informação sobre o gênero ou o estado saudável está errada, a estimativa bayesiana difere da frequentista tanto no valor de grandeza medida como no valor da incerteza. O modelo bayesiano desvia a estimativa da medição para o valor observado em indivíduos saudáveis.

Estes exemplos ilustram vantagens e desvantagens da abordagem bayesiana. A avaliação da bayesiana descreve melhor o processo de decisão perante um resultado analítico ao considerar o conhecimento prévio do sistema na avaliação. No entanto, se a informação prévia não for correta, pode conduzir a uma avaliação errada do sistema estudado.

A Figura 42 apresenta a função de densidade de probabilidade obtida pela abordagem bayesiana para a estimativa do mensurando considerando a medição de ácido úrico no SF4 e assumindo que o soro foi recolhido de um homem brasileiro e saudável. Pode-se observar visualmente que a estimativa do mensurando tem uma distribuição normal, aproximadamente.

Figura 42: Histograma de frequência das simulações de *Markov Chain Monte Carlo* para estimativa do teor de ácido úrico no soro de um brasileiro saudável cuja determinação eletroquímica estima um valor de ácido úrico de $7,01 \text{ mg dL}^{-1}$



Fonte: Elaborado pelo Autor

Com isso, a avaliação bayesiana pode ser utilizada para analisar a probabilidade de um paciente ter resultado positivo ou negativo, e pode ser utilizada em duas situações: 1) na ilustrada na discussão em torno da Tabela 15, levando em conta dados de uma população saudável e/ou; 2) levando em conta dados de uma população com alguma das doenças que envolvem valores anormais de ácido úrico. Esta segunda alternativa pode ser aplicada quando o paciente apresentar algum dos sintomas típicos de doença que envolvem níveis anormais de AU e/ou basear-se num histórico anterior do paciente. Nestes casos, deve-se ponderar que tipo de informação é usada na definição do conhecimento prévio.

Uma das vantagens da avaliação bayesiana em casos que envolvem procedimentos de análise com etapas de transferência de massa (e.g. extração do item analisado), é a forma como podem ser geridas eventuais perdas no processo de medição. Os dados da avaliação prévia de perdas reunidos durante a validação da medição podem ser entendidos como

conhecimento prévio de um modelo bayesiano condicionado o valor a estimar para o resultado da amostra desconhecida. Com isso, a avaliação bayesiana da incerteza da medição se mostra uma ferramenta útil para análises clínicas e outros tipos de determinações.

As folhas de cálculo utilizadas nesta seção estão disponíveis no arquivo “5.7 – Avaliação bayesiana da incerteza da medição” do material suplementar.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O eletrodo produzido e otimizado de nanografite, modificado com lignina e cobre eletrodepositado, é um sensor eletroquímico eficiente para a determinação de ácido úrico em soro humano. A superfície modificada pela eletrodeposição de cobre comporta-se segundo um mecanismo do tipo ECE para a oxidação do AU. A medição eletroquímica de AU em soro tem um custo significativamente menor do que a medição espectrofotométrica de referência.

Uma vez que a resposta do eletrodo varia com a matriz da amostra e estão disponíveis pequenos volumes de soro para análise, a calibração do sensor foi realizada pelo método de adição cumulativa de padrão desenvolvido. Na calibração, a multiplicação da "*corrente de oxidação da célula eletroquímica*", I , pelo "*volume total da solução*", v_{ta} , ($I \cdot v_{ta}$) é proporcional à massa de AU adicionada, m_a . A curva de calibração é utilizada para extrapolar a massa de AU na alíquota de soro analisada, e esta massa convertida em concentração de AU tomando o volume da alíquota.

O sinal instrumental tem comportamento homocedástico e varia linearmente com a concentração de AU até, pelo menos, 30 mg dL^{-1} , e a metodologia desenvolvida de adições cumulativas de padrão cumpre com o pressuposto do método dos mínimos quadrados no que respeita à qualidade dos calibradores.

Foi desenvolvido um modelo de medição baseado em simulações de Monte Carlo das variáveis de medição que permite estimativas fiáveis da incerteza mesmo quando não são cumpridos os pressupostos do MMQ no que respeita à qualidade dos calibradores.

As estimativas *bottom-up* da incerteza da medição, que envolvem a preparação de calibradores cumprindo os requisitos de qualidade do MMQ, revelaram-se realistas visto que quando aplicadas à análise de soros fortificados e soros humanos produziram resultados metrologicamente compatíveis com os valores de referência. Os valores de referência dos soros fortificados e soros humanos foram definidos pela metodologia de fortificação ou pelo procedimento espectrofotométrico de referência, respectivamente. Estas estimativas da incerteza da medição não são superiores à incerteza alvo de $0,56 \text{ mg dL}^{-1}$ definida para a monitorização da saúde individual.

Desta forma, o procedimento definido de medição voltamétrica de ácido úrico em soro humano, baseada nas avaliações *bottom-up* da incerteza da medição, apresenta-se como uma alternativa válida à medição espectrofotométrica de referência. O sensor desenvolvido tem como vantagens adicionais à estabilidade e simplicidade de utilização.

Os modelos de medição desenvolvidos para as abordagens *bottom-up*, baseada no MMQ ou em simulações de Monte Carlo, foram implementados em folha de cálculo, validadas e “amigas-do-utilizador”, de forma a permitirem a sua fácil aplicação por analistas sem conhecimentos avançados na área da metrologia. Foi igualmente avaliada a viabilidade da quantificação *top-down intralaboratorial* da incerteza da medição por aplicação de algoritmos propostos no programa VAM e no guia Nordtest. Este estudo permitiu concluir que para teores de AU superiores a $5,0 \text{ mg dL}^{-1}$ (*i.e.* acima de metade do intervalo de valores para indivíduos saudáveis), a incerteza estimada por estas abordagens é superior ao valor alvo tornando as medições inadequadas para a monitorização de AU.

Esta investigação também incluiu uma avaliação bayesiana da incerteza da medição que implica considerar a prevalência de AU na população brasileira e a ausência de sintomas visíveis de doença que sugerem alterações no valor de AU no soro, na estimativa do teor de AU no soro. Caso a informação extra-analítica reunida seja válida, o valor estimado de AU no soro será ligeiramente diferente do estimado exclusivamente pela medição.

As metodologias avançadas de preparação e otimização de sensores eletroquímicos desenvolvidas são aplicáveis à medição de outros compostos em outras matrizes. O método inovador de adição cumulativa de padrão, incluindo a sua validação e avaliação da incerteza das medições, é aplicável a qualquer procedimento instrumental de análise não destrutiva de soluções. As planilhas desenvolvidas permitem a aplicação simples dos algoritmos complexos desenvolvidos.

Todos os objetivos definidos neste estudo foram cumpridos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Farmacopeia brasileira**. 5.^a ed. Brasília, 2010. v. 1.

ALIZADEH, T. et al. Development of a highly selective and sensitive electrochemical sensor for Bi³⁺ determination based on nano-structured bismuth-imprinted polymer modified carbon/carbon nanotube paste electrode. **Sensors and Actuators B: chemical**, Lausanne, v. 245, p. 605-614, 2017. DOI: 10.1016/j.snb.2017.02.024.

ALLEGRI, F.; OLIVIERI, A. C. IUPAC-consistent approach to the limit of detection in partial least-squares calibration. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 86, n. 15, p. 7858-7866, 2014. DOI: 10.1021/ac501786u.

AMAL-RAJ, M.; JOHN, S. A. Simultaneous determination of uric acid, xanthine, hypoxanthine and caffeine in human blood serum and urine samples using electrochemically reduced graphene oxide modified electrode. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 771, p. 14-20, 2013. DOI: 10.1016/j.aca.2013.02.017.

AVEN, T.; EIDSEN, K. A predictive bayesian approach to risk analysis in health care. **Medical Research Methodology**, London, v. 7, n. 1, p. 38, 2007. DOI: 10.1186/1471-2288-7-38.

BAES, C. F.; MESMER, R. E. **The hydrolysis of cations**. New York: John Wiley & Sons, 1976.

BAI, Y.; WAGENER, T.; REED, P. A top-down framework for watershed model evaluation and selection under uncertainty. **Environmental Modelling & Software**, Oxford, v. 24, n. 8, p. 901-916, 2009. DOI: 10.1016/j.envsoft.2008.12.012.

BARD, A. J.; FAULKNER, I. R. **Electrochemical methods fundamentals and applications**. New York: John Wiley & Sons, 1980.

BARSAN, M. M.; GHICA, M. E.; BRETT, C. M. A. Electrochemical sensors and biosensors based on redox polymer/carbon nanotube modified electrodes: a review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 881, p. 1-23, 2015. DOI: 10.1016/j.aca.2015.02.059.

BENINI, S. et al. Fluoride inhibition of *Sporosarcina pasteurii* urease: structure and thermodynamics. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, Berlin, v. 19, n. 8, p. 1243-1261, 2014. DOI: 10.1007/s00775-014-1182-x.

BETTENCOURT DA SILVA, R. J. N. Spreadsheet for designing valid least-squares calibrations: a tutorial. **Talanta**, London, v. 148, p. 177-190, 2016. DOI: 10.1016/j.talanta.2015.10.072.

BETTENCOURT DA SILVA, R. J. N.; CAMOES, M. F. The quality of standards in least squares calibrations. *Analytical Letters*, New York, v. 43, n. 7/8, p. 1257-1266, 2010. DOI: 10.1080/00032710903518674.

BETTENCOURT DA SILVA, R. J. N. et al. Estimation of precision and efficiency mass transfer steps for the determination of pesticides in vegetables aiming at the expression of results with reliable uncertainty. **Analyst**, London, v. 125, n. 8, p. 1459-1464, 2000. DOI 10.1039/B000801J.

BEUTL, A.; FÜRSTAUER, S.; FLANDORFER, H. A novel apparatus for coulometric titrations in lithium containing systems. **Thermochimica Acta**, Amsterdam, v. 653, p. 8-15, 2017. DOI: 10.1016/j.tca.2017.03.025.

BUORO, R. M. et al. Lignin-AuNp modified carbon paste electrodes: preparation, characterization, and applications. **Electrochimica Acta**, New York, v. 96, p. 191-198, 2013. DOI: 10.1016/j.electacta.2013.02.081.

BURR, T. et al. Uncertainty quantification for radiation measurements: bottom-up error variance estimation using calibration information. **Applied Radiation and Isotopes**, New York, v. 108, p. 49-57, 2016. DOI: 10.1016/j.apradiso.2015.11.014.

CHEN, L.; LU, G. Direct electrochemistry and electrocatalysis of hybrid film assembled by polyelectrolyte-surfactant polymer, carbon nanotubes and hemoglobin. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Lausanne, v. 597, n. 1, p. 51-59, 2006. DOI: 10.1016/j.jelechem.2006.08.002.

CHEN, Z.; WAN, C. Biological valorization strategies for converting lignin into fuels and chemicals. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 73, p. 610-621, 2017. DOI: 10.1016/j.rser.2017.01.166.

CHENG, Q.; WANG, S.; YAN, C. Sequential Monte Carlo simulation for robust optimal design of cooling water system with quantified uncertainty and reliability. **Energy**, Amsterdam, v. 118, p. 489-501, 2017. DOI: 10.1016/j.energy.2016.10.051.

CISTERNAS, R. et al. The electrode responses of a tungsten bronze electrode differ in potentiometry and voltammetry and give access to the individual contributions of electron and proton transfer. **Electrochemistry Communications**, New York, v. 56, p. 34-37, 2015. DOI: 10.1016/j.elecom.2015.04.005.

CORDEIRO, R. M. S.; ROSA, C. M. G.; BETTENCOURT DA SILVA, R. J. N. Measurements recovery evaluation from the analysis of independent reference materials: analysis of different samples with native quantity spiked at different levels. **Accreditation and Quality Assurance**, New York, p. 1-15, 2017. DOI 10.1007/s00769-017-1296-2.

COX, M. G.; SIEBERT, B. R. L. The use of a Monte Carlo method for evaluating uncertainty and expanded uncertainty. **Metrologia**, Bristol, v. 43, n. 4, p. S178, 2006. DOI: 10.1088/0026-1394/43/4/S03.

CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 67, n. 10, p. 1699-1723, 1995. DOI: 10.1351/pac199567101699.

DADAMOS, T. R. L. et al. Monte Carlo simulations for the evaluation of the uncertainty of the electrochemical determination of uric acid in plasma. **Tchê Química**, Porto Alegre, 2017. Accepted for publication 11/2017.

DADAMOS, T. R. L.; TEIXEIRA, M. F. S. Electrochemical sensor for sulfite determination based on a nanostructured copper-salen film modified electrode. **Electrochimica Acta**, New York, v. 54, n. 19, p. 4552-4558, 2009. DOI: 10.1016/j.electacta.2009.03.045.

DRYHURST, G. Electrochemical oxidation of uric acid and xanthine at the pyrolytic graphite electrode mechanistic interpretation of electrochemistry. **Journal of the Electrochemical Society**, Baltimore, v. 119, n. 12, p. 1659-1664, 1972. DOI: 10.1149/1.2404066.

ELIN, R. J.; JOHNSON, E.; CHESLER, R. Four methods for determining uric acid compared with a candidate reference method. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 28, n. 10, p. 2098-2100, 1982.

ELLISON, S. L. R.; BARWICK, V. J. **VAM project 3.2.1: development and harmonization of measurement uncertainty principles: part d: protocol for uncertainty evaluation from validation data**. Teddington: LGC 2000. Disponível em: <http://blpd.dss.go.th/knowledge_el/VAM_uncertainty-0452.pdf>. Acesso em: 23 nov. 2017.

EURACHEM/CITAC. **Quantifying uncertainty in analytical measurement**. In: S.L. R., ELLISON, A., WILLIAMS (Ed.). third ed., London: Eurachem, 2012. Disponível em: <<https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/quam>>. Acesso em: 14 nov. 2017.

EURACHEM/CITAC. **Setting and using target uncertainty in chemical measurement**. In: R. J. N. BETTENCOURT DA SILVA, A., WILLIAMS (Ed.). Eurachem, 2015. Disponível em: <<https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/gd-stmu>>. Acesso em: 18 de nov. 2017.

EUROLAB. **Technical report No. 1/2002: measurement uncertainty in testing: a short introduction on how to characterise accuracy and reliability of results including a list of useful references**. [S. l.], 2002. Disponível em: <<http://www.eurolab.org/>>. Acesso em: 23 nov. 2017.

FERRAZ, M. H. C.; DELGADO, R. B. **Valores de referência para exames laboratoriais**. LEÃO, E. CORRÊA, E. J. VIANA M. B. MOTA, J. A. C. - Pediatria ambulatorial. 3. ed. Belo Horizonte: COOPMED, 1988.

FUKUSHIMA, R. S.; HATFIELD, R. D. Extraction and isolation of lignin for utilization as a standard to determine lignin concentration using the acetyl bromide spectrophotometric method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 7, p. 3133-3139, 2001. DOI: 10.1021/jf010449r.

GELMAN, A. et al. **Bayesian data analysis**. 3. ed. New York: CRC Press: Taylor Group, 2014.

GIL, E. S.; COUT, R. O. Flavonoid electrochemistry: a review on the electroanalytical applications. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, São Paulo, v. 23, n. 3, p. 542-558, 2013. DOI: 10.1590/S0102-695X2013005000031.

GÓMEZ-FERNÁNDEZ, S. et al. Properties of flexible polyurethane foams containing isocyanate functionalized kraft lignin. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 100, p. 51-64, 2017. DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.02.005.

GONÇALVES, D. A.; JONES, B. T.; DONATI, G. L. The reversed-axis method to estimate precision in standard additions analysis. **Microchemical Journal**, New York, v. 124, p. 155-158, 2016. DOI: 10.1016/j.microc.2015.08.006.

GRANERO, A. M. et al. Simultaneous determination of ascorbic and uric acids and dopamine in human serum samples using three-way calibration with data from square wave voltammetry. **Microchemical Journal**, New York, v. 129, p. 205-212, 2016. DOI: 10.1016/j.microc.2016.07.004.

GUO, X. M. et al. Amperometric highly sensitive uric acid sensor based on manganese (III) porphyrin-graphene modified glassy carbon electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Lausanne, v. 783, p. 8-14, 2016. DOI: 10.1016/j.jelechem.2016.10.039.

HAN, J. et al. New method to incorporate type B uncertainty into least-squares procedures in radionuclide metrology. **Applied Radiation and Isotopes**, New York, v. 109, p. 82-84, 2016. DOI: 10.1016/j.apradiso.2015.11.069.

INNAL, F.; CHEBILA, M.; DUTUIT, Y. Uncertainty handling in safety instrumented systems according to IEC 61508 and new proposal based on coupling Monte Carlo analysis and fuzzy sets. **Journal of Loss Prevention in the Process Industries**, London, v. 44, p. 503-514, 2016. DOI: 10.1016/j.jlp.2016.07.028.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA(INMETRO). **Avaliação de dados de medição: guia para a expressão de incerteza de medição**. Rio de Janeiro, 2008. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/noticias/conteudo/iso_gum_versao_site.pdf>. Acesso em: 11 nov. 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA(INMETRO).INSTITUTO PORTUGUÊS DA QUALIDADE(IPQ). **Vocabulário internancional de metrologia: conceitos fundamentais e gerais e termos associados**. Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/inovacao/publicacoes/vim_2012.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2017.

INTERNATIONAL ORGANIZATION OF LEGAL METROLOGY(OIML). **G 1-100: evaluation of measurement data: guide to the expression of uncertainty in measurement**. Gaithersburg, 2008. Disponível em: <https://www.oiml.org/en/files/pdf_g/g001-100-e08.pdf>. Acesso em: nov. 2017.

INTERNATIONAL ORGANIZATION OF LEGAL METROLOGY(OIML) **NMI R 33: conventional value of the result of weighing in air**. Gaithersburg, 1979. Disponível

em:<<http://www.measurement.gov.au/Publications/PARrequirements/Documents/NMI%20R%2033.pdf>>. Acesso em: 14 nov. 2017.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **GUM: Guide to the expression of uncertainty in measurement**, Geneve, Bureau International des Poids et Mesures, 2008. Disponível em: <<http://www.bipm.org/en/publications/guides/gum.html>>. Acesso em: 12 nov. 2017.

ISAACS, R. A. et al. Synthesis and characterization of copper-nanocarbon films with enhanced stability. **Carbon**, Elmsford, v. 122, p. 336-343, 2017. DOI: 10.1016/j.carbon.2017.06.047.

JĘDRZAK, A. et al. Carbon paste electrode based on functional GOx/silica-lignin system to prepare an amperometric glucose biosensor. **Sensors and Actuators B: chemical**, Lausanne, v. 256, p. 176-185, 2018. DOI: 10.1016/j.snb.2017.10.079.

JIN, D. et al. Quantitative determination of uric acid using CdTe nanoparticles as fluorescence probes. **Biosensors and Bioelectronics**, Essex, v. 77, p. 359-365, 2016. DOI: 10.1016/j.bios.2015.09.057.

JOINT COMMITTEE FOR GUIDES IN METROLOGY.(JCGM). **International vocabulary of metrology-basic and general concepts and associated terms**. Geneve: Bureau International des Poids et Mesures, 2012. Disponível em: <<https://www.bipm.org/en/publications/guides/gum.html>>. Acesso em: 22 nov. 2017.

KAGEYAMA, N. A direct colorimetric determination of uric acid in serum and urine with uricase-catalase system. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 31, n. 2, p. 421-426, 1971. DOI: 10.1016/0009-8981(71)90413-X.

KAMYABI, M. A.; AGHAJANLOO, F. Electrocatalytic oxidation and determination of nitrite on carbon paste electrode modified with oxovanadium (IV)-4-methyl salophen. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Lausanne, v. 614, n. 1/2, p. 157-165, 2008. DOI: 10.1016/j.jelechem.2007.11.026.

KHAJEHSHARIFI, H. et al. The comparison of partial least squares and principal component regression in simultaneous spectrophotometric determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid in real samples. **Arabian Journal of Chemistry**, Amsterdam, v. 10, p. S3451-S3458, 2017. DOI: 10.1016/j.arabjc.2014.02.006.

KHAN, M. M. I.; HAQUE, A. J.; KIM, K. Electrochemical determination of uric acid in the presence of ascorbic acid on electrochemically reduced graphene oxide modified electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Lausanne, v. 700, p. 54-59, 2013. DOI: 10.1016/j.jelechem.2013.04.014.

KOÇAK, C. C.; DURSUN, Z. Simultaneous determination of ascorbic acid, epinephrine and uric acid at over-oxidized poly (p-aminophenol) film modified electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Lausanne, v. 694, p. 94-103, 2013. DOI: 10.1016/j.jelechem.2013.02.006.

KOKKINOS, C.; ECONOMOU, A. Emerging trends in biosensing using stripping voltammetric detection of metal-containing nanolabels: a review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 961, p. 12-32, 2017. DOI: 10.1016/j.aca.2017.01.016.

KRAGTEN, J. Tutorial review: calculating standard deviations and confidence intervals with a universally applicable spreadsheet technique. **Analyst**, London, v. 119, n. 10, p. 2161-2165, 1994. DOI: 10.1039/AN9941902161.

KUBO, S.; KADLA, J. F. Lignin-based carbon fibers: effect of synthetic polymer blending on fiber properties. **Journal of Polymers and the Environment**, New York, v. 13, n. 2, p. 97-105, 2005. DOI: 10.1007/s10924-005-2941-0.

KUTZING, M. K.; FIRESTEIN, B. L. Altered uric acid levels and disease states. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 324, n. 1, p. 1-7, 2008. DOI: 10.1124/jpet.107.129031.

LAVIRON, E. Adsorption, autoinhibition and autocatalysis in polarography and in linear potential sweep voltammetry. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, Amsterdam, v. 52, n. 3, p. 355-393, 1974. DOI: 10.1016/S0022-0728(74)80448-1.

LEITO, I.; HELM, I. **Course online: estimation of uncertainty in chemical analyses**. Tartu: University of Tartu, 2017. Disponível em: <<https://sisu.ut.ee/measurement/31-normal-distribution>>. Acesso em: 3 nov. 2017.

LI, W. et al. Molecular docking and molecular dynamics simulation analyses of urea with ammoniated and amoxidized lignin. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, New York, v. 71, p. 58-69, 2017. DOI: 10.1016/j.jmgm.2016.11.005.

LU, H. et al. A highly selective and sensitive colorimetric uric acid biosensor based on Cu (II)-catalyzed oxidation of 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine. **Sensors and Actuators B: chemical**, Lausanne, v. 244, p. 77-83, 2017. DOI: 10.1016/j.snb.2016.12.127.

MACHINI, W. B. S.; TEIXEIRA, M. F. S. Application of oxo-manganese complex immobilized on ion-exchange polymeric film as biomimetic sensor for nitrite ions. **Sensors and Actuators B: chemical**, Lausanne, v. 217, p. 58-64, 2015. DOI: 10.1016/j.snb.2015.01.021.

MALVE, O. et al. Bayesian modelling of algal mass occurrences: using adaptive MCMC methods with a lake water quality model. **Environmental Modelling & Software**, Oxford, v. 22, n. 7, p. 966-977, 2007. DOI: 10.1016/j.envsoft.2006.06.016.

MARTIN, C. S.; DADAMOS, T. R. L.; TEIXEIRA, M. F. S. Development of an electrochemical sensor for determination of dissolved oxygen by nickel-salen polymeric film modified electrode. **Sensors and Actuators B: chemical**, Lausanne, v. 175, p. 111-117, 2012. DOI: 10.1016/j.snb.2011.12.098.

MATTSSON, C. et al. Using 2D NMR to characterize the structure of the low and high molecular weight fractions of bio-oil obtained from LignoBoost™ kraft lignin depolymerized in subcritical water. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 95, p. 364-377, 2016. DOI: 10.1016/j.biombioe.2016.09.004.

MEOTTI, F. C. et al. Urate as a physiological substrate for myeloperoxidase implications for hyperuricemia and inflammation. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 286, n. 15, p. 12901-12911, 2011. DOI: 10.1074/jbc.M110.172460.

MILLER, J.; MILLER, J. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. 5th ed., London: Pearson, 2005.

MORIWAKI, Y. Effects on uric acid metabolism of the drugs except the antihyperuricemics. **Journal of Bioequivalence & Bioavailability**, Los Angeles, v. 6, n. 1, p. 10, 2014. DOI: 10.4172/jbb.1000173.

MUNOZ, E.; PALMERO, S. Analysis and speciation of arsenic by stripping potentiometry: a review. **Talanta**, London, v. 65, n. 3, p. 613-620, 2005. DOI: 10.1016/j.talanta.2004.07.034.

MURALIKRISHNA, S. et al. Non-enzymatic amperometric determination of glucose by CuO nanobelt graphene composite modified glassy carbon electrode. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 26, n. 8, p. 1632-1641, 2015. DOI: 10.5935/0103-5053.20150134.

NORDTEST. **Handbook for the calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories**. 2nd ed. Estocolmo, 2004. Disponível em: <www.nordtest.org>. Acesso em: 21 de nov. Novembro de 2017.

INSTITUTO PORTUGUÊS DE ACREDITAÇÃO(IPAC). **OGC007: guia para a quantificação de incerteza em ensaios químicos**. Caparica, 2007. Disponível em: <www.ipac.pt>. Acesso em: 18 de nov. 2017.

OLIVEIRA, A. E. **Planejamento e otimização de experimentos: planejamentos 3k, Box-Behnken e Plackett-Burman**. [S.l.]: [s.d.]. Disponível em:<http://www.anselmo.quimica.ufg.br/up/56/o/DOE_04_Outros_planejamento_s.pdf>. Acesso em: 9 maio 2017.

OZTEKIN, Y. et al. Copper nanoparticle modified carbon electrode for determination of dopamine. **Electrochimica Acta**, New York, v. 76, p. 201-207, 2012. DOI: 10.1016/j.electacta.2012.04.105.

PAN, P. et al. 3D-copper oxide and copper oxide/few-layer graphene with screen printed nanosheet assembly for ultrasensitive non-enzymatic glucose sensing. **Materials Chemistry and Physics**, Lausanne, v. 187, p. 28-38, 2017. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2016.11.032.

PARK, Y. et al. Torque traceability examination of calibration laboratories in Korea. **Measurement**, Amsterdam, v. 42, n. 10, p. 1443-1447, 2009. DOI: 10.1016/j.measurement.2009.09.001.

PEREIRA FILHO, E. R. **Planejamento fatorial em química: maximizando a obtenção de resultados**. São Carlos: EdUFSCar, 2015.

POURBEYRAM, S.; MEHDIZADEH, K. Nonenzymatic glucose sensor based on disposable pencil graphite electrode modified by copper nanoparticles. **Journal of Food and Drug Analysis**, Philadelphia, v. 24, n. 4, p. 894-902, 2016. DOI: 10.1016/j.jfda.2016.02.010.

PRADYAWONG, S. et al. Adhesion properties of soy protein adhesives enhanced by biomass lignin. **International Journal of Adhesion and Adhesives**, Guildford, v. 75, p. 66-73, 2017. DOI: 10.1016/j.ijadhadh.2017.02.017.

QIU, S.; WANG, J. The prediction of food additives in the fruit juice based on electronic nose with chemometrics. **Food Chemistry**, London, v. 230, p. 208-214, 2017. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.03.011.

RAJI, M. A.; SCHUG, K. A. Chemometric study of the influence of instrumental parameters on ESI-MS analyte response using full factorial design. **International Journal of Mass Spectrometry**, Amsterdam, v. 279, n. 2-3, p. 100-106, 2009. DOI: 10.1016/j.ijms.2008.10.013.

RETTNER, U. et al. On the impedance of potassium nickel (II) hexacyanoferrate (II) composite electrodes: the generalization of the Randles model referring to inhomogeneous electrode materials. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Lausanne, v. 546, p. 87-96, 2003. DOI: 10.1016/S0022-0728(03)00150-5.

RHO, Y. H.; ZHU, Y. N.; CHOI, H. K. The epidemiology of uric acid and fructose. In: **Seminars in nephrology**. Elsevier, 2011. p. 410-419. DOI: 10.1016/j.semnephrol.2011.08.004.

RÍOS-REINA, R. et al. Characterization and authentication of Spanish PDO wine vinegars using multidimensional fluorescence and chemometrics. **Food Chemistry**, London, v. 230, p. 108-116, 2017. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.02.118.

ROBINSON, J. et al. **Instrumental methods of electrochemistry**. New York: John Wiley & Sons, 1985.

RODRIGUES, J. et al. Designing valid and optimised standard addition calibrations: application to the determination of anions in seawater. **Talanta**, London, v. 142, p. 72-83, 2015. DOI: 10.1016/j.talanta.2015.04.031.

RODRIGUES, S. L. et al. Gender distribution of serum uric acid and cardiovascular risk factors: population based study. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 98, n. 1, p. 13-21, 2012. DOI: 10.1590/S0066-782X2011005000116.

SABATANI, E. et al. Organized self-assembling monolayers on electrodes: part I: octadecyl derivatives on gold. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, Amsterdam, v. 219, n. 1/2, p. 365-371, 1987. DOI: 10.1016/0022-0728(87)85054-4.

SAFFAJ, T.; IHSSANE, B. A Bayesian approach for application to method validation and measurement uncertainty. **Talanta**, London, v. 92, p. 15-25, 2012. DOI: 10.1016/j.talanta.2011.11.077.

SAJID, M. et al. Chemically modified electrodes for electrochemical detection of dopamine in the presence of uric acid and ascorbic acid: a review. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 76, p. 15-29, 2016. DOI: 10.1016/j.trac.2015.09.006.

SAKAMOTO, H. et al. Electrochemical selective detection of uric acid using a copper-modified carbon electrode. **Analytical Sciences**, Tokyo, v. 27, n. 3, p. 333-333, 2011. DOI: 10.2116/analsci.27.333.

SALAMA, N. N. et al. A novel cesium modified carbon paste electrode for rapid selective determination of ropinirole in presence of co-administered and interference substances. **Sensors and Actuators B: chemical**, Lausanne, v. 240, p. 1291-1301, 2017. DOI: 10.1016/j.snb.2016.08.179.

SALVADOR, C. G.; GOLDFARB, N. PMD4 Ishikawa cause and effect diagrams: a useful tool in designing economic analyses. **Value in Health**, Lawrenceville, v. 7, n. 3, p. 301-302, 2004. DOI: 10.1016/S1098-3015(10)62317-0.

SEGA, M. et al. Uncertainty evaluation for the quantification of low masses of benzo [a] pyrene: comparison between the law of propagation of uncertainty and the Monte Carlo method. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 920, p. 10-17, 2016. DOI: 10.1016/j.aca.2016.03.032.

SHAPIRA, B.; AVRAHAM, E.; AURBACH, D. Proton-selective electrode for pH sensing. **Electrochemistry Communications**, New York, v. 73, p. 80-84, 2016. DOI: 10.1016/j.elecom.2016.11.007.

SILVEIRA, J. P.; PIOVESAN, J. V.; SPINELLI, A. Carbon paste electrode modified with ferrimagnetic nanoparticles for voltammetric detection of the hormone estriol. **Microchemical Journal**, New York, v. 133, p. 22-30, 2017. DOI: 10.1016/j.microc.2017.03.010.

SONG, J. et al. Quantifying the measurement uncertainty of the nopaline synthase terminator in mixed samples of genetically modified rice using a bottom-up approach. **Food Control**, Guildford, v. 73, p. 1548-1555, 2017. DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.11.020.

STELIOPOULOS, P. Extension of the standard addition method by blank addition. **MethodsX**, Amsterdam, v. 2, p. 353-359, 2015. DOI: 10.1016/j.mex.2015.09.001.

SUBIR, M.; ARIYA, P. A.; DASTOOR, A. P. A review of uncertainties in atmospheric modeling of mercury chemistry I: uncertainties in existing kinetic parameters: fundamental limitations and the importance of heterogeneous chemistry. **Atmospheric Environment**, Oxford, v. 45, n. 32, p. 5664-5676, 2011. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2011.04.046.

TARLEY, C. R. T. et al. Chemometric tools in electroanalytical chemistry: methods for optimization based on factorial design and response surface methodology. **Microchemical Journal**, New York, v. 92, n. 1, p. 58-67, 2009. DOI: 10.1016/j.microc.2009.02.002.

THEODORSSON, E. Uncertainty in measurement and total error: tools for coping with diagnostic uncertainty. **Clinics in Laboratory Medicine**, Maryland Heights, v. 37, n. 1, p. 15-34, 2017. DOI: 10.1016/j.cll.2016.09.002.

TIAN, K.; PRESTGARD, M.; TIWARI, A. A review of recent advances in nonenzymatic glucose sensors. **Materials Science and Engineering C: biomimetic materials, sensors and systems**, Lausanne, v. 41, p. 100-118, 2014. DOI: 10.1016/j.msec.2014.04.013.

TOLSTOY, V. P.; CHERNYSHOVA, I. V.; SKRYSHEVSKY, V. A. **Handbook of infrared spectroscopy of ultrathin films**. New York: John Wiley & Sons, 2003.

UZUN, D.; GÜNDÜZALP, A. B.; HASDEMİR, E. Selective determination of dopamine in the presence of uric acid and ascorbic acid by N, N'-bis (indole-3-carboxaldimine)-1, 2-diaminocyclohexane thin film modified glassy carbon electrode by differential pulse voltammetry. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Lausanne, v. 747, p. 68-76, 2015. DOI: 10.1016/j.jelechem.2015.03.036.

VIANA, A. M. E.; BETTENCOURT DA SILVA, R. J. N.; CAMÕES, M. F. G. F. C. Optimization of the determination of chemical oxygen demand in wastewaters. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 699, n. 2, p. 161-169, 2011. DOI: 10.1016/j.aca.2011.05.026.

VICENTINI, F. C. et al. Factorial design and response surface: voltammetric method optimization for the determination of Ag (I) employing a carbon nanotubes paste electrode. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 825-830, 2011. DOI: 10.1590/S0100-40422011000500018.

WAHLSTRÖM, R. et al. Lignin cationization with glycidyltrimethylammonium chloride aiming at water purification applications. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 104, p. 188-194, 2017. DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.04.026.

WANG, F. et al. Discovery of discriminatory quality control markers for chinese herbal medicines and related processed products by combination of chromatographic analysis and chemometrics methods: Radix Scutellariae as a case study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 138, p. 70-79, 2017. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.02.004.

WANG, K. et al. Symmetric supercapacitors using urea-modified lignin derived N-doped porous carbon as electrode materials in liquid and solid electrolytes. **Journal of Power Sources**, Lausanne, v. 332, p. 180-186, 2016. DOI: 10.1016/j.jpowsour.2016.09.115.

WANG, X. et al. Simultaneous electrochemical determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid using a palladium nanoparticle/graphene/chitosan modified electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Lausanne, v. 695, p. 10-16, 2013. DOI: 10.1016/j.jelechem.2013.02.021.

WIELING, J. et al. Chemometrics in bioanalytical sample preparation: a fractionated combined mixture and factorial design for the modelling of the recovery of five tricyclic amines from plasma after liquid—liquid extraction prior

to high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 629, n. 2, p. 181-199, 1993. DOI: 10.1016/0021-9673(93)87033-I.

WU, A. H. et al. Relation of serum uric acid to cardiovascular disease. **International Journal of Cardiology**, Amsterdam, v. 213, p. 4-7, 2016. DOI: 10.1016/j.ijcard.2015.08.110.

XU, Y. et al. An effective high-quality prediction intervals construction method based on parallel bootstrapped RVM for complex chemical processes. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, Amsterdam, v. 171, p. 161-169, 2017. DOI: 10.1016/j.chemolab.2017.10.023.

YU, Y. et al. Selective and sensitive determination of uric acid in the presence of ascorbic acid and dopamine by PDDA functionalized graphene/graphite composite electrode. **Talanta**, London, v. 112, p. 31-36, 2013. DOI: 10.1016/j.talanta.2013.03.057.

ZHANG, R. et al. Charge transfer resistance of copper and nickel thin film electrodes in nano dimensions. **Materials Letters**, Amsterdam, v. 198, p. 61-64, 2017. DOI: 10.1016/j.matlet.2017.03.179.

ZHANG, Y.; WEI, Q. The role of nanomaterials in electroanalytical biosensors: a mini review. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Lausanne, v. 781, p. 401-409, 2016. DOI: 10.1016/j.jelechem.2016.09.011.

ZHAO, X. et al. Large-scale purification of single-wall carbon nanotubes prepared by electric arc discharge. **Diamond and Related Materials**, Amsterdam, v. 15, n. 4/8, p. 1098-1102, 2006. DOI: 10.1016/j.diamond.2005.11.002.

ZOU, C. et al. Fabrication of reduced graphene oxide-bimetallic PdAu nanocomposites for the electrochemical determination of ascorbic acid, dopamine, uric acid and rutin. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Lausanne, v. 805, p. 110-119, 2017. DOI: 10.1016/j.jelechem.2017.10.020.

ZUO, T. et al. Hyperuricemia and contrast-induced acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Cardiology**, Amsterdam, v. 224, p. 286-294, 2016. DOI: 10.1016/j.ijcard.2016.09.033.