

Sôbre a Avaliação de Parâmetros em Análises Colorimétricas

WALTER BRUNE (*)

Medições colorimétricas baseiam-se na validade da lei de Lambert-Beer. Deve-se, portanto, antes de efetuar tais medições, determinar as constantes desta lei, assim como também os limites de concentração, entre os quais ela é válida.

Em uma avaliação das constantes da Lei de Lambert-Beer, feita neste laboratório, foram encontrados valores que deixavam em dúvida a validade mencionada, apesar de contrafirmas da bibliografia conhecida (Ferri 2, Tang e Bonner 11). Foi, portanto, necessário submeter os dados achados a uma prova estatística. Como esta, juntamente com os resultados conseguidos, é, talvez, de interesse para analistas habituados com os respectivos métodos, desenvolveram-se no presente os detalhes da observação tódia.

Trata-se no caso de uma função de representação retilínea:

$$y = mx + b$$

Serão necessários, *no mínimo*, dois conjuntos de determinações ($x_i ; y_i$). Pois, dest'arte, obter-se-ão duas equações, que permitem o cálculo das incógnitas «m» e «b»:

$$m = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} \qquad b = \frac{y_1 x_2 - y_2 x_1}{x_2 - x_1}$$

Sem dúvida as medições não são absolutamente exatas, como aparentemente se apresentam neste exemplo. Pois, se assim fôsem, poder-se-ia concluir por outras medições ($x_i ; y_i$) pelos parâmetros de valor idêntico. As discrepâncias entre os diversos ($x_i ; y_i$) variam conforme a técnica e aparelhagem aplicadas (Brune 1, Nernst-Schönflies 8).

Baseado neste raciocínio, Gauss desenvolveu o método dos quadrados mínimos, do qual resultam como valores *melhores* para as constantes aqueles cuja *soma de quadrados de erros* é mínima:

(*) Eng. Agrônomo, Dr. rer. nat., Prof. do Depto. de Química da ESAV.

Na função $y = mx + b$ com as observações individuais $(x_1; y_1), (x_2; y_2) \dots (x_n; y_n)$, a expressão

$z = (y_1 - mx_1 - b)^2 + (y_2 - mx_2 - b)^2 + \dots + (y_n - mx_n - b)^2$ deve tornar-se mínima pela escolha conveniente de «m» e «b», enquanto que x_i e y_i são, pela medição, fixas.

$$\frac{\partial z}{\partial m} = -2x_1(y_1 - mx_1 - b) - 2x_2(y_2 - mx_2 - b) - \dots - 2x_n(y_n - mx_n - b) = 0 \text{ ou, em termos gerais de } x_i \text{ e } y_i:$$

$$\sum_{i=1}^n x_i (y_i - mx_i - b) = 0$$

Deduz-se igualmente:

$$\frac{\partial z}{\partial b} = -2(y_1 - mx_1 - b) - 2(y_2 - mx_2 - b) - \dots - 2(y_n - mx_n - b) = 0$$

Coordenando as duas somas, resulta:

$$m = \frac{n \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}$$

$$b = \frac{\sum y_i \sum x_i^2 - \sum x_i \sum x_i y_i}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}$$

Estas equações, que permitem calcular as constantes, carecem, entretanto, de certos requisitos de interesse para a aplicação em algumas experiências quantitativas.

Material

Em forma retilínea a lei de Lambert-Beer permite concluir da extinção pela concentração:

$$e = Ac + B \quad (')$$

na qual «e» significa a extinção, «c» a concentração (baseada em unidade de volume), sendo «A» e «B» constantes que,

(') Devido às discrepâncias entre as observações ($e_i; c_i$), o valor da constante B resulta em geral diferente de zero, mesmo que teoricamente ele seja $B = 0$. Prefere-se, entretanto, nas presentes avaliações, não forçar as apurações a favor de $B = 0$ (em $c = 0,0$) mas à custa dos valores de $c > 0,0$.

conforme a experiência em questão, variam com a temperatura, comprimento da luz monocromática, unidade de «e» e «c», etc.

Para a presente observação foi escolhida a dosagem do ácido β -indolil-acético pela reação dêste com cloreto férrico (Salkowski 9). As medidas foram feitas nas seguintes condições (Mitchell e Brunstetter 6, Tang e Bonner 11):

Leituras entre 30 e 36 minutos depois de levar os componentes à reação.

Luz monocromática por filtro M 550.

Medições com aparelho Lumetron 402 EF.

Bloqueio: 7/10

Sensibilidade: 25/5

Tubos de 14 mm de diâmetro.

Como ensaio em branco foi escolhido o próprio reagente. Êste, em comparação com água pura, apresentou uma transparência relativa de 100% para 104% daquela. As leituras são, no próprio aparelho, indicadas em porcentagens de transparência (T).

Como extinção (e) define-se aqui:

$$e = \lg \frac{100}{T}$$

O reagente de Salkowski foi preparado por diluição de 15,0 ml de FeCl_3 0,5m, com 300,0 ml de H_2SO_4 conc. ($d=1,84$), com 500,0 ml de água. A solução de ácido β -indolil-acético continha 50 mg/l.

Para as observações foram empregadas, em cada caso, 4,0 ml de reagente, quantidades variáveis do ácido β -indolil-acético, completando-se com água para 5,0 ml. Assim as concentrações apresentavam valores de $c_1 = 0,0$; $c_1 = 0,1$; $c_1 = 0,2$; . . . $c_1 = 1,0$ ml/5 ml de solução ($10^{-3}\%$).

Método

1. Em primeiro lugar foi feita a análise dos valores pelo *cálculo das constantes A e B*, conforme desenvolvimento retro.

O resultado foi o seguinte:

$$A = 0,5157$$

$$B = 0,0433$$

A equação desenvolve-se como:

$$e = 0,5157 c + 0,0433 \quad (1)$$

2. As médias (aproximadas) das extinções para cada concentração foram as seguintes:

$$c_i = 0,0 \quad 0,1 \quad 0,2 \quad 0,3 \quad 0,4 \quad 0,5 \quad 0,6 \quad 0,8 \quad 0,9 \quad 1,0$$

$$e_i = 0,000; 0,073; 0,147; 0,208; 0,270; 0,311; 0,361; 0,441; 0,500; 0,559,$$

$$\frac{\Delta e_i}{\Delta c_i} = -; 0,073; 0,074; 0,061; 0,062; 0,041; 0,050; 0,040; 0,059; 0,059.$$

O aumento, evidenciado pela última linha, não é constante. Isto se deve, certamente, à influência de uma série de fatores considerados como casuais. Um fator, porém, destaca-se por importância especial para o caso: *a obediência à lei de Lambert-Beer*. A fim de verificar, então, se o decréscimo neste aumento em concentrações maiores é legítimo ou não, alguns valores foram estudados em separado, a saber:

Fração I: entre $c = 0,0$ até $c = 0,4$

Fração II: entre $c = 0,6$ até $c = 1,0$

desta maneira foi apurado:

$$\text{Fração I: } e = 0,6557 c + 0,0103 \quad (2)$$

$$\text{Fração II: } e = 0,4917 c + 0,0596 \quad (3)$$

Realmente as constantes da equação (1) apresentam valores intercalados aos das equações (2) e (3).

3. Para conhecer o *grau de variabilidade* das constantes nas frações, foram definidas:

$$\text{como constante individual } A_i: A_i = \frac{e_i - B}{c_i} \quad (4a);$$

$$\text{como constante individual } B_i: B_i = e_i - A c_i \quad (4b),$$

sendo c_i e e_i , ainda, os valores individuais de cada par de observações. Uma vez conhecidos os valores de A_i e B_i , calcula-se a variância σ :

$$\sigma_A^2 = \frac{\sum (A_i - A)^2}{n - 1} \quad (5a); \quad \sigma_B^2 = \frac{\sum (B_i - B)^2}{n - 1} \quad (5b)$$

com «n» observações.

De acôrdo com o limite convencional ϵ_{lim} de probabilidade e «m» graus de liberdade, procura-se o valor t_{max} em tabelas adequadas (p. ex.: Koller 4). Os resultados para as frações I e II foram os seguintes:

$$\text{Fração I: } \sigma_{AI} = 0,3399; \quad \sigma_{BI} = 0,0318 \quad n_I = 41; \quad m_I = 40$$

$$\text{Fração II: } \sigma_{AII} = 0,0149; \quad \sigma_{BII} = 0,0069; \quad n_{II} = 40; \quad m_{II} = 39$$

4. Para se poder expor algo sôbre a *significância* da discrepância entre os valores de A nas duas frações, foi efetuada a divisão (Koller 4):

$$\frac{A_{\text{dif}}}{\sigma_{\text{dif}}} = t. \quad A_{\text{dif}} = A_{\text{I}} - A_{\text{II}}; \quad \sigma_{\text{dif}}^2 = \frac{\sigma_{A_{\text{I}}}^2}{n_{\text{II}}} + \frac{\sigma_{A_{\text{II}}}^2}{n_{\text{I}}}$$

Com $A_{\text{I}} = 0,6557$ e $A_{\text{II}} = 0,4917$ calcula-se

$A_{\text{dif}} = 0,1640$; $\sigma_{\text{dif}} = 0,0538$; $t = 2,9500$; $m_{\text{dif}} = n_{\text{I}} + n_{\text{II}} - 2$;
 $m_{\text{dif}} = 79$; $t_{\text{max}} = 3,10$.

$$\frac{1 - \varepsilon}{2} = 0,4984 (*) \text{ com } \varepsilon = 0,32\%.$$

Este valor encontra-se próximo dos limites convencionais (*) e realmente permite concluir que, *na presente determinação, não existe validade para a Lei de Lambert-Beer sôbre o trecho inteiro em observação.*

De acôrdo com estas apurações preferiu-se subdividir o trecho total entre $c = 0,0$ até $c = 1,0$ em três grupos, arbitrários, a saber:

Grupo I : $0,1 < c < 0,4$; $n = 40$; $m = 39$; $t_{\text{max}} = 3,20$;

Grupo II : $0,4 < c < 0,6$; $n = 30$; $m = 29$; $t_{\text{max}} = 3,28$;

Grupo III: $0,6 < c < 1,0$; $n = 40$; $m = 39$; $t_{\text{max}} = 3,20$;

Para determinar nestes a *variância das constantes*, foi, em primeiro lugar, verificada a *influência de erros* « Δe » conforme a posição dos mesmos.

Um erro « Δe » na relação $A = \frac{e - B}{c}$ causa um erro « ΔA » na apreciação de A:

$$A + \Delta A = \frac{(e + \Delta e) - B}{c} \text{ ou então } \Delta A = \frac{\Delta e}{c} \quad (6)$$

Conclui-se que o erro no cálculo de A, causado pelo erro « Δe », é *inversamente proporcional à concentração correspondente*. Logo, para ter um julgamento mais adequado, leva-se em conta a dedução anterior pela *aplicação de pesos* aos valores de A_i .

(*) por exemplo: $\varepsilon_{\text{lim}} = 0,27\%$; $\varepsilon_{\text{lim}} = 1\%$.

(') $F(t) = 0,4984$ (Koller 4).

A influência de erros « Δe » sobre B determina-se análogamente:

$$B = e - Ac; \quad B + \Delta B = (e + \Delta e) - Ac; \quad \Delta B = \Delta e;$$

A influência do erro « Δe » sobre B é *independente da posição*. Não há, então, motivo para aplicar pesos às determinações individuais em B. Foi, em conclusão, aplicado para o cálculo de A um peso p_i em cada A_i , pêsso este proporcional à concentração c:

$$p_i = \frac{c_i n}{\sum c_i}$$

A equação (5a), para a determinação da variância, modifica-se então assim:

$$\sigma_A^2 = \frac{\sum (A_i - A)^2 p_i^2}{n - 1}$$

Enfim a equação modificada apresenta-se:

$$e = (A \pm t_{\max} \sigma_A) c + (B \pm t_{\max} \sigma_B) \quad (7)$$

ou, especificado:

$$\text{Grupo I : } e = (0,6557 \pm 0,0741) c + (0,0103 \pm 0,0188)$$

$$\text{Grupo II : } e = (0,5357 \pm 0,0917) c + (0,0443 \pm 0,0395)$$

$$\text{Grupo III : } e = (0,4917 \pm 0,0458) c + (0,0596 \pm 0,0222)$$

5. Torna-se mais interessante ao analista aplicar uma equação explícita em c de modo a ler a extinção e concluir pela concentração:

$$c = \frac{e - (B \pm t_{\max} \sigma_B)}{(A \pm t_{\max} \sigma_A)}$$

Esta transformação é relativamente fácil uma vez efetivados os limites da própria equação:

$$c = e \left(\frac{1}{A \pm t_{\max} \sigma_A} \right) - \left(\frac{B \pm t_{\max} \sigma_B}{A \pm t_{\max} \sigma_A} \right)$$

Ter-se-á então:

$$\text{Grupo I } 0 < e < 0,252; c = (1,5448 \pm 0,1746) e - (0,0192 \pm 0,0308)$$

$$\text{Grupo II } 0,252 < e < 0,383; c = (1,9231 \pm 0,3292) e - (0,0982 \pm 0,0905)$$

$$\text{Grupo III } 0,383 < e < 0,6193; c = (2,0516 \pm 0,1910) e - (0,1265 \pm 0,0569)$$

Discussão

Costuma-se, em geral, estimar séries de medições pelo cálculo do coeficiente de correlação «r» e da regressão R (por exemplo Leme e Malavolta 5), podendo ser avaliado o erro de «r». Este procedimento baseia-se em um valor médio (M_c ; M_e), o qual, em casos como o presente, é diferente de zero. Desta maneira, as medições individuais, quanto mais afastadas em «c» forem de M_c , tanto mais importantes se tornam na determinação de R. Assim, também, um valor na própria ordenada ($c = 0$) é bem mais ponderante que outro próximo da média.

A aplicação de pesos p_i às medições é usual na forma

$$p_i = \frac{1}{u_i^2} \text{ para os desvios individuais } u_i \text{ (Wolf 12), e baseia-se no fato de que as diversas medições não são de igual$$

fiduciedade (Snedecor 10, Fisher 3). Em casos, como o presente, pode-se, através da equação (6) concluir que, para a constante A, uma medição torna-se mais interessante quando feita com concentração maior, pois então um erro relativo

do $\frac{\Delta e}{e}$ será menos nocivo no resultado final. Isto na suposição de que os erros absolutos « Δe » não crescem também

com a própria concentração (Mohler 7).

A correlação «r» adquire valores *que por sua vez dependem da regressão R*. Logo, se a constante A, e respectivamente R, for próxima de zero, o valor de «r» também será reduzido, e vice-versa. Aplicando-se equações do tipo (7) ter-se-á *perfeita independência na variância quanto ao percurso da reta*.

As provas de uniformidade, isto é, sobre flutuações somente casuais, convém ser feitas sempre em análises fotométricas de qualquer natureza. Uma vez que os limites convencionais de significância ficam ao critério do autor, acha-se preferível não formular resposta alternativa, decidindo se dois grupos diferem entre si com significância, mas sim, *com que probabilidade elas podem ser consideradas como amostras da mesma origem.* (')

(') O autor agradece a valiosa colaboração do Professor Néstor Carlos dos Santos, na parte dos cálculos.

Resumo

Devido à dúvida sobre a validade da lei de Lambert-Beer em uma determinada análise colorimétrica foi feita uma prova estatística dos valores numéricos achados. O método desenvolvido para esta prova foge em alguns princípios dos usuais; apresenta, entretanto, as seguintes qualificações:

1. Consideram-se as variâncias dos valores das constantes calculadas.
2. Não se estabelece limite convencional qualquer como alternativa de significância, mas sim calcula-se o grau de probabilidade de serem duas sub-divisões arbitrárias amostras da mesma origem.
3. Considera-se a influência de cada medição no total, conforme a localização da observação, pela aplicação de pesos.
4. Dá-se à equação ampliada do tipo:

$$e = (A \pm a)c + (B \pm b)$$

na qual «e» simboliza a extinção e «c» a concentração (A, B são constantes; a, b representam as variâncias), a forma explícita em «c»:

$$c = (D \pm d)e - (G \pm g)$$

Zusammenfassung

In einer bestimmten kolorimetrischen Analyse bestanden Zweifel über die Gültigkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes. Die deshalb vorgenommene statistische Untersuchung der gefundenen Werte entspricht nicht in allen Teilen der üblichen Methodik, weist aber folgende Eigenschaften auf:

1. Die Streuung der errechneten Werte für die Konstanten wird berücksichtigt.
2. Statt einer alternativen Entscheidung gemäss herkömmlicher "Sicherheitsgrenzen" wird es vorgezogen, die Wahrscheinlichkeit festzustellen, mit welcher zwei beliebige Muster des Beobachtungsmaterials den gleichen Ursprung aufweisen.
3. Um den Einfluss jeder Beobachtungsposition auf das

Gesamtergebnis berücksichtigen zu können, werden Rechnungsgewichte angebracht.

4. Der erweiterten Form der Gleichung:

$$e = (A \pm a) c + (B \pm b)$$

in welcher «e» die Extinktion und «c» die Konzentration bedeuten (A und B sind Konstanten; «a» und «b» bezeichnen Streuungen), wird eine in «c» explizite Form gegeben:

$$c = (D \pm d) e - (G \pm g)$$

Summary

The validity of the Lambert-Beer-law in a certain colorimetric analysis was doubtful. Thus the observed data were proved by statistical methods differing in some points of the usual principles, but with the following characteristics:

1. The variabilities of the calculated constants were considered.
2. Instead of alternative decisions as prescribed by convention it was preferred to evaluate the probability, with which two arbitrary groups of the total are of identical origin.
3. According to the position of the different observations were applied ponderations.
4. The enlarged form of the equation:

$$e = (A \pm a) c + (B \pm b)$$

in which «e» means extinction and «c» concentration (A and B are constants; «a» and «b» indicate variabilities) was turned explicit in «c»:

$$c = (D \pm d) e - (G \pm g)$$

Bibliografia

1. Brune W. 1949; Ceres VIII. pg. 99, Viçosa.
2. Ferri M. G. 1951; Foto-destruição do fito-hormônio ácido indolil-3-acético por compostos fluorescentes. Bol. CXVII. Bot. N° 9. Univ. S. Paulo. Fac. Fil., Ciênc-Letr.
3. Fisher R. A. 1936; Statistical Methods for Research Workers. Oliver & Boyd/Edinburgh, London.

4. Koller S. 1943; Graphische Tafeln. Steinkopff, Dresden.
5. Leme J. e Malavolta E. 1950; Determinação fotométrica do ácido ascórbico. Anais Esc. Sup. Agr. "Luiz de Queiroz". Piracicaba.
6. Mitchell, J. W. e Brunstetter B. C. 1939; Colorimetric methods for the quantitative estimation of indolil-(3)-acetic acid, Bot. Gaz. 100: 802. (citado por Ferri 2).
7. Mohler H. 1945; Optische Methoden des Chemikers. Sauerländer/Aarau.
8. Nernst Schönflies 1931; Einführung in die mathematische Behandlung der Naturwissenschaften. Oldenburg/München.
9. Salkowski E. 1885; Über das Verhalten der Skatolcarbonsäure im Organismus. Zeitschr. phys. Chem. 9, 23. (citado por Ferri 2)
10. Snedecor G. W. 1940; Statistical Methods. Iowa.
11. Tang Y. W. e Bonner J. 1947; The enzymatic inactivation of indoleacetic acid. I. Some characteristics of the enzyme contained in peaseedlings. Arch. Biochem. 13: 11. (citado por Ferri 2).
12. Wolf H. 1950; Zeitschr. Natw. 5b, pg. 188. Tübingen.
13. Youden W. J. 1951; Statistical Methods for Chemists. John Wiley & Sons/New York, London.