



Coordenação Geral de Acreditação

**EXEMPLOS DE ESTIMATIVA DE
INCERTEZA DE MEDIÇÃO
ENSAIOS QUÍMICOS**

Documento de caráter orientativo

DOQ-CGCRE-019

Revisão: 04 – ABR/ 2019

SUMÁRIO

- 1 Objetivo
 - 2 Campo de aplicação
 - 3 Responsabilidade
 - 4 Siglas
 - 5 Histórico das revisões
 - 6 Documentos de referência
 - 7 Considerações gerais
- Anexo I - Determinação da massa específica de gasolina automotiva
- Anexo II – Determinação da Incerteza do Material de Referência Certificado de Etanol em Água produzido pela Divisão de Metrologia Química (Dquim) do Inmetro
- Anexo III - Estimativa da incerteza de medição de metodologia analítica para determinação de aflatoxinas em amendoim por técnica de CLAE

1 OBJETIVO

Este documento visa apresentar exemplos de estimativa de incerteza de medição em ensaios químicos e biológicos. Embora este documento não se constitua em critério específico para a acreditação de laboratórios, ele contém informações consideradas relevantes para a elaboração e a avaliação dos procedimentos de estimativa de incerteza de medição nestas áreas.

2 CAMPO DE APLICAÇÃO

Este documento aplica-se à Dicla, aos Laboratórios de Ensaio Acreditados e postulantes à acreditação na área de química e aos avaliadores da Cgcre especialistas nestas áreas.

3 RESPONSABILIDADE

A responsabilidade pela revisão deste documento é da Cgcre/Dicla.

4 SIGLAS

Dicla	Divisão de Acreditação de Laboratórios
Cgcre	Coordenação Geral de Acreditação
Inmetro	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
CT-5	Comissão Técnica de Química

5 HISTÓRICO DAS REVISÕES

Revisão	Data	Itens revisados
3	AGO/2013	- Todo o documento foi revisto visando adequar a apresentação das equações. - Foi inserido um novo exemplo de estimativa de incerteza de metodologia analítica para determinação de aflatoxinas em amendoim por técnica de CLAE.
4	ABR/2019	- Atualizada a marca da Cgcre no cabeçalho. - O Capítulo 8 foi transformado em 3 Anexos para melhor visualização. - Atualizadas as normas ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017 e ABNT ISO/IEC GUIA 99:2014 no Capítulo 6.

6 DOCUMENTOS DE REFERÊNCIA

ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017	Requisitos Gerais para Competência de laboratórios de Ensaio e Calibração.
EURACHEM	Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. 2nd ed., 2000
INMETRO/ABNT	Guia para a Expressão da Incerteza de Medição, 2003, 3ª Ed. Brasileira do “ISO Guide to the Expression of Uncertainty in Measurements”.
ABNT ISO/IEC GUIA 99:2014	Vocabulário Internacional de Metrologia - Conceitos fundamentais e gerais e termos associados

7 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Este documento é resultado do trabalho da Comissão Técnica de Química (CT-5) que compilou exemplos sobre a estimativa de incerteza de medição para ensaios químicos e biológicos a serem considerados para a realização de serviços de ensaio pelos laboratórios acreditados e postulantes à acreditação que atuam nestas áreas (Anexos).

A CT-5 e a Dicla encontram-se abertas para receberem contribuições que venham a corrigir ou complementar este documento.

ANEXO

ANEXO I

Determinação da massa específica de gasolina automotiva

Responsável pela elaboração: Paulo Roberto Guimarães Couto, M.Sc. e Sra. Ilse Maria Guilhermino Lemos.

Instituição: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro).

Este exemplo apresenta a estimativa da incerteza de medição da massa específica de gasolina automotiva. O procedimento analítico para a medição da massa específica da gasolina segue a norma ASTM D 1298–05. Para a validação do método de medição, foram realizadas repetições diárias das medições da massa específica de uma gasolina, considerada como material de referência. Cada técnico diariamente realizou três medições no “material de referência”. Foram realizados estudos da compatibilidade entre médias e desvios padrão diariamente e entre dias. Após este estudo do método, foi realizada a medição da massa específica de uma amostra de gasolina com o estabelecimento da sua incerteza de medição. A estimativa da incerteza do resultado de medição da massa específica da gasolina seguiu as recomendações do ISO GUM 95.

A avaliação da incerteza pelo ISO GUM 95 pode ser resumida nos seguintes passos: 1) Definição do Mensurando; 2) Elaboração do Diagrama causa e efeito do mensurando; 3) Estimativa das incertezas padrão das fontes de entrada; 4) Determinação do coeficiente de sensibilidade do mensurando em relação a cada fonte de entrada; 5) Cálculo dos componentes de incerteza referentes a cada fonte de entrada; 6) Combinação dos componentes; 7) Cálculo dos Graus de Liberdade Efetivo da Incerteza Combinada; 8) Determinação do Fator de Abrangência e 9) Incerteza Expandida.

1. Procedimento analítico

1.1 Definição do mensurando

Geralmente uma norma não retrata perfeitamente o mensurando quando se objetiva estimar a sua incerteza de medição. Nestes casos, um bom entendimento do mensurando possibilita a dedução de uma equação que de alguma maneira tenha uma abrangência, onde todas as suas possíveis grandezas de base e fontes de incertezas sejam contempladas na estimativa de incerteza de medição do mensurando.

Deste modo, observando o procedimento de ensaio e também a metodologia de cálculo da massa específica da gasolina a 20 °C recomendada pelas Tabelas de Correção das Densidades e dos Volumes dos Produtos de Petróleo, 1970, a equação proposta para a medição da massa específica de uma gasolina pode ser expressa conforme a equação 1.

$$\rho_{20^{\circ}C} (g / cm^3) = \rho_{20(1)} + \left\{ \frac{[(\rho_{medida} - \rho_1) \cdot (\rho_{20(2)} - \rho_{20(1)})]}{\rho_2 - \rho_1} \right\} \quad (1)$$

Onde:

$\rho_{20^{\circ}C}$ = massa específica do produto a 20 °C;

$\rho_{20(1)}$ = 0,7893 g/cm³ (massa específica tabelada);

ρ_{medida} = 0,7852 g/cm³ (massa específica medida pelo densímetro na temperatura de 26 °C);

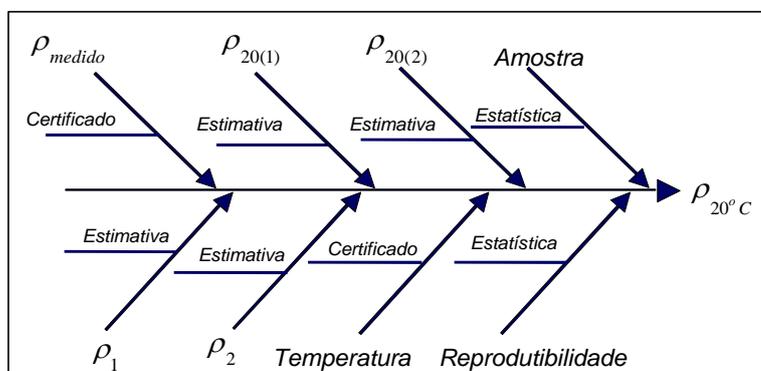
ρ_1 = 0,785 g/cm³ (massa específica tabelada);

ρ_2 = 0,786 g/cm³ (massa específica tabelada);

$\rho_{20(2)}$ = 0,7903 g/cm³ (massa específica tabelada).

1.2 Diagrama causa – efeito

Na representação do diagrama causa - efeito para a estimativa da incerteza de medição da massa específica da amostra de gasolina do estudo de caso, além das grandezas de base, devem ser consideradas as fontes de incertezas referentes à reprodutibilidade do laboratório no método de medição, e também aquela a relativa à repetibilidade de medições efetuadas na amostra. Desta forma, o diagrama causa - efeito proposto é apresentado no esquema 1:



Esquema 1 – Diagrama causa e efeito da incerteza da massa específica de uma gasolina.

1.3 Avaliação da incerteza – padrão

Com exceção das incertezas referentes à reprodutibilidade do método de medição e da repetibilidade de medição da massa específica na amostra, cujas avaliações de incerteza - padrão são do tipo A, o diagrama causa - efeito mostra que todas as outras avaliações de fontes de incerteza são do tipo B.

1.3.1 Incerteza referente à reprodutibilidade do método

Neste estudo de caso a avaliação da incerteza referente à reprodutibilidade do método de medição é calculada a partir do desvio - padrão ponderado referente aos seis dias de medição. Segundo o Guia, a estimativa de incerteza neste caso é definida pela equação 2.

$$u_{reprodutibilidade} = \frac{s_p}{\sqrt{n_t}} \quad (2)$$

Onde:

$$s_p = 0,00014 \text{ g/cm}^3 \text{ (desvio - padrão ponderado dos seis dias medição)}$$

$$n_t = 54 \text{ (número total de medições referente aos seis dias)}$$

Deste modo, no caso em estudo, a estimativa da incerteza relacionada ao desvio - padrão ponderado do método referente aos seis dias de medição é:

$$u_{reprodutibilidade} = \frac{0,00014}{\sqrt{54}} \text{ g/cm}^3 = 1,90 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^3$$

1.3.2 Incerteza referente à repetibilidade das medições na amostra

A avaliação da incerteza referente à repetibilidade das medições na amostra é definida pelo desvio padrão da média das repetições, conforme equação 3.

$$u_{\text{repetitividade}} = \frac{s_i}{\sqrt{n_i}} \quad (3)$$

Onde:

s_i = desvio - padrão das repetições de medições na amostra;

n_i = número de repetições de medições na amostra.

No estudo de caso deste documento: $s_i = 0,00010 \text{ g/cm}^3$ e $n_i = 3$. Deste modo, a equação 3 fica:

$$u_{\text{repetitividade}} = \frac{0,0001}{\sqrt{3}} \text{ g/cm}^3 = 5,8 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^3$$

1.3.3 Incertezas referentes à $\rho_{20(1)}$, ρ_1 , ρ_2 e $\rho_{20(2)}$

As avaliações das incertezas - padrão referentes a $\rho_{20(1)}$, ρ_1 , ρ_2 e $\rho_{20(2)}$ são estimadas a partir do desvio-padrão de uma distribuição retangular simétrica cujo intervalo é definido pela resolução dos seus respectivos valores apresentados nas Tabelas de Correção das Densidades e dos Volumes dos Produtos de Petróleo, 1970. Logo, segundo o Guia, estas estimativas da incerteza são definidas pela equação 4:

$$u_{\rho_i} = \frac{a}{\sqrt{3}} \quad (4)$$

Onde:

a = resolução dos valores tabelados das massas específicas.

Então, as estimativas das incertezas referentes às grandezas de entrada $\rho_{20(1)}$, ρ_1 , ρ_2 e $\rho_{20(2)}$ do caso em estudo são:

$$u_{v_i} = \frac{0,0001}{\sqrt{3}} \text{ g/cm}^3 = 5,77 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^3$$

1.3.4 Incerteza referente à ρ_{medida}

A avaliação da incerteza referente à ρ_{medida} é calculada a partir da incerteza expandida declarada no certificado de calibração do densímetro utilizado na medição. Segundo o Guia, este tipo de estimativa da incerteza é definido pela equação 5:

$$u(x_i) = \frac{U}{k} \quad (5)$$

No caso estudado: $U = 0,0003 \text{ g/cm}^3$ e $k = 2$.

Deste modo, a incerteza da fonte ρ_{medida} é:

$$u_{\rho_{medido}} = \frac{0,0003}{2} \text{ g/cm}^3 = 1,5 \times 10^{-4} \text{ g/cm}^3$$

1.3.5 Incerteza referente à temperatura

A avaliação da incerteza referente à temperatura é calculada a partir da incerteza expandida declarada no certificado de calibração do termômetro utilizado na medição. Semelhantemente à estimativa da incerteza do certificado do densímetro, o cálculo da fonte de incerteza relacionada à temperatura é realizado pela equação 5, onde, no caso estudado, $U = 0,12 \text{ }^\circ\text{C}$ e $k = 2$.

Deste modo, no caso em estudo,

$$u_{\text{Temperatura}} = \frac{0,12}{2} \text{ }^\circ\text{C} = 0,06 \text{ }^\circ\text{C}$$

1.4 Coeficientes de sensibilidade referentes às fontes de incertezas

Os coeficientes de sensibilidade da medição da massa específica da gasolina a $20 \text{ }^\circ\text{C}$, em relação às fontes de entrada $\rho_{20(1)}$, ρ_1 , ρ_2 e $\rho_{20(2)}$ e ρ_{medido} são, respectivamente, definidos e calculados pelas equações:

$$\frac{\partial \rho_{20^\circ\text{C}}}{\partial \rho_{20(1)}} = 1 - \left(\frac{\rho_{medida} - \rho_1}{\rho_2 - \rho_1} \right) = 0,8 \quad (6)$$

$$\frac{\partial \rho_{20^\circ\text{C}}}{\partial \rho_1} = \left| \frac{(\rho_1 - \rho_2) + (\rho_{medida} - \rho_1) \cdot (\rho_{20(2)} - \rho_{20(1)})}{(\rho_2 - \rho_1)^2} \right| = 0,8 \quad (6a)$$

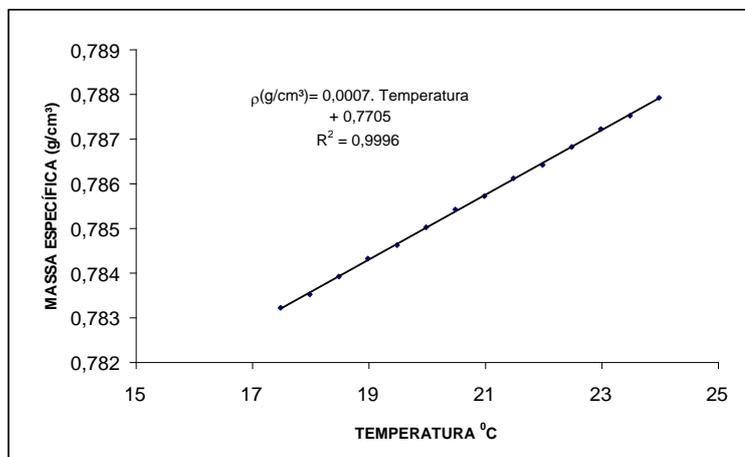
$$\frac{\partial \rho_{20^\circ\text{C}}}{\partial \rho_2} = \left| \frac{(\rho_{medida} - \rho_1) \cdot (\rho_{20(2)} - \rho_{20(1)})}{(\rho_2 - \rho_1)^2} \right| = 0,2 \quad (6b)$$

$$\frac{\partial \rho_{20^\circ\text{C}}}{\partial \rho_{20(2)}} = \left(\frac{\rho_{medida} - \rho_1}{\rho_2 - \rho_1} \right) = 0,2 \quad (6c)$$

$$\frac{\partial \rho_{20^\circ\text{C}}}{\partial \rho_{medida}} = \left(\frac{\rho_{20(2)} - \rho_{20(1)}}{\rho_2 - \rho_1} \right) = 1 \quad (6d)$$

A grandeza temperatura não figura na equação 1, a qual define o mensurando. Deste modo para o cálculo do coeficiente de sensibilidade da massa específica da gasolina em função da temperatura, utilizou-se neste caso os dados citados nas Tabelas de Correção das Densidades e dos Volumes dos Produtos de Petróleo, 1970. Com estes dados foi elaborado o gráfico 1.

Gráfico 1 - Variação da massa específica da gasolina em função da temperatura conforme



Tabelas de Correção das Densidades e dos Volumes dos Produtos de Petróleo, 1970.

No gráfico 1 são apresentados a função que define a variação da massa específica da gasolina em relação à temperatura e o valor do coeficiente de discriminação (R^2) da função escolhida o qual é igual a 0,9996. A equação apresentada pode ser representada pela equação 7:

$$\rho_{20^{\circ}C} = a \cdot \theta + b \quad (7)$$

Onde:

$\rho_{20^{\circ}C}$ = massa específica da gasolina a 20 °C;

$a = 0,0007 \text{ g/cm}^3/\text{°C}$ (coeficiente angular da reta);

$b = 0,7705 \text{ g/cm}^3$ (coeficiente linear da reta); e

θ = temperatura em °C.

Deste modo, o coeficiente de sensibilidade da massa específica referente a temperatura é definido e calculado pela equação 8.

$$\frac{\partial \rho_{20^{\circ}C}}{\partial \theta} = a = 0,0007 \frac{\text{g/cm}^3}{^{\circ}C} \quad (8)$$

1.5 Componentes de incertezas

Determinadas as incertezas de cada fonte de entrada e respectivos coeficientes de sensibilidade, as componentes de incerteza de todas as fontes para a incerteza combinada da massa específica da gasolina são calculadas e apresentadas na tabela 1:

Tabela 1- Componentes de incerteza de medição de cada fonte de entrada da incerteza combinada da massa específica da gasolina

Fonte de Incerteza	Componente (g/cm³)
Reprodutibilidade	1,91E-05
Repetitividade	5,77E-05
$\rho_{20(1)}$	4,62E-05
ρ_1	4,62E-05
ρ_2	1,15E-05
$\rho_{20(2)}$	1,15E-05
ρ_{medido} - Densímetro	1,50E-04
Temperatura	4,20E-05

1.6 Combinação das incertezas

A combinação de incertezas é realizada pela equação 9.

$$u_c(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^N [u_{xi}(y)]^2} \quad (9)$$

Onde:

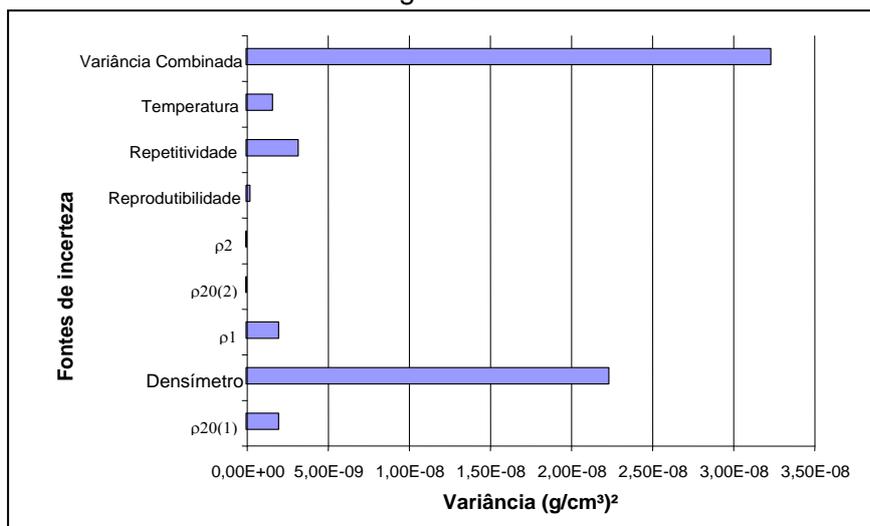
$u_{xi}(y)$ = Componentes de incerteza de medição de cada fonte de entrada da incerteza combinada, cujos valores são apresentados na tabela 1.

Aplicando-se a equação 9 aos valores do nosso estudo de caso, os quais encontram-se na tabela 1, o valor da incerteza combinada obtido é 1,803E-04 g/cm³.

1.7 Balanço das incertezas

Durante qualquer cálculo de estimativa da incerteza de medição, deve-se controlar os valores das fontes de incertezas de cada grandeza entrada com a elaboração de gráficos os quais retratam os balanços das incertezas. Neste tipo de gráfico, podem ser observadas, de maneira rápida, clara e objetiva, as fontes que predominam na incerteza de medição de um mensurando em estudo. Este modo de avaliação é importante porque se os limites de tolerância do processo específico necessitarem de uma otimização da exatidão do mensurando em questão, o gráfico indicará rapidamente e de forma orientada quais são as fontes prioritárias para a melhoria de suas respectivas exatidões de forma atender aos limites otimizados de tolerância do processo. O gráfico 2 apresenta uma avaliação deste tipo, onde são apresentadas todas as componentes de incerteza do resultado de medição da massa específica de gasolina da amostra em estudo.

Gráfico 2 – Variância combinada e suas componentes da medição da massa específica da gasolina.



Neste estudo de caso, observa-se no gráfico 2 que o valor preponderante na incerteza combinada é aquele do certificado do densímetro utilizado na medição. A incerteza referente à reprodutibilidade do método, componente que constará em qualquer medição de massa específica realizada pelo laboratório em questão, é cerca de 1,1% da incerteza combinada.

1.8 Cálculo dos graus de liberdade

O número de graus de liberdade efetivos da incerteza - padrão combinada de um mensurando é calculado pela equação de Welch Sattethrwaite, equação 10:

$$v_{eff} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^N \frac{u_i^4(y)}{v_i}} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^N \frac{[c_i \cdot u(x_i)]^4}{v_i}} \quad (10)$$

Onde:

N = número de fontes de entrada;

v_i = graus de liberdade referente a cada fonte de entrada;

$u_i(y)$ = incerteza - padrão da fonte de entrada na unidade do mensurando;

$u(x_i)$ = incerteza - padrão da fonte de entrada;

c_i = coeficiente de sensibilidade referente a cada fonte de entrada.

O número de graus de liberdade é um número inteiro. Sempre que houver números decimais no valor dos graus de liberdade efetivos, somente a parte inteira do número deve ser considerada.

Conforme o ISO GUM 95, o número de graus de liberdade de uma incerteza - padrão tipo B é considerado infinito. Deste modo, no estudo de caso deste documento, o número dos graus de liberdade efetivos da incerteza combinada $u_c(\rho_{20})$ é definido pela equação 11:

$$v_{eff} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^N \frac{u_i^4(y)}{v_i}} = \frac{1,06 \times 10^{-15}}{(5,54 \times 10^{-18} + 3,4 \times 10^{-21})} = 189 \quad (11)$$

1.9 Determinação do Fator de abrangência

O fator de abrangência (“ k ”) é definido a partir da distribuição t de Student e o mesmo depende da probabilidade de abrangência, geralmente de 95%, e do número dos graus de liberdade efetivos da incerteza - padrão combinada $u_c(y)$ do mensurando. No caso estudado, para uma probabilidade de 95% e com os números de graus de liberdade efetivo igual a 189 o fator de abrangência (k) é igual a 1,972.

1.10 Estimativa da incerteza expandida

Eventualmente, a incerteza - padrão combinada $u_c(y)$ pode ser utilizada para expressar a incerteza em um resultado de medição. Porém, em algumas aplicações comerciais, industriais, regulamentares e quando a segurança e a saúde estão em foco, se faz necessária a declaração de uma incerteza que defina um intervalo em torno do resultado de medição. Espera-se que este intervalo englobe uma grande porção da distribuição de valores que podem razoavelmente ser atribuídos ao mensurando. A incerteza expandida U , para uma determinada probabilidade de abrangência p , é estimada pela equação 11:

$$U = k_{(p,v)} \cdot u_c(y) \quad (11)$$

No estudo de caso deste documento, a incerteza expandida é calculada pela equação 12:

$$U = 1,972 \times (1,80 \times 10^{-4} \text{ g/cm}^3) = 3,6 \times 10^{-4} \text{ g/cm}^3 \quad (12)$$

1.11 Resultado da Medição

Neste estudo de caso, a declaração do resultado de medição é:

$$\rho_{20^\circ C} = (0,78950 \pm 0,00036) \text{ g/cm}^3; k = 1,972; p = 95\%$$

A tabela 2 apresenta a compilação de todos os valores das componentes da estimativa da incerteza no resultado de medição da amostra de gasolina do estudo de caso deste documento.

Tabela 2 - Compilação de todas as componentes de incerteza do resultado de medição da amostra de gasolina do estudo de caso deste documento.

Fontes de Incerteza	Valor	Distribuição	Divisor	Coef. Sensibilidade	Incerteza g/cm ³	Graus de liberdade
Limite inferior da densidade corrigida $\rho_{20(1)}$	0,0001 g/cm ³	retangular	$\sqrt{3}$	0,8	4,62E-05	∞
Certificado do densímetro ρ_{medida}	0,0003 g/cm ³	normal	2	1	1,50E-04	∞
Limite inferior da densidade observada ρ_1	0,0001 g/cm ³	retangular	$\sqrt{3}$	0,8	4,62E-05	∞
Limite superior da densidade corrigida para 20 °C $\rho_{20(2)}$	0,0001 g/cm ³	retangular	$\sqrt{3}$	0,2	1,15E-05	∞
Limite superior da densidade observada ρ_2	0,0001 g/cm ³	retangular	$\sqrt{3}$	0,2	1,15E-05	∞
Certificado de calibração do termômetro	0,12°C	normal	2	0,0007 (g/cm ³)C ⁻¹	4,20E-05	∞
Repetibilidade da Amostra	0,0001 g/cm ³	normal	$\sqrt{3}$	1	5,77E-05	2
Reprodutibilidade do método	0,000019 g/cm ³	normal	1	1	2,01E-05	48
Incerteza Combinada		normal			1,80E-04	189
Incerteza Expandida (95%, k=1,972)		normal			3,6E-04	189

Referências Bibliográficas

- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS STANDARDS. Standard Test Method for Density, Relative Density (Specific Gravity), or API Gravity of Crude Petroleum and Liquid Petroleum Products by Hydrometer Method. Designation: Manual of Petroleum Measurement Standards(MPMS).2005.6p.(ASTM 1298-05)
 - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Guia para a Expressão da Incerteza de Medição. ISO GUM 95. Terceira Edição Brasileira Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement. Rio de Janeiro :ABNT , INMETRO. Edição Revisada. Agosto de 2003.120p.
 - CONSELHO NACIONAL DO PETRÓLEO.INSTITUTO DE PESOS E MEDIDAS. Tabelas de Correção das Densidades e dos Volumes dos Produtos de Petróleo.1970.Petróleo Brasileiro S.A. (PETROBRAS)
 - ISO/IEC Guide 99. *International Vocabulary of Metrology – Basic and General Concepts and Associated Terms (VIM)*. 2007.
 - COUTO, P.; GUILHERMINO, I. Uncertainty of Measurement Results in Fuel Analysis. 2002. RETERM - Revista de Engenharia Térmica, edição especial 2002, Vol.2. p38 -43
 - Couto, Paulo Roberto Guimarães –“Estimativa da incerteza da massa específica da gasolina pelo ISO GUM 95 e método de Monte Carlo e seu impacto na transferência de custódia”. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2006.
-

ANEXO II

Determinação da Incerteza do Material de Referência Certificado de Etanol em Água produzido pela Divisão de Metrologia Química (Dquim) do Inmetro

Responsável pela elaboração: Janaína Marques Rodrigues e Marcus Vinicius Barreto Sousa.

Instituição: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro).

1. Introdução

No processo de certificação de um material de referência é essencial a determinação com confiabilidade da grandeza certificada e da incerteza de medição do processo. O material de referência certificado de etanol em água desenvolvido pela Dquim tem por objetivo fornecer confiabilidade nas verificações dos etilômetros (bafômetros) empregados na medição do teor de álcool expirado pelos pulmões de condutores de veículos.

Este material composto de etanol diluído em água é preparado em cinco frações mássicas diferentes, utilizando-se para isso uma metodologia primária denominada gravimetria. Esta metodologia consiste, de acordo com cada uma das frações mássicas almeçadas, na pesagem de frascos separados da massa alvo de etanol e da massa alvo de água, com posterior mistura destes.

Na Tabela 1, estão apresentadas as frações mássicas de etanol que são produzidas pelo Inmetro/Dquim.

Tabela 1: Frações mássicas em que são produzidos os MRC de etanol em água.

[1]	0,0509%*
[2]	0,0814%
[3]	0,1069%
[4]	0,3820%
[5]	0,4960%

* %: g etanol/100 g solução

A preparação e certificação deste MR foram desenvolvidas segundo as orientações dos ISO Guides 31, 34 e 35.

A preparação do MRC é realizada em galões de cinco litros, estes são, após 16 h em repouso, homogeneizados por 1 h, através de agitação magnética, e, em seguida, subdivididos em garrafas de 0,5 L. Cada galão é subdividido em 9 garrafas de 0,5 L.

A certificação deste MR compreende duas etapas. A primeira etapa é correspondente ao estabelecimento do valor da fração mássica de etanol a ser certificada e a segunda é referente à estimativa da incerteza de medição. A fração mássica de etanol certificada para cada garrafa de 0,5 L é estabelecida através da gravimetria, com base no preparo do galão de 5 L. No entanto, o valor da fração mássica de etanol obtida pelo método gravimétrico é avaliado através da comparação com o resultado de uma análise cromatográfica. Assim, das nove garrafas obtidas de um galão, três garrafas, representativas do lote, são analisadas por cromatografia gasosa com detecção por ionização por chama. A homogeneidade entre estas garrafas e no interior de cada garrafa é verificada através de análise de variância (ANOVA) e a diferença percentual da fração mássica de etanol obtida por análise cromatográfica para cada uma das três garrafas em relação ao valor gravimétrico da preparação do galão não deve ser superior a 1%. Uma vez que os dois critérios são atendidos simultaneamente, ou seja, que as três garrafas analisadas sejam homogêneas entre si e que a diferença percentual da fração mássica de etanol obtida através da análise cromatográfica em comparação ao valor da fração mássica de etanol obtida pelo método gravimétrico seja inferior a 1%, o material de referência pode ser certificado.

Em anexo, segue o organograma das etapas de produção, quantificação e certificação do MRC.

2. Procedimento

2.1

Mensurando: Fração mássica de etanol ([ETOH]).

Matriz: Água.

Equação para a estimativa do valor do mensurando (Equação 1):

$$[ETOH] = \frac{m_{ETOH}}{(m_{ETOH} + m_{\text{água}})} \times p \times eva \quad (1)$$

Onde:

m_{ETOH} : massa de etanol pesada;

$m_{\text{água}}$: massa de água pesada;

p : pureza;

eva : Fator de evaporação.

2.2 O preparo da amostra consiste na pesagem individual da massa de etanol e da massa de água. Em seguida, o frasco contendo etanol é colocado dentro do galão de 5 L que contém a água. A solução composta por etanol e água é então deixada em repouso por 16 h, sendo posteriormente agitada por 1 h para a completa homogeneização. Após este período, o conteúdo do galão é transferido para 9 garrafas de 0,5 L. As balanças utilizadas são calibradas pelo Laboratório de Massas do Inmetro.

A Tabela 2 apresenta os valores para a quantificação da fração mássica de um galão preparado na fração mássica alvo de 0,0509 %.

Tabela 2: Dados utilizados na estimativa da fração mássica de etanol.

Massa de etanol pesada	2,49511 g
pureza	0,99953406
Fator de evaporação	1
Massa de água pesada	4897,5 g

Substituindo-se os dados da Tabela 2 na Equação 1 tem-se:

$$[ETOH] = \frac{2,49511}{4897,5 + 2,49511} \times 0,99953406 \times 1$$

$$[ETOH] = 0,0508969\%$$

2.3 As fontes de incerteza que afetam o valor do mensurando são provenientes do processo de preparo do material de referência, sendo aquelas expressas na Equação 1, além da incerteza inerente à homogeneidade do material e à estabilidade do transporte e do armazenamento do MRC. O diagrama de causa e efeito está apresentado na Figura 1.

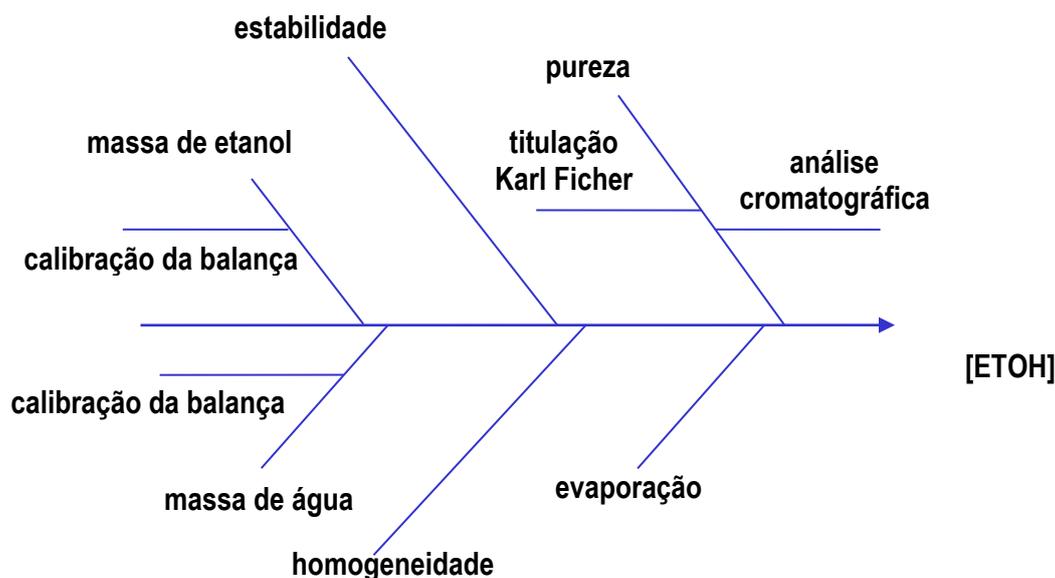


Figura 1: Diagrama de causa e efeito para a estimativa da incerteza de medição do MRC de etanol em água.

2.4 Identificadas as grandezas de influência, deve-se então iniciar o cálculo da incerteza para o MRC. A incerteza expandida, U_{MRC} , é expressa pela Equação 2.

$$U_{MRC} = k \times u([ETOH]) \quad (2)$$

Onde:

k : fator de abrangência para um nível de confiança de 95%;

$u([ETOH])$: incerteza padrão combinada da fração mássica de etanol.

O fator de abrangência k só é calculado caso a incerteza dominante seja tipo A, caso esta incerteza seja tipo B, considera-se o valor de k equivalente a 2, uma vez que assume-se que o grau de liberdade do sistema é infinito.

O valor de k é obtido a partir da estimativa do grau de liberdade efetivo do sistema, calculado pela Equação 3:

$$v_{eff} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^N \frac{u_c^4(y)}{v_i}} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^N \frac{(u(x_i) \times c_i)^4}{v_i}} \quad (3)$$

Onde N é o número de grandezas de entrada e v_i é o grau de liberdade da grandeza x_i . Depois de calculado o v_{eff} , estima-se o valor de k , utilizando-se para isto uma tabela de graus de liberdade efetivo.

A incerteza padrão combinada da fração mássica de etanol é calculada com a combinação das incertezas expressas no diagrama de causa e efeito, aplicando-se a Equação 4:

$$U_{MRC} = k \times \sqrt{u^2(carac.) + u^2(homog.) + u^2(transp.) + u^2(armaz.)} \quad (4)$$

Onde:

$u(carac.)$: incerteza inerente à caracterização;

$u(homog.)$: incerteza inerente à homogeneidade;

$u(transp.)$: incerteza inerente ao transporte;

$u(armaz.)$: incerteza inerente ao armazenamento.

Na Equação 4, temos quatro fontes de incertezas a serem calculadas para depois serem combinadas. Então, a fim de tornar o cálculo mais compreensivo, deve-se desmembrá-lo nos seguintes tópicos.

2.4.1 Cálculo para incerteza inerente à caracterização

A incerteza da caracterização pode ser calculada com a combinação das incertezas das grandezas utilizadas para o cálculo da fração mássica real utilizando-se a Equação 5. Esta expressão pode ser desmembrada, a fim de facilitar o cálculo, nos seguintes tópicos:

$$u(carac.) = \sqrt{u^2(mETOH) + u^2(magua) + u^2(p) + u^2(eva)} \quad (5)$$

2.4.2 Cálculos de incerteza para as massas pesadas

Estas incertezas são do tipo B.

Neste cálculo aplica-se a Equação 6, baseada na incerteza emitida no certificado de calibração das balanças.

$$u(m.pesada) = \frac{U_{certificado}}{k_{certificado}} \quad (6)$$

2.4.2.1.a) massa de etanol pesada

$$u(mETOH) = \frac{U_{certificado}}{k_{certificado}} = \frac{0.00002}{2} = 0.00001$$

2.4.2.1.b) massa de água pesada

$$u(magua) = \frac{U_{certificado}}{k_{certificado}} = \frac{0.1}{2} = 0.05$$

2.4.2.2 Cálculo para incerteza da pureza do etanol

A incerteza inerente à pureza do etanol é determinada experimentalmente, sendo, portanto uma incerteza do tipo A.

Para a estimativa da incerteza referente à pureza do etanol utilizado no preparo do MRC, são utilizadas duas metodologias: sendo uma a análise cromatográfica através do detector de ionização por chama, a qual não contabiliza o teor de água presente no etanol e a titulação automática Karl Fischer coulométrica, onde é determinado o teor de água no etanol.

Com os valores obtidos através das análises, pode-se calcular o valor desta incerteza utilizando-se a Equação 7.

$$u(p) = \sqrt{(uV_{cromat.})^2 + (uV_{KarlFischer})^2} \quad (7)$$

Desmembrando a Equação 7, obtêm-se a Equação 8, onde a incerteza da pureza é calculada através da combinação de duas razões, uma onde um desvio padrão combinado (s) é dividido pela raiz quadrada do número de experimentos (método cromatográfico) e a outra onde um desvio padrão amostral é dividido pela raiz quadrada do número de experimentos (Karl Fischer).

$$uV_{cromat} \dots ou \dots uV_{KarlFischer} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (8)$$

No cálculo da pureza do etanol através do método cromatográfico, utiliza-se um desvio padrão combinado porque são realizados dois tipos de análise cromatográfica. Os tipos de análise se diferem na coluna que é utilizada, em um caso se utiliza uma coluna polar e no outro uma coluna apolar.

Neste caso, como ambos os desvios das injeções realizadas pelo cromatógrafo foram nulos, o cálculo da incerteza refere-se apenas aos valores obtidos pela titulação Karl Fisher.

$$uV_{cromat} = uV_{KarlFischer} = \frac{S}{\sqrt{n}} = \frac{6,35 \times 10^{-5}}{\sqrt{12}} = 1,83326 \times 10^{-5}$$

É importante ressaltar que a determinação da pureza do etanol é realizada para cada nova garrafa de etanol utilizada e para cada novo processo, neste caso pode-se ainda utilizar a mesma garrafa de etanol.

2.4.2.3 Cálculo para a incerteza da evaporação

A estimativa da incerteza da evaporação do etanol foi determinada experimentalmente. No entanto, os dados obtidos neste estudo (Tabela 3) são utilizados em todos os processos de forma que ela passa a ser considerada como uma incerteza do tipo B.

A incerteza da evaporação é calculada através da razão de um desvio padrão combinado ($s_{comb.}$) pela raiz quadrada do número de experimentos (Equação 9). O desvio padrão combinado é obtido com o estudo da evaporação do etanol realizado por três técnicos distintos em dois dias diferentes. Cada técnico efetuou duas medições em cada dia.

$$u_{eva} = \frac{s_{comb.}}{\sqrt{n}} \quad (9)$$

Tabela 3: Dados obtidos no experimento para a estimativa da evaporação.

Técnico	%Evaporação/100			
	1º dia	2º dia	Desvio padrão	(Desvio padrão) ²
1	$3,10169 \cdot 10^{-5}$	$4,90334 \cdot 10^{-5}$	$1,27396 \cdot 10^{-5}$	$1,62299 \cdot 10^{-10}$
2	$2,86552 \cdot 10^{-5}$	$1,82363 \cdot 10^{-5}$	$7,36727 \cdot 10^{-6}$	$5,42766 \cdot 10^{-11}$
3	$6,5264 \cdot 10^{-6}$	$8,98641 \cdot 10^{-5}$	$5,89286 \cdot 10^{-5}$	$3,47258 \cdot 10^{-9}$

$$s_c = \sqrt{\frac{\sum (\text{Desvio padrão})^2 \cdot (n_i - 1)}{n_1 + n_2 + n_3 - N}} =$$

$$s = \sqrt{\frac{(1,62299 \cdot 10^{-10} + 5,42766 \cdot 10^{-11} + 3,47258 \cdot 10^{-9}) \times (2-1)}{3}} = 3,50673 \cdot 10^{-5}$$

$$u_{eva} = \frac{3,50673 \cdot 10^{-5}}{\sqrt{6}} = 1,43162 \cdot 10^{-5} \%$$

Calculadas todas as incertezas necessárias para a incerteza da caracterização, deve-se realizar a combinação destas através da Equação 10. A Equação 10 apresenta o cálculo através do método relativo. É importante ressaltar que para que a metodologia de estimativa da incerteza de medição pelo método relativo possa ser empregada usualmente no laboratório, foi realizada a comparação dos resultados da estimativa através dos métodos relativo e clássico, os quais demonstraram serem equivalentes.

No método relativo, as componentes da incerteza são divididas pela grandeza de entrada, a fim de que estas fiquem adimensionais. Logo, a combinação através da soma das componentes estará expressa adimensionalmente, necessitando serem posteriormente normalizadas para a unidade do mensurando. Esta normalização ocorre através da multiplicação da incerteza padrão combinada na forma relativa pelo valor do mensurando, no caso, a fração mássica de etanol. Esta normalização é expressa na Equação 10.

$$u(carac.) = [ETOH] \times \sqrt{\left(\frac{u(mETOH)}{mETOH}\right)^2 + \left(\frac{u(magua)}{magua}\right)^2 + \left(\frac{u(p)}{p}\right)^2 + \left(\frac{u(eva)}{eva}\right)^2} \quad (10)$$

Substituindo-se os valores para cada um dos termos da Equação 10, tem-se a incerteza inerente à caracterização.

$$u(carac.) = [0,0508969] \times \sqrt{\left(\frac{0,00001}{2,49511}\right)^2 + \left(\frac{0,05}{4897,5}\right)^2 + \left(\frac{0,000018333}{0,99953406}\right)^2 + \left(\frac{0,0000143162}{0,999751539}\right)^2}$$

$$u(carac.) = 1,30929 \cdot 10^{-6} \%$$

2.4.3 Cálculo para a Incerteza Inerente à Homogeneidade

A estimativa da incerteza inerente à homogeneidade é feita através de análise de variância (ANOVA) segundo a ISO Guide 35.

Para o caso em que a média quadrática entre as garrafas for maior que a média quadrática dentro de cada garrafa ($MQ_{entre} > MQ_{dentro}$), a incerteza inerente à homogeneidade é calculada segundo a Equação (11).

$$u(\text{homog}) = \sqrt{\left(\frac{MQ_{\text{entre}} - MQ_{\text{dentro}}}{n}\right)} \quad (11)$$

Onde:

n : número total de replicatas.

Para os casos em que $MQ_{\text{entre}} < MQ_{\text{dentro}}$, utiliza-se a Equação 12.

$$u(\text{homog}) = \sqrt[4]{\left(\frac{MQ_{\text{dentro}}}{n}\right) \times \frac{2}{df_{\text{dentro}}}} \quad (12)$$

Onde:

df_{dentro} : graus de liberdade no interior de uma garrafa.

No caso do MRC de etanol em água, a $MQ_{\text{entre}} > MQ_{\text{dentro}}$, sendo calculada para o exemplo em questão através da Equação 13.

$$u(\text{homog}) = \sqrt{\frac{1,4041 \cdot 10^{-8} - 6,62434 \cdot 10^{-9}}{2}} = 6,09 \cdot 10^{-5} \% \quad (13)$$

2.4.4 Cálculo para a Incerteza Inerente à Estabilidade

A incerteza inerente à estabilidade é composta pela incerteza correspondente ao transporte do MRC (transporte do produtor até o cliente) e pela incerteza referente ao armazenamento do MRC.

Este cálculo de incerteza depende da realização de estudos de estabilidade de longa e de curta duração, onde são simulados, respectivamente, o armazenamento e o transporte do material. Durante o estudo de longa duração, as amostras devem ser colocadas em pelo menos duas temperaturas, a temperatura de referência, na qual se considera que o material não sofra alterações que afetem o mensurando, e na temperatura em que se propõe que o material seja armazenado, devendo ser realizadas análises periódicas. No estudo de curta duração, as amostras também são submetidas à temperatura de referência e em pelo menos uma temperatura que simule a condição de transporte do material. No final do tempo de estudo requerido, as análises são realizadas a fim de se verificar se os valores de frações mássicas obtidos não sofreram variação no período do estudo. O ISO Guide 35 recomenda duas metodologias para a realização deste estudo, uma é o método clássico e a outra o método isócrono. No método clássico, as análises são realizadas sob condições de reprodutibilidade, já no método isócrono, as análises são realizadas sob condições de repetibilidade. Por esta razão, o método isócrono conduz a incertezas menores que o método clássico.

Nas duas metodologias, deve-se fazer uma análise inicial com tempo inicial de estudo igual a zero ($t=0$). Com o resultado obtido através destas análises (Tabela 4) é realizada uma análise de regressão, onde se avalia se a reta obtida não possui uma regressão significativa, o que indica que o valor do mensurando, no caso a fração mássica de etanol, não variou com o tempo nas condições estudadas.

Tabela 4: Dados do estudo de estabilidade de curta duração.

Etanol	Número de dias na estufa			
	0	2	4	7
%				
[1]	0,0507	0,0507	0,0508	0,0507
[1]	0,0507	0,0508	0,0506	0,0507
[2]	0,0891	0,0888	0,0892	0,0889
[2]	0,0891	0,0890	0,0893	0,0892
[3]	0,1155	0,1158	0,1155	0,1157
[3]	0,1155	0,1155	0,1154	0,1153
[4]	0,3887	0,3893	0,3898	0,3885
[4]	0,3887	0,3909	0,3905	0,3909
[5]	0,4576	0,4587	0,4591	0,4588
[5]	0,4576	0,4577	0,4583	0,4567

Para o caso do MRC de etanol em água, a temperatura de referência utilizada em ambos os estudos foi $(4,0 \pm 0,4)$ °C. A temperatura utilizada no estudo de longa duração foi de $(20,0 \pm 0,2)$ °C e a utilizada no estudo de curta duração foi $(60,0 \pm 0,5)$ °C. É importante ressaltar que as estufas utilizadas para os estudos foram calibradas por um laboratório acreditado pela Cgcre, assim como os termohigrômetros utilizados são calibrados pelo Laboratório de Higrometria da Divisão de Metrologia Térmica do Inmetro.

O ISO Guide 35 recomenda que o cálculo da estimativa da incerteza da estabilidade seja calculado com base nas seguintes Equações:

Modelo Empírico:

$$y = b_1x + b_0 \quad (14)$$

y : mensurando ([ETOH])

x : tempo

b_1 : inclinação da reta $\Rightarrow b_1 \approx 0$

b_0 : intercepto, em $x = 0 \Rightarrow b_0 = \text{mensurando ([ETOH])}$

Desmembrando a equação da reta obtêm-se as Equações 15 e 16:

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (15)$$

$$b_0 = \bar{y} - b_1\bar{x} \quad (16)$$

Onde:

x_i = valores de dias na estufa

\bar{x} = média de dias na estufa

y_i = valores de fração mássica obtidos

\bar{y} = média de valores de fração mássica obtidos

A Tabela 5, calculada com base nos dados da Tabela 4, apresenta os valores a serem empregados nas Equações 15 e 16.

Tabela 5: Valores para a estimativa do estudo de estabilidade de curta duração.

Dados para os cálculos					
[1]	[1]	y_i	\bar{y}	x_i	\bar{x}
0,0507	0,0507	0,0507	0,050713	0	3,25
0,0507	0,0508	0,05075		2	
0,0508	0,0506	0,0507		4	
0,0507	0,0507	0,0507		7	

Logo, realizando-se os cálculos através das Equações 15 e 16, tem-se os dados da Tabela 6.

Tabela 6: Valores para a estimativa do estudo de estabilidade de curta duração - continuação.

$y_i - \bar{y}$	$x_i - \bar{x}$	$(y_i - \bar{y})(x_i - \bar{x})$	$(x_i - \bar{x})^2$
$-1,25 \cdot 10^{-5}$	-3,25	$4,0625 \cdot 10^{-5}$	10,5625
$3,75 \cdot 10^{-5}$	-1,25	$-4,6875 \cdot 10^{-5}$	1,5625
$-1,25 \cdot 10^{-5}$	0,75	$-9,375 \cdot 10^{-6}$	0,5625
$-1,25 \cdot 10^{-5}$	3,75	$-4,6875 \cdot 10^{-5}$	14,0625

Aplicando-se as Equações 15 e 16, obtém-se:

$$b_1 = -2,33645 \cdot 10^{-6} \text{ e } b_0 = 0,050720093$$

Calculada a equação da reta ($y = -2,33645 \cdot 10^{-6} \cdot x + 0,050720093$, onde y = fração mássica de etanol e x é o tempo), deve-se aplicar a Equação 17 para o cálculo da incerteza referente à estabilidade.

$$u = S_{b_1} \times t \quad (17)$$

Onde o fator S_{b_1} pode ser calculado utilizando-se as Equações 18 e 19, como demonstrado na Tabela 7:

$$S_{b_1} = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (18)$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - b_0 - b_1 x_i)^2}{n - 2}} \quad (19)$$

Tabela 7: Dados para o cálculo da incerteza da estabilidade de curta duração – continuação.

Dias (x)	[ETOH] (y)	$(y_i - b_0 - b_1 x_i)^2$
0	0,0507	$4,03747 \cdot 10^{-10}$
2	0,05075	$1,19574 \cdot 10^{-9}$
4	0,0507	$1,15512 \cdot 10^{-10}$
7	0,0507	$1,3975 \cdot 10^{-11}$
Somatório		$1,72897 \cdot 10^{-9}$
n-2		2
s^2		$8,64486 \cdot 10^{-10}$
s		$2,94021 \cdot 10^{-5}$
s_{b_1}		$5,68482 \cdot 10^{-6}$

Para se avaliar estatisticamente se o material encontra-se estável, o ISO Guide 35 recomenda que o valor absoluto da inclinação da reta b_1 seja menor que o produto do desvio padrão associado à inclinação da reta (s_{b_1}) pelo fator t de Student, para n-2 graus de liberdade e um nível de confiança de 95 %, conforme apresenta a Equação 20.

$$b_1 < t_{0,95;n-2} \cdot S_{b_1} \quad (20)$$

Sendo o fator t de Student para este estudo equivalente a 4,30, comprova-se que o material de referência demonstrou-se estável nas condições estudadas.

Calculado o fator s_{b_1} , basta multiplicá-lo pelo fator tempo e teremos a incerteza referente à estabilidade do MRC. Para este caso específico (Equação 21), está exemplificada a incerteza referente ao transporte das amostras.

$$u = s_{b_1} \times t = 5,68482 \cdot 10^{-6} \times 7 = 3,97938 \cdot 10^{-5} \quad (21)$$

Para o cálculo das outras frações mássicas e do estudo de estabilidade de longa duração, basta utilizar este mesmo modelo de equações.

2.5 Calculadas todas as fontes de incerteza do material, utiliza-se a Equação 4 para o cálculo da incerteza padrão combinada da fração mássica de etanol. Na Tabela 8, estão ordenados todos os valores das componentes de incerteza calculadas anteriormente, e, em seguida, a combinação destes valores.

Tabela 8: Fontes de Incerteza para a Certificação do Material de Referência Etanol em água.

Fontes de incerteza	Incertezas das grandezas de entrada (%p/p)	Tipo
$u(\text{homog.})$	$6,08961 \cdot 10^{-5}$	A
$u(\text{armaz.})$	$3,36665 \cdot 10^{-4}$	B
$u(\text{transp.})$	$3,97938 \cdot 10^{-5}$	B
$u(\text{carac.})$	$1,30929 \cdot 10^{-6}$	B

Substituindo os valores da Tabela 8 no conjunto de equações abaixo, que refletem as Equações 2 e 4, tem-se o valor da incerteza padrão combinada da fração mássica de etanol.

$$U_{MRC} = k \times \sqrt{u^2(\text{carac.}) + u^2(\text{homog.}) + u^2(\text{transp.}) + u^2(\text{armaz.})}$$

$$U_{MRC} = 2 \times \sqrt{(1,30929 \cdot 10^{-6})^2 + (6,08961 \cdot 10^{-5})^2 + (3,97938 \cdot 10^{-5})^2 + (0,000336665)^2}$$

$$U_{MRC} = 2 \times 0,000344437 = 0,000688874$$

$$U_{MRC} = 0,00069\%$$

Para o cálculo da incerteza expandida, deve-se analisar, na Tabela 8, se a fonte de incerteza dominante é tipo A ou tipo B. Neste caso é do tipo B, pois o valor da incerteza de estabilidade de armazenamento é a dominante, sendo proveniente de um estudo realizado anteriormente ao ensaio em si. Sendo a incerteza dominante do tipo B, o valor do fator de abrangência é equivalente a 2.

2.6 Valor certificado

[ETOH] = (0,05090 ± 0,00069) %

[ETOH] = (0,05090 ± 0,00069) g etanol/100g solução

3 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT ISO GUIA 31. *Materiais de referência – Conteúdo de certificados e rótulos*, 2004.
 - ISO Guide 35. *Reference materials – General and statistical principles for certification*, 2006.
 - ISO Guide 34. *General requirements for the competence of reference material producers*, 2009.
 - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Guia para a Expressão da Incerteza de Medição. ISO GUM 95. Terceira Edição Brasileira Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement. Rio de Janeiro:ABNT , INMETRO. Edição Revisada. Agosto de 2003.120p.
 - Souza, V; Rodrigues, J. M.; Bandeira, R. D. C. C.; Valente, L. A. N.; Sousa, M. V. B.; Da Silva, V. F.; Da Silva, R. A. L. Evaluation of the stability of ethanol in water certified reference material: measurement uncertainty under transport and storage conditions. *Accreditation and Quality Assurance*, 2008, 13, 717–721.
-

ANEXO III

Estimativa da incerteza de medição de metodologia analítica para determinação de aflatoxinas em amendoim por técnica de CLAE

Responsável pela elaboração: André Victor Sartori, Rosana Pereira dos Santos, Maria Heloisa Paulina de Moraes e Marcus Henrique Campino de la Cruz.

Instituição: INCQS/FIOCRUZ

As aflatoxinas constituem um grupo de micotoxinas formadas como produtos secundários no metabolismo de alguns fungos, sendo consideradas importantes contaminantes de alimentos devido ao elevado potencial tóxico e por serem encontradas com grande ocorrência. Assim, a utilização de métodos analíticos confiáveis, bem como a rastreabilidade dos resultados assegurada através da estimação da incerteza de medição, são indispensáveis na avaliação da conformidade de alimentos quanto à contaminação por aflatoxinas.

Este estudo apresenta uma prática descrição da metodologia utilizada na estimativa da incerteza de medição de um método analítico empregado na quantificação de aflatoxinas em amendoim. O método analítico baseia-se na extração das aflatoxinas com solução de metanol, seguido de *clean-up* do extrato com coluna de imunoafinidade e análise por técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência com derivação pós-coluna. A quantificação dos analitos foi realizada por padronização externa. Na estimativa da incerteza de medição, a abordagem conhecida como *bottom-up* foi empregada, levando em consideração as principais fontes de incerteza da metodologia analítica.

1 Materiais e Métodos

1.1 Equipamento

As análises foram realizadas empregando um sistema CLAE equipado com módulo para derivação pós-coluna e detector por fluorescência.

1.2 Soluções padrão e curvas de calibração

As concentrações das soluções padrão das aflatoxinas de interesse (B1, B2, G1 e G2) são determinadas por espectrofotômetro de UV empregando os coeficientes de absorvidade molar específicos de cada aflatoxina (AOAC, 2005). Após preparo de mistura contendo as quatro aflatoxinas, diluições seriadas são realizadas para construção das curvas de calibração.

1.3 Preparo das amostras

O procedimento de preparo das amostras utilizado nesse estudo é baseado em método oficial adotado pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2005). Neste procedimento, as amostras ($m_{amostra}$) são extraídas através da agitação com solução de metanol ($V_{extração}$). Após etapa de filtração, uma alíquota do extrato (V_{p1}) é diluído com água deionizada (V_{p2}) e o extrato diluído é então eluído em coluna de imunoafinidade (V_{p3}). Após a eluição do extrato, a coluna é lavada com água e então as aflatoxinas são eluídas com metanol. O extrato é recolhido em balão volumétrico (V_{eluato}) e analisado por técnica de CLAE/F.

1.4 Quantificação das Aflatoxinas nas amostras

A concentração de aflatoxina na amostra (ng/g) foi determinada pela razão da massa de aflatoxina quantificada no eluato ($m_{AflaEluato}$) e a massa de amostra no eluato ($m_{MatrizEluato}$) de acordo com a equação a seguir (Equação 1):

$$C_{Afla(ng/g)} = \left(\frac{m_{AflaEluato}}{m_{MatrizEluato}} \right) \quad (1)$$

Sendo a $m_{AflaEluato}$ determinada através da regressão linear (Equação 2):

$$Y = b_1 \times \frac{m_{AflaEluato}}{V_{eluato}} - b_0 \quad (2)$$

ou, reescrevendo a equação 2 em função da $m_{AflaEluato}$ (Equação 3):

$$m_{AflaEluato} = V_{eluato} \times \left(\frac{Y - b_0}{b_1} \right) \quad (3)$$

A $m_{MatrizEluato}$ representa a massa de amostra que, após o tratamento, chega ao extrato final (eluato), sendo determinada pela equação 4:

$$m_{MatrizEluato} = m_{amostra} \times \left(\frac{V_{p1}}{V_{extração}} \right) \times \left(\frac{V_{p3}}{V_{p1} + V_{p2}} \right) \quad (4)$$

Assim, a equação utilizada para o cálculo da concentração das aflatoxinas nas amostras (Equação 5) é obtida substituindo as Equações 3 e 4 na Equação 1 e após adicionar um fator para a recuperação¹ do método, (Rec). Sendo Y a área obtida nas injeções das amostras, $m_{amostra}$ a massa de amostra pesada (g), b_0 o coeficiente linear e b_1 o coeficiente angular da curva de calibração, $V_{extração}$ o volume de solvente utilizado na extração das amostras (mL), V_{eluato} o volume do extrato final (mL), V_{p1} , V_{p2} e V_{p3} os volumes medidos na transferência e diluição do extrato (item 2.3) e Rec a recuperação do método determinada na etapa de validação.

$$C_{AFLA (ng/g)} = \left(\frac{(Y - b_0) \times V_{extração} \times V_{eluato} \times (V_{p1} + V_{p2})}{b_1 \times m_{amostra} \times V_{p1} \times V_{p3}} \right) \times \frac{1}{Rec} \quad (5)$$

1.5 Incerteza de Medição

A estimativa da incerteza de medição da metodologia analítica foi realizada com base em documento guia de organismo internacional (ABNT / INMETRO, 2003) bem como na literatura científica. Foram utilizados os dados obtidos dos estudos de validação intralaboratorial do método analítico na estimativa da incerteza da recuperação e da repetibilidade do método.

Neste estudo além das fontes de incerteza dos termos da Equação 5, foram consideradas também as fontes do preparo das soluções padrão de calibração e da repetibilidade.

As incertezas relativas de cada fonte considerada na estimativa da incerteza de medição do método foram combinadas de acordo com a Equação 6, onde \bar{C}_{medida} é a média da concentração medida, $u_r(C_{padrão})$ é a incerteza relativa da concentração da solução padrão, $u_r(\text{preparo})$ é a incerteza relativa do preparo da amostras, $u_r(\text{curva})$ é a incerteza relativa da curva de calibração, $u_r(r)$ é a incerteza da repetibilidade e $u_r(\text{Rec})$ é a incerteza da recuperação do método.

$$u_c = \bar{C}_{medida} \times \sqrt{\left(u_r(C_{padrão}) \right)^2 + \left(u_r(\text{preparo}) \right)^2 + \left(u_r(\text{curva}) \right)^2 + \left(u_r(r) \right)^2 + \left(u_r(\text{Rec}) \right)^2} \quad (6)$$

A incerteza expandida foi obtida multiplicando a incerteza padrão combinada pelo fator de abrangência ($k=2$) considerando um nível de confiança de 95,45 %.

$$U = k \times u_{(c)} \quad (7)$$

¹ Como os resultados de recuperação são aplicados na correção da concentração de aflatoxinas em amostras analisadas na rotina do laboratório, a incerteza da recuperação do método deve ser considerada como uma grandeza de entrada.

As fontes de incerteza utilizadas na determinação da incerteza de medição são descritas a seguir:

a) Incerteza do Preparo da amostra

A incerteza do preparo da amostra, $u_r(\text{preparo})$, é calculada a partir dos termos da fórmula utilizada na conversão da massa de aflatoxina medida na alíquota injetada para concentração de aflatoxina na amostra. A $u_r(\text{preparo})$ é determinada pelo método relativo através da combinação das grandezas de entrada, como demonstrado na Equação 8.

$$u(\text{preparo}) = \sqrt{\left(\frac{u_{(p1)}}{V_{p1}}\right)^2 + \left(\frac{u_{(p2)}}{V_{p2}}\right)^2 + \left(\frac{u_{(p3)}}{V_{p3}}\right)^2 + \left(\frac{u_{(V_{\text{extração}})}}{V_{\text{extração}}}\right)^2 + \left(\frac{u_{(m_{\text{amostra}})}}{m_{\text{amostra}}}\right)^2 + \left(\frac{u_{(V_{\text{eluato}})}}{V_{\text{eluato}}}\right)^2} \quad (\text{Equação 8})$$

A incerteza do volume injetado (V_{injetado}) não será considerada no cálculo de incerteza já que esta grandeza é contemplada na incerteza da precisão do método, que é determinante na variância das áreas obtidas.

b) Incerteza da Repetibilidade

A incerteza da repetibilidade foi estimada a partir dos resultados obtidos na etapa de validação do método. Na determinação desta incerteza, amostras em cinco níveis de concentração foram preparadas através da fortificação de amendoim não contaminado por aflatoxinas (branco). A incerteza da repetibilidade, $u_c(r)$, foi determinada para as amostras analisadas nestas condições, a partir do desvio padrão (Equação 9), onde s é o desvio padrão das concentrações medidas e n o número de replicatas.

$$u_c(r) = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (\text{Equação 9})$$

A incerteza relativa, $u_r(r)$, desta fonte é dada pela Equação 10, sendo $u_c(r)$ a incerteza combinada da repetibilidade e \bar{C}_{medida} a concentração média de aflatoxina.

$$u_r(r) = \sqrt{\left(\frac{u_c(r)}{\bar{C}_{\text{medida}}}\right)^2} \quad (\text{Equação 10})$$

c) Incerteza da Recuperação

Na determinação da recuperação do método analítico, amostras em cinco níveis de concentração foram preparadas através da fortificação de amendoim não contaminado por aflatoxinas (branco).

A contribuição da recuperação para a incerteza relativa de cada nível é calculada através da Equação 11, sendo $u_r(\text{Rec})$ a incerteza relativa da recuperação, $u_r(C_{\text{medida}})$ a incerteza relativa da concentração medida e $u_r(C_{\text{fortificação}})$ a incerteza relativa da concentração fortificada.

$$u_r(\text{Re } c) = \sqrt{\left(u_r(C_{\text{medida}})\right)^2 + \left(u_r(C_{\text{fortificação}})\right)^2} \quad (\text{Equação 11})$$

A $u_r(C_{\text{medida}})$ é dada pela Equação 12, sendo s o desvio padrão das concentrações medidas e n o número de replicatas e C_{medida} é a concentração medida.

$$u_r(C_{\text{medida}}) = \sqrt{\frac{s^2}{n \times C_{\text{medida}}^2}} \quad (\text{Equação 12})$$

A $u_r(C_{\text{fortificação}})$ é dada pela Equação 13, sendo $u_c(C_{\text{fortificação}})$ a incerteza combinada da concentração fortificada e $C_{\text{fortificação}}$ a concentração da amostra fortificada.

$$u_r(C_{\text{fortificação}}) = \sqrt{\left(\frac{u_c(C_{\text{fortificação}})}{C_{\text{fortificação}}}\right)^2} \quad (\text{Equação 13})$$

A incerteza da concentração de fortificação “ $u_c(C_{\text{fortificação}}) / C_{\text{fortificação}}$ ” é determinada combinando-se a incerteza da concentração da solução padrão determinada por espectrofotômetro (Sartori et al., 2009) com a incerteza do fator de diluição das soluções padrão e preparo das amostras fortificadas (CALRESU et al., 2006).

Assim, a incerteza combinada da fortificação, será dada pela Equação 14, onde $C_{\text{padrão}}$ é a concentração da aflatoxina na solução padrão utilizada na fortificação, $u_c(C_{\text{padrão}})$ é a incerteza da concentração da aflatoxina na solução padrão, $u_c(V_i)$ é a incerteza do volume (balão, pipeta, seringa) utilizado no preparo da amostra fortificada e V_i é o volume medido (certificado).

$$u_c(C_{\text{fortificação}}) = \sqrt{\left(\frac{u_c(C_{\text{padrão}})}{C_{\text{padrão}}}\right)^2 + \sum_{i=1}^n \left(\frac{u_c(V_i)}{V_i}\right)^2} \quad (\text{Equação 14})$$

Caso sejam preparadas mais de uma replicata da amostra (genuína), a incerteza combinada da fortificação será dada pela média das incertezas de cada replicata de acordo com a Equação 15, sendo $u_c(C_{\text{fortificação}})_i$ = incerteza combinada da fortificação.

$$\bar{u}_c(C_{\text{fortificação}}) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (u_c(C_{\text{fortificação}})_i)^2}{n}} \quad (\text{Equação 15})$$

Desta forma, a incerteza relativa da concentração de fortificação é dada por (Equação 16):

$$\bar{u}_r(C_{\text{fortificação}}) = \sqrt{\left(\frac{\bar{u}_c(C_{\text{fortificação}})}{\bar{C}_{\text{fortificação}}}\right)^2} \quad (\text{Equação 16})$$

d) Curva de calibração

A incerteza da curva de calibração é determinada através do método clássico descrito no ISO GUM. A aplicação desta abordagem para o cálculo da incerteza de medição da curva pode ser encontrada na literatura (de la Cruz et al., 2010).

e) Incerteza da solução padrão

Esta incerteza é obtida através da medição das soluções padrão em espectrofotômetro (Sartori *et al.*, 2009) ou do certificado da concentração da solução, caso utilize-se um material de referência. Nos dois casos a incerteza relativa da solução padrão, $u_r(C_{\text{padrão}})$, é dada pela Equação 17, a seguir, onde $u_c(C_{\text{padrão}})$ é a incerteza padrão combinada da solução padrão (certificado ou espectrofotômetro) e $C_{\text{padrão}}$ é a concentração da solução padrão.

$$u_r(C_{\text{padrão}}) = \sqrt{\left(\frac{u_c(C_{\text{padrão}})}{C_{\text{padrão}}}\right)^2} \quad (\text{Equação 17})$$

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT/INMETRO. Guia para a Expressão da Incerteza de Medição. Terceira edição brasileira em língua portuguesa – Rio de Janeiro: ABNT, INMETRO, **2003**, 120 p.

AOAC International. Official Methods of Analysis. Natural toxins. Gaithersburg, 18th edition, **2005**.

Calarescu, G.; Piras, P.; Galarini, R.; Chessa, G. Estimation of measurement uncertainty for the determination of aflatoxin M1 in milk using immunoaffinity clean-up procedures. *Accred. Qual. Assur.* (**2006**) 11: 10–16.

de la Cruz, M.H.C.; Rodrigues, J.M.R.; Couto, P.R.G.; Cunha, V.S.; Bremser, W. Estimativa da incerteza de medição em análise cromatográfica: abordagem sobre a quantificação de carbamato de etila em cachaça. *Química Nova*, (**2010**), 33:1578-1584.

Sartori, A. V.; Santos, R. P.; Moraes, M. H. P.; de la Cruz, M. H. C. Estimativa da Incerteza de Medição Associada à Determinação da Concentração de Soluções Padrão de Micotoxinas por Espectrofotometria de UV. Anais do XVI Encontro Nacional e II Congresso Latino-Americano de Analistas de Alimentos, **2009**.