

ESTIMATIVA DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO EM ANÁLISE CROMATOGRÁFICA: ABORDAGEM SOBRE A QUANTIFICAÇÃO DE CARBAMATO DE ETILA EM CACHAÇA

Marcus Henrique Campino de la Cruz, Janaína Marques Rodrigues*, Paulo Roberto Guimarães Couto e Valnei Smarçaro da Cunha

Diretoria de Metrologia Científica e Industrial, Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial, Av. Nossa Sra. das Graças, 50, 25250-020 Duque de Caxias – RJ, Brasil

Wolfram Bremser

BAM Federal Institute for Materials Research and Testing, Richard-Willstaetter-Strasse 1112489 Berlin, Germany

Recebido em 28/9/09; aceito em 22/3/10; publicado na web em 9/8/10

THE MEASUREMENT UNCERTAINTY ESTIMATION IN CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS: APPROACH ON THE QUANTIFICATION OF ETHYL CARBAMATE IN “CACHAÇA”. The measurement uncertainty is useful to estimate the confidence of analytical results. Nowadays, a result without the uncertainty statement cannot be considered reliable, but the scientific literature still lacks examples of the estimate of the measurement uncertainty. This paper presents a practical and reliable description of the measurement uncertainty estimation of the analytical determination of ethyl carbamate in *cachaça* by GC-IDMS. The isotope dilution technique (ID) associated with GC-MS was used to improve the accuracy. The uncertainty estimated corresponds to 10% of the mass fraction of ethyl carbamate (115 ± 11) ng/g, which is in agreement with ppb level.

Keywords: measurement uncertainty; chromatography; ethyl carbamate.

INTRODUÇÃO

A incerteza de medição é definida como sendo o parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas. O mensurando é a grandeza que se pretende medir. Já o termo grandeza é definido como a propriedade de um fenômeno, de um corpo ou de uma substância, que se pode expressar quantitativamente sob a forma de um número e de uma referência.¹

Em geral, o resultado de uma medição é somente uma aproximação ou estimativa do valor do mensurando e, assim, só é completo quando acompanhado pela declaração da incerteza dessa estimativa. Portanto, a incerteza do resultado de uma medição reflete a falta de conhecimento exato do valor do mensurando, sendo uma indicação quantitativa da qualidade do resultado, de forma tal que aqueles que o utilizam possam avaliar sua confiabilidade. Sem a declaração da incerteza, os resultados de medição não podem ser comparados, sejam entre os próprios resultados da medição, ou com valores de referência fornecidos em uma especificação ou em uma norma.^{2,3}

É importante que o conceito de incerteza de medição não seja confundido com erro, que é definido como a diferença entre um resultado individual e o valor verdadeiro do mensurando, sendo, a princípio, aplicado como uma correção do resultado. A incerteza, porém, assume a forma de uma faixa e, se estimada para um procedimento analítico e um tipo definido de amostra, pode ser aplicada a todas as determinações. De forma geral, o valor da incerteza não pode ser usado para corrigir o resultado de uma medição.^{3,4}

Na prática, a incerteza de um resultado pode ser advinda de muitas fontes possíveis, tais como, definição incompleta, amostragem, efeitos de matriz e interferências, condições ambientais, incertezas de massas e de equipamentos, valores de referência, aproximações e suposições incorporadas ao método e ao procedimento de medição, e à variação aleatória. Para que se tenha uma estimativa completa e confiável da incerteza é necessário que a contribuição quantitativa de cada uma destas fontes seja determinada.

Dois abordagens para a estimativa da incerteza de medição são bastante comuns: a *top-down*, baseada em estudos interlaboratoriais⁵⁻⁷ ou estudos de validação^{8,9} e a *bottom-up* (método clássico), preconizada pelo Guia para a Expressão da Incerteza de Medição - GUM.² De maneira geral, a norma ISO/IEC 17025, que define os requisitos para a acreditação de laboratórios, faz referência às duas abordagens, já que na seção sobre incerteza cita o conhecimento do método e os parâmetros de validação.¹⁰ Atualmente, mesmo na abordagem *bottom-up* estão sendo inseridos dados de validação.¹¹⁻¹³

O processo de estimativa da incerteza de medição utilizando a abordagem *bottom-up* envolve 4 etapas: especificação do mensurando, identificação das fontes de incerteza (diagrama de Ishikawa), quantificação dos componentes de incerteza e cálculo da incerteza padrão combinada.^{2,4,14}

Na especificação do mensurando declara-se objetivamente o que se está medindo, incluindo a relação entre o mensurando e as grandezas de entrada. Na etapa seguinte definem-se todas as possíveis fontes de incerteza, incluindo aquelas que contribuem para a incerteza da relação estabelecida na primeira etapa, podendo incluir outras fontes relevantes ao processo. Na terceira etapa estimam-se as incertezas associadas a cada fonte identificada na etapa anterior. Na última etapa, as incertezas associadas, que estão expressas como desvios padrão, são somadas para a obtenção de uma incerteza padrão combinada. A incerteza expandida deve ser calculada utilizando-se um fator de abrangência apropriado.⁴

O conceito de estimativa da incerteza de medição foi inicialmente desenvolvido para as medições físicas, estando publicados no GUM,² e vem sendo utilizado para as medições químicas. Contudo, estimar a incerteza de medição para os resultados de análises químicas é muito mais complexo do que sua aplicação nas medições físicas, já que uma medição química geralmente depende de uma combinação de medições físicas, da separação química do composto de interesse e da seleção apropriada da porção do material retirada para medição (amostragem).¹⁵

Diante desta dificuldade, este trabalho se propôs a exemplificar a estimativa da incerteza de medição em uma análise cromatográfica, sendo o mensurando a fração mássica de carbamato de etila em

*e-mail: jmrodrigues@inmetro.gov.br

cachaça, de modo a contribuir com a escassa literatura disponível atualmente nesta área.

PARTE EXPERIMENTAL

O cálculo da incerteza de medição apresentado é proveniente da análise de carbamato de etila em cachaça por cromatografia gasosa e detecção por espectrometria de massas.¹⁶ Carbamato de etila deuterado foi utilizado como padrão interno e tanto a amostra quanto a curva de calibração não receberam nenhum tratamento prévio (purificação, concentração, etc). A cachaça utilizada na determinação de carbamato de etila foi adquirida no comércio do Rio de Janeiro e os cálculos apresentados referem-se a uma amostra, analisada em triplicata, representativa dos resultados obtidos.

Materiais e métodos

Os seguintes solventes e padrões foram utilizados: carbamato de etila (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany, 99%), carbamato de etila deuterado-d5 (Cambridge Isotope Laboratory, Andore, USA, 98%), etanol grau de pureza para HPLC (Lichrosolv-Merck, Darmstadt, Germany, 99,9%), água ultrapura (Millipore Inc., Paris, France, Type I).

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás (CG) acoplado a um espectrômetro de massas (EM), Shimadzu, modelo GCMS-QP2010 (Tokyo, Japão). Cada ponto da curva de calibração resultou das injeções de triplicatas (1 µL) no modo sem divisão de fluxo usando uma coluna capilar HP-FFAP (50 m x 0,2 mm di x 0,33 mm de espessura de filme) em fluxo de He (White Martins, RJ, Brasil, 5.0) de 1,2 mL/min, injetor à 250 °C e com a seguinte programação de temperatura: 90 °C por 1 min, aquecido a 150 °C a taxa de 10 °C/min e aquecido a 230 °C a taxa de 30 °C/min. A fonte iônica e a interface foram mantidas a 220 °C, com o equipamento operando em modo de impacto de elétron, com energia de ionização de 70 eV.

A determinação de pureza do carbamato de etila foi realizada por calorimetria diferencial de varredura (TA Instruments, modelo: Q1000) em 4 replicatas deste composto, de acordo com a metodologia preconizada pela ASTM.¹⁷

Soluções estoque

Todas as soluções estoque (analito, padrão interno e matrizes hidroálcoolicas) foram preparadas por gravimetria. A pesagem do analito e da matriz hidroálcoolica foi realizada em balança analítica digital (Mettler Toledo, modelo XS205) e a do padrão interno em ultramicrobalança (Mettler Toledo, modelo UMX5).

Na faixa de carbamato de etila pesada, o erro da balança analítica digital é de -0,000013 g e na faixa de carbamato de etila deuterado pesada, o erro da microbalança é de +0,0000041 g.

Curva de calibração

Oito pontos foram utilizados na elaboração da curva de calibração, nas seguintes concentrações: 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 e 225 ng/g. Os pontos da curva de calibração foram construídos pela diluição gravimétrica da solução estoque de carbamato de etila (CE) em solução hidroálcoolica. A solução de padrão interno, carbamato de etila deuterado (CE 5-d), foi adicionada à amostra e aos pontos da curva de calibração de forma gravimétrica, na relação de 1:1 (m/m).

Preparação dos controles de qualidade

Foram preparadas, também de forma gravimétrica, três soluções de controle para avaliação da recuperação do método.

As concentrações escolhidas foram: 65, 137 e 210 ng/g, correspondendo aos controles de baixa (CB), média (CM) e alta (CA) fração mássica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os dados das pesagens dos analitos, bem como do padrão interno, e das incertezas na faixa de massa pesada indicadas no certificado de calibração das balanças utilizadas neste estudo. Estes dados são referentes ao preparo das soluções mãe (soluções estoque) do analito e do padrão interno. Todas as massas apresentadas nesta tabela e nas seguintes já foram corrigidas pelos respectivos certificados.

Tabela 1. Massas pesadas de carbamato de etila, carbamato de etila deuterado e de solução hidroálcoolica com as incertezas das balanças utilizadas na preparação das soluções estoque

Material	Massa (g)	U ³ (g)	k ⁴	u (g)
Carbamato de etila	0,00023	0,00003	2,00	0,000015
Solução de hidroálcoolica ¹	800,000	0,1	2,00	0,05
Carbamato de etila deuterado	0,00016	0,00000350	2,00	0,00000175
Solução de hidroálcoolica ²	800,000	0,1	2,00	0,05

1 – Solvente da solução de carbamato de etila; 2 – Solvente da solução de carbamato de etila deuterado; 3 – Incerteza da carga total da balança = massa de carbamato de etila deuterado + massa do frasco da pesagem; 4 – 95%, n = ∞.

A Tabela 2 apresenta os dados das replicatas de razão de área (CE/CE 5-d) e de razão de massa (CE/CE 5-d) da curva de calibração utilizada neste trabalho.

Tabela 2. Razão de massa (CE/CE 5-d) e resultados da razão de área (CE/CE 5-d) da curva de calibração utilizada neste trabalho

Ponto	Razões			
	massa	replicata 1	replicata 2	replicata 3
1	0,248308	0,310892	0,328892	0,314901
2	0,376396	0,453602	0,462017	0,443568
3	0,498411	0,584954	0,613014	0,602004
4	0,621973	0,750171	0,727703	0,722234
5	0,748333	0,883235	0,879847	0,898453
6	0,875127	0,998580	1,026532	1,032165
7	1,004597	1,162372	1,180800	1,210019
8	1,117055	1,301225	1,284627	1,278078

Curva de calibração: r² = 0,998102, coeficiente angular = 1,1316269, coeficiente linear = 0,0338047. Regressão significativa: F = 11567,9 (F_(1,22) = 4,3) Falta de ajuste: F = 1,004 (F_(6,16) = 2,741).

A Tabela 3 apresenta os dados da determinação da pureza do carbamato de etila utilizado na preparação da solução estoque e soluções controle, da massa específica da amostra e da recuperação. Estes dados são necessários para o cálculo da incerteza de medição.

A partir dos dados apresentados nas Tabelas 1, 2 e 3, a fração mássica de carbamato de etila em cachaça (mensurando) é calculada. Para isso, a amostra de cachaça utilizada foi injetada em triplicata. As razões de área das injeções da amostra em replicata (3) foram as seguintes: 0,68020, 0,67963 e 0,71171 (s = 0,01836). A massa de amostra utilizada foi de 1,89871 g e a massa de solução de PI adicionada sobre a amostra foi de 1,88837 g. O valor médio de fração mássica (n=3) encontrado de carbamato de etila para esta amostra foi de 115,4320 ng/g. Este valor foi obtido a partir da Equação 1, que define o mensurando.¹⁶

Tabela 3. Valor médio, desvios padrão e número de observações nas determinações de pureza, massa específica e recuperação da análise de carbamato de etila em cachaça

Fonte	Valor	s	Observações
Pureza	0,9979	0,00051	4
Massa específica ¹	0,94710 g/cm ³	0,0000153	3
Recuperação ^{2a,2b}	99,21 %	0,0247	3

1 – Realizado em densímetro digital (Mettler Toledo, modelo DE 51 Density meter). 2a – Valor teórico = (137 ± 12) ng/g. Esta incerteza é proveniente da preparação gravimétrica de um padrão de carbamato de etila utilizado como controle do processo. A incerteza de medição contempla além das fontes inerentes à pesagem, a incerteza inerente à diluição e à determinação da pureza do padrão. 2b – Valor analítico = (136 ± 16) ng/g.

$$w_{[\text{analito}]} = \left(\frac{A_{\text{analito}}}{A_{\text{PI}}} - b \right) \times \frac{p \times m_{\text{PI}}}{a \times m_{\text{amostra}}} \quad (1)$$

onde: $w_{[\text{analito}]}$ = fração mássica de um analito em uma amostra (carbamato de etila em cachaça); A_{analito} = área do pico do analito; A_{PI} = área do pico do PI; m_{amostra} = massa de amostra; m_{PI} = massa de PI; a = coeficiente angular; b = coeficiente linear; p = pureza do carbamato de etila utilizado como padrão.

Etapa 1 – Especificando o mensurando

A Equação 1 é obtida a partir da equação que expressa a curva de calibração (Equação 2). Uma vez que, em uma curva de calibração, a relação existente entre a variável dependente (Y) e a variável independente (X) pode ser escrita como:¹⁸

$$Y = aX + b \quad (2)$$

onde: a = coeficiente angular; b = coeficiente linear; Y = razão de áreas (CE/CE 5-d); X = razão de massas (CE/CE 5-d).

Substituindo os valores de X e Y na Equação 2, tem-se a Equação 3:

$$\frac{A_{\text{analito}}}{A_{\text{PI}}} = a \times \frac{m_{\text{analito}}}{m_{\text{PI}}} + b \quad (3)$$

onde: A_{analito} = área do pico de CE; A_{PI} = área do pico de CE 5-d; m_{analito} = massa de CE; m_{PI} = massa de CE 5-d.

A fração mássica de um analito em uma amostra pode ser definida pela Equação 4.^{18,19}

$$w_{[\text{analito}]} = \frac{m_{\text{analito}}}{m_{\text{amostra}}} \quad (4)$$

Substituindo a Equação 4 na Equação 3, obtém-se:

$$\frac{A_{\text{analito}}}{A_{\text{PI}}} = a \times \frac{w_{[\text{analito}]} \times m_{\text{amostra}}}{m_{\text{PI}}} + b \quad (5)$$

Evidenciando a fração mássica do analito, a Equação 5 é expressa pela Equação 6:

$$w_{[\text{analito}]} = \left(\frac{A_{\text{analito}}}{A_{\text{PI}}} - b \right) \times \frac{m_{\text{PI}}}{a \times m_{\text{amostra}}} \quad (6)$$

Como a pureza do carbamato de etila é proporcional à massa, tem-se a equação apresentada a seguir, que define o mensurando, ou seja, a Equação 1:

$$w_{[\text{analito}]} = \left(\frac{A_{\text{analito}}}{A_{\text{PI}}} - b \right) \times \frac{p \times m_{\text{PI}}}{a \times m_{\text{amostra}}} \quad (1)$$

Etapa 2 – Definindo as fontes de incerteza

A partir da equação que define o mensurando, constrói-se o diagrama de causa e efeito (Figura 1). Este diagrama contém todas as grandezas de entrada advindas da Equação 1, somadas àquelas que também influenciam na incerteza deste processo, mas que são provenientes de fontes externas às presentes na Equação 1 como, por exemplo, a recuperação.

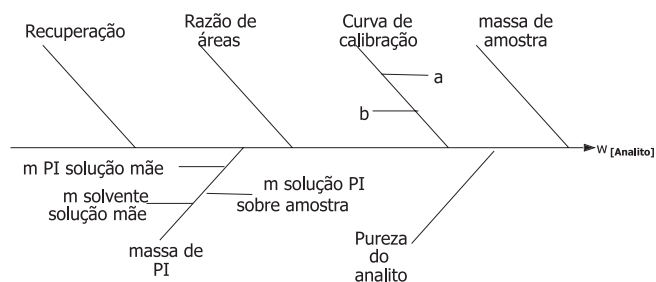


Figura 1. Diagrama de causa e efeito (Ishikawa) da análise de carbamato de etila em cachaça, indicando as contribuições da incerteza na quantificação de carbamato de etila

Com as grandezas de entrada definidas no diagrama de causa e efeito, define-se a equação da incerteza padrão combinada, expressa pela Equação 7:

$$u_c = \sqrt{(u_{\text{Rárea}})^2 + (u_{\text{cc}})^2 + (u_{\text{amostra}})^2 + (u_{\text{mPI}})^2 + (u_p)^2 + (u_{\text{rec}})^2} \quad (7)$$

onde: $u_{\text{Rárea}}$ = contribuição da incerteza da razão de área (CE/CE 5-d); u_{cc} = contribuição da incerteza da curva de calibração; u_{amostra} = contribuição da incerteza da massa de amostra; u_{mPI} = contribuição da incerteza da massa de PI; u_p = contribuição da incerteza da pureza do padrão do analito; u_{rec} = contribuição da incerteza da recuperação.

A pureza do padrão interno, diferentemente da pureza do padrão do analito, não é uma fonte de incerteza nesta análise já que, independentemente do seu valor, o padrão interno é adicionado aos pontos da curva de calibração e à amostra na mesma fração mássica, fazendo com que ambos sejam divididos pelo mesmo fator, não ocasionando, portanto, incerteza ao processo de análise.

Etapa 3 – Calculando as incertezas associadas

As grandezas de entrada que estão expressas na equação que define o mensurando (Equação 1), isto é, a razão de área (CE/CE 5-d), a massa de padrão interno adicionada à amostra, a pureza e a massa de amostra têm as suas incertezas calculadas pelo método clássico (delta method).² Neste método, emprega-se o conceito de derivada (coeficiente de sensibilidade) para uniformizar as unidades das grandezas de entrada em relação à unidade do mensurando, no caso a fração mássica do analito. Com a aplicação do método clássico, que é o preconizado pelo guia para a expressão da incerteza de medição,² as unidades das incertezas de cada uma das grandezas de entrada passam a ser expressas em termos de fração mássica, que é a unidade do mensurando.

As equações que definem cada uma das grandezas de entrada são apresentadas a seguir.

Incerteza da razão de área (CE/CE 5-d) - $u_{\text{Rárea}}$

Derivando a fração mássica do analito em função da razão de área, na Equação 1, e multiplicando pela incerteza desta fonte, tem-se:

$$u_{\text{Área}} = u\left(\frac{A_{\text{analito}}}{A_{\text{PI}}}\right) = \frac{dw_{[\text{analito}]}}{d(A_{\text{analito}}/A_{\text{PI}})} \times u^n\left(\frac{A_{\text{Analito}}}{A_{\text{PI}}}\right) \quad (8)$$

Onde a derivada é dada por:

$$\frac{dw_{[\text{analito}]}}{d(A_{\text{analito}}/A_{\text{PI}})} = \frac{p \times m_{\text{PI}}}{a \times m_{\text{amostra}}} \quad (9)$$

e a incerteza é expressa por:^{2,4}

$$u^n\left(\frac{A_{\text{Analito}}}{A_{\text{PI}}}\right) = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (10)$$

onde: s = desvio padrão das razões de área; n = número de replicatas.

Substituindo os valores nas Equações 9 e 10, tem-se:

$$\frac{dw_{[\text{analito}]}}{d(A_{\text{analito}}/A_{\text{PI}})} = \frac{0,9979 \times 0,00000038}{1,1316269 \times 1,89871} = 1,754 \times 10^{-7}$$

$$u^n\left(\frac{A_{\text{Analito}}}{A_{\text{PI}}}\right) = \frac{0,018362}{\sqrt{3}} = 0,010601$$

Assim, a incerteza da razão de área, $u_{\text{Área}}$, é igual a $1,859 \times 10^{-9}$.

Incerteza da massa de amostra - $u_{m_{\text{amostra}}}$

Derivando a fração mássica do analito em função de massa de amostra, na Equação 1, e multiplicando pela incerteza desta fonte, tem-se:

$$u_{m_{\text{amostra}}} = \frac{dw_{[\text{analito}]}}{dm_{\text{amostra}}} \times u^n(m_{\text{amostra}}) \quad (11)$$

onde a derivada é dada por:

$$\frac{dw_{[\text{analito}]}}{dm_{\text{amostra}}} = \left(\frac{A_{\text{analito}}}{A_{\text{PI}}} - b\right) \times \left(\frac{p \times (-m_{\text{PI}})}{a \times (m_{\text{amostra}})^2}\right) \quad (12)$$

e a incerteza é expressa por:

$$u^n(m_{\text{amostra}}) = \frac{U_{\text{certificado}}}{k} \quad (13)$$

onde: $U_{\text{certificado}}$ = incerteza expandida do certificado de calibração da balança; k = fator de abrangência expresso no certificado de calibração da balança.

Substituindo os valores obtidos nas Equações 12 e 13, tem-se:

$$\frac{dw_{[\text{analito}]}}{dm_{\text{amostra}}} = (0,690511 - 0,0338047) \times \left(\frac{0,9979 \times (-3,8 \times 10^{-7})}{1,1316269 \times (1,89871)^2}\right) = -6,067 \times 10^{-8} \text{ g}^{-1}$$

$$u^n(m_{\text{amostra}}) = \frac{0,00003}{2} = 0,000015 \text{ g}$$

Sendo a incerteza da massa de amostra, $u_{m_{\text{amostra}}} = -9,100 \times 10^{-13}$

Incerteza da massa de PI - $u_{m_{\text{PI}}}$

Derivando a fração mássica do analito em função da massa de PI, na Equação 1, e multiplicando pela incerteza desta fonte, tem-se:

$$u_{m_{\text{PI}}} = \frac{dw_{[\text{analito}]}}{dm_{\text{PI}}} \times u^n(m_{\text{PI}}) \quad (14)$$

onde a derivada é dada por:

$$\frac{dw_{[\text{analito}]}}{dm_{\text{PI}}} = \left(\frac{A_{\text{analito}}}{A_{\text{PI}}} - b\right) \times \frac{p}{a \times m_{\text{amostra}}} \quad (15)$$

Como é a massa de PI (CE 5-d) e não a massa de solução de PI e considerando que esta solução é composta pela massa de PI mais a massa de solução hidroalcoólica, a incerteza da massa de PI ($u_{m_{\text{PI}}}$) é calculada a partir de 3 fontes, a saber: massa de PI na solução mãe, massa de solvente na solução mãe e massa de solução de PI adicionada sobre a amostra. Estas incertezas podem ser combinadas pela seguinte equação:

$$u_{m_{\text{PI}}} = \sqrt{(u_{m_{\text{PIsol.mãe}}})^2 + (u_{m_{\text{solv.sol.mãe}}})^2 + (u_{m_{\text{sol.PIamostra}}})^2} \quad (16)$$

sendo: $u_{m_{\text{PIsol.mãe}}}$ = contribuição da incerteza da massa de PI na solução mãe; $u_{m_{\text{solv.sol.mãe}}}$ = contribuição da incerteza da massa de solvente na solução mãe; $u_{m_{\text{sol.PIamostra}}}$ = contribuição da incerteza da massa de solução de PI adicionada sobre a amostra.

Cada uma destas incertezas será calculada a partir da equação que define o mensurando, neste caso, a massa de PI. Esta equação é expressa por:

$$m_{\text{PI}} = \frac{m_{\text{PIsol.mãe}} \times m_{\text{sol.PIamostra}}}{m_{\text{PIsol.mãe}} + m_{\text{solv.sol.mãe}}} \quad (17)$$

onde: $m_{\text{PIsol.mãe}}$ = massa de PI na solução mãe; $u_{m_{\text{PIamostra}}}$ = massa de solução de PI adicionada na amostra; $m_{\text{solv.sol.mãe}}$ = massa de solvente na solução mãe.

Derivando a massa de PI em função da massa de PI na solução mãe, na Equação 17, e multiplicando pela incerteza desta fonte, tem-se:

$$u_{m_{\text{PIsol.mãe}}} = \frac{dm_{\text{PI}}}{dm_{\text{PIsol.mãe}}} \times u^*(m_{\text{PIsol.mãe}}) \quad (18)$$

onde a derivada é dada por:

$$\frac{dm_{\text{PI}}}{dm_{\text{PIsol.mãe}}} = \frac{m_{\text{sol.PIamostra}} \times (m_{\text{PIsol.mãe}} + m_{\text{solv.sol.mãe}}) - (m_{\text{PIsol.mãe}} \times m_{\text{sol.PIamostra}})}{(m_{\text{PIsol.mãe}} + m_{\text{solv.sol.mãe}})^2} \quad (19)$$

Sendo a incerteza dada pelos certificados das balanças, como na Equação 13.

Substituindo os valores obtidos nas Equações 13 e 19, tem-se:

$$\frac{dm_{\text{PI}}}{dm_{\text{PIsol.mãe}}} = \frac{1,88837 \times (1,600 \times 10^{-4} + 800,00) - (1,600 \times 10^{-4} + 1,88837)}{(1,600 \times 10^{-4} + 800,00)^2} = 0,002360$$

$$u^*(m_{\text{PIsol.mãe}}) = \frac{0,0000035}{2} = 0,00000175 \text{ g}$$

Assim, a incerteza da massa de PI sobre a solução mãe é: $u_{m_{\text{PIsol.mãe}}} = 4,130 \times 10^{-9} \text{ g}$.

Derivando a massa de PI em função da massa de solução de PI sobre a amostra, na Equação 17, e multiplicando pela incerteza desta fonte, tem-se:

$$u_{m_{\text{sol.PIamostra}}} = \frac{dm_{\text{PI}}}{dm_{\text{sol.PIamostra}}} \times u^*(m_{\text{sol.PIamostra}}) \quad (20)$$

onde a derivada é dada por:

$$\frac{dm_{\text{PI}}}{dm_{\text{sol.PIamostra}}} = \frac{m_{\text{PIsol.mãe}}}{(m_{\text{PIsol.mãe}} + m_{\text{solv.sol.mãe}})} \quad (21)$$

Sendo a incerteza dada pelos certificados das balanças, como na Equação 13.

Substituindo os valores obtidos nas Equações 13 e 21, tem-se:

$$\frac{dm_{PI}}{dm_{sol. Plamostra}} = \frac{1,600 \times 10^{-4}}{(1,600 \times 10^{-4} + 800,00)} = 2,0 \times 10^{-7}$$

$$u^*(m_{sol. Plamostra}) = \frac{0,00003}{2} = 0,000015g$$

Assim, a incerteza da massa de solução de PI na amostra é:
 $u_{msol. Plamostra} = 3,000 \times 10^{-12} g$.

Derivando a massa de PI em função da massa de solvente na solução mãe, na Equação 17, e multiplicando pela incerteza desta fonte, tem-se:

$$u_{msolv. sol. mãe} = \frac{dm_{PI}}{dm_{solv. sol. mãe}} \times u^*(m_{solv. sol. mãe}) \quad (22)$$

onde a derivada é dada por:

$$\frac{dm_{PI}}{dm_{solv. sol. mãe}} = -\frac{m_{PIsol. mãe} \times m_{sol. Plamostra}}{(m_{PIsol. mãe} + m_{solv. sol. mãe})^2} \quad (23)$$

Sendo a incerteza dada pelos certificados das balanças, como na Equação 13.

Substituindo os valores obtidos nas Equações 13 e 23, tem-se:

$$\frac{dm_{PI}}{dm_{solv. sol. mãe}} = -\frac{1,600 \times 10^{-4} + 1,88837}{(1,600 \times 10^{-4} + 800,00)^2} = -4,7209 \times 10^{-10}$$

$$u^*(m_{solv. sol. mãe}) = \frac{0,1}{2} = 0,05g$$

Assim, a incerteza da massa de solvente na solução mãe é: $u_{msol. sol. mãe} = -2,3604 \times 10^{-11} g$.

Como incerteza combinada (Equação 16) da massa de PI, tem-se:

$$u''(m_{PI}) = \sqrt{(4,130 \times 10^{-9})^2 + (2,360 \times 10^{-11})^2 + (3,000 \times 10^{-12})^2} = 4,13 \times 10^{-9} g$$

Sendo o coeficiente de sensibilidade, dado pela Equação 15, calculado por:

$$\frac{dw_{[analito]}}{dm_{PI}} = (0,690511 - 0,0338047) \times \left(\frac{0,9979}{1,1316269 \times 1,89871} \right) = 0,3050g^{-1}$$

Sendo assim, a incerteza da massa de PI é: $u_{m_{PI}} = 1,260 \times 10^{-9}$

Incerteza da pureza do analito - u_p

Derivando a fração mássica do analito em função da pureza do analito, na Equação 1, e multiplicando pela incerteza desta fonte, tem-se:

$$u_p = \frac{dw_{[analito]}}{dp} \times u''(p) \quad (24)$$

onde a derivada é dada por:

$$\frac{dw_{[analito]}}{dp} = \left(\frac{A_{analito}}{A_{PI}} - b \right) \times \left(\frac{m_{PI}}{a \times m_{amostra}} \right) \quad (25)$$

Como o valor da pureza foi obtido experimentalmente, a incerteza desta medição é dada pela seguinte equação:

$$u_{purezaDSC} = \frac{s_{análises}}{\sqrt{n}} \quad (26)$$

onde: $s_{análise}$ = desvio padrão da análise por DSC.

Substituindo os valores obtidos nas Equações 25 e 26, teremos:

$$\frac{dw_{[analito]}}{dp} = (0,690511 - 0,0338047) \times \left(\frac{3,8 \times 10^{-7}}{1,1316269 \times 1,89871} \right) = 1,15 \times 10^{-7}$$

$$u_{purezaDSC} = \frac{0,0051}{\sqrt{4}} = 2,549 \times 10^{-4}$$

E como incerteza da pureza, $u_p = 2,943 \times 10^{-11}$

Incerteza da recuperação - u_{rec}

Esta é uma fonte de incerteza que é combinada relativamente com as outras e é obtida por um experimento prévio, sendo combinada como uma incerteza do tipo B. Uma equação que determine o valor da recuperação pode ser expressa como:²⁰

$$R_m = \frac{\bar{V}_{obtido}}{V_{controle}} \quad (27)$$

onde: \bar{V}_{obtido} = valor médio obtido na análise; $V_{controle}$ = valor da preparação gravimétrica de um padrão.

Assim, a incerteza da recuperação, calculada pelo método clássico,² é dada da seguinte forma:

$$u'_{rec} = \sqrt{\left(\frac{dR_m}{d\bar{V}_{obtido}} \times u\bar{V}_{obtido} \right)^2 + \left(\frac{dR_m}{dV_{controle}} \times uV_{controle} \right)^2} \quad (28)$$

onde: u'_{rec} = Incerteza da recuperação (não relativa); $u\bar{V}_{obtido}$ = Incerteza do valor experimental; $uV_{controle}$ = Incerteza do controle.

Onde os coeficientes de sensibilidade (derivadas) são dados por:

$$\frac{dR_m}{d\bar{V}_{obtido}} = \frac{1}{V_{controle}} \quad \frac{dR_m}{dV_{controle}} = -\frac{\bar{V}_{obtido}}{(V_{controle})^2} \quad (29) \text{ e } (30)$$

Sendo as incertezas dadas por:

$$u\bar{V}_{obtido} = \frac{s_{recuperação}}{\sqrt{n}} \quad uV_{controle} = \frac{U_{controle}}{k} \quad (31) \text{ e } (32)$$

Substituindo os valores obtidos nas Equações 29 e 30, tem-se:

$$\frac{dR_m}{d\bar{V}_{obtido}} = \frac{1}{137} = 0,007299$$

$$\frac{dR_m}{dV_{controle}} = -\frac{135,9172}{(137)^2} = -0,007241$$

Com as seguintes incertezas:

$$u\bar{V}_{obtido} = \frac{0,0247}{\sqrt{3}} = 0,01426$$

$$uV_{controle} = \frac{12}{2} = 6$$

Assim, a Equação 28 resulta em:

$$u'_{rec} = \sqrt{(-0,007241 \times 6)^2 + (0,007299 \times 0,01426)^2} = 0,04345$$

Para combinarmos esta incerteza com as que são originárias da equação que define o mensurando (Equação 1), precisamos relativizá-la.² Isto é feito de acordo com a Equação 33:

$$u_{rec} = \left(\frac{u'_{rec}}{R_m} \right) \quad (33)$$

onde: R_m = Recuperação.

Sendo a incerteza relativa da recuperação (Equação 28):

$$u_{rec} = 0,04380$$

$$u_b = \sqrt{\frac{24 \times (0,004776)/22}{(24 \times 13,26441) - (16,4706)^2}} = 0,010521$$

Incerteza da curva de calibração - u_{cc}

Apesar de ser uma grandeza que advém da equação, a incerteza da curva de calibração não é obtida na unidade das outras incertezas que vêm da equação que define o mensurando (1). Assim, tem-se que torná-la relativa,² dividindo pela unidade da abscissa, como apresentado a seguir:

$$u_{cc} = \left(\frac{u'_{cc}}{\left(\frac{\bar{m}_{analitoamostra}}{\bar{m}_{PIadicionadoamostra}} \right)} \right) \quad (34)$$

onde: u'_{cc} = incerteza combinada da curva de calibração (não relativa); $\bar{m}_{analitoamostra}$ = massa média de analito na amostra; $\bar{m}_{PIadicionadoamostra}$ = massa média de PI adicionado na amostra.

A incerteza combinada da curva de calibração não relativa (em termos de razão de massa), u'_{cc} , é dada pela seguinte equação:

$$u'_{cc} = \sqrt{\sum_{i=1}^N c_i^2 \times u_{xi}^2 + 2 \times \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N c_i \times c_j \times u_{xi} \times u_{xj} \times r_{xi,xj}} \quad (35)$$

ou, explicitando os valores de uma regressão linear na equação acima, tem-se:

$$\sum_{i=1}^N c_i^2 \times u_{xi}^2 = (-1/a)^2 \times u_b^2 + (-((\bar{R}_{Analito / API}) - b) / a^2)^2 \times u_a^2 \quad (36)$$

$$2 \times \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N c_i \times c_j \times u_{xi} \times u_{xj} \times r_{xi,xj} = 2 \times (-1/a) \times -((\bar{R}_{Analito / API}) - b) / a^2 \times u_a \times u_b \times r_{a,b} \quad (37)$$

Substituindo estes valores, a Equação 35 pode ser escrita como:

$$u'_{cc} = \sqrt{(-1/a)^2 \times u_b^2 + (-((\bar{R}_{Analito / API}) - b) / a^2)^2 \times u_a^2 + 2 \times (-1/a) \times -((\bar{R}_{Analito / API}) - b) / a^2 \times u_a \times u_b \times r_{a,b}} \quad (38)$$

onde: $R_{Analito/API}$ = média das razões de área (CE/CE 5-d) na amostra.

Sendo os valores de u_a (incerteza do coeficiente angular), u_b (incerteza do coeficiente linear) e $r_{a,b}$ (coeficiente de correlação entre a e b) definidos pelas seguintes equações:

$$u_b = \sqrt{\frac{((\sum \text{resíduo}^2) / (n - 2)) \times \sum x^2}{(n \times \sum x^2) - (\sum x)^2}} \quad (39)$$

$$u_a = \sqrt{\frac{n \times (\sum \text{resíduo}^2) / (n - 2)}{(n \times \sum x^2) - (\sum x)^2}} \quad (40)$$

$$r_{a,b} = - \frac{\sum x}{\sqrt{n \times \sum x^2}} \quad (41)$$

onde: $x = (m_{analito} / m_{PI})$; $\text{resíduo}^2 = (x - x_{calc})^2$; $n =$ pontos x replicatas.

Os valores de $\sum x$ são obtidos da Tabela 2. Assim, a Equação 41 tem o seguinte resultado:

$$r_{a,b} = - \frac{16,4706}{\sqrt{24 \times 271,2807}} = -0,923123$$

Com os seguintes valores de incertezas:

$$u_a = \sqrt{\frac{(0,004776/22) \times 13,26441}{(24 \times 13,26441) - (16,4706)^2}} = 0,007822$$

Sendo a incerteza combinada da curva de calibração u'_{cc} igual a:

$$u'_{cc} = \sqrt{(4,77 \times 10^{-5}) + (2,91 \times 10^{-5}) + 2 \times (-0,8836) \times (-0,5128) \times (0,0078) \times (0,0105) \times (-0,9231)} = 0,002834$$

e a incerteza relativa dada por:

$$u_{cc} = \frac{u'_{cc}}{\bar{m}_{CE} / \bar{m}_{PI}} = \frac{0,002834}{2,2 \times 10^{-7} / 2,8 \times 10^{-7}} = 0,00488$$

Etapa 4 – Calculando a incerteza padrão combinada

Como as incertezas da razão de área ($u_{R\acute{a}rea}$), da massa de amostra ($u_{m_{amostra}}$), da massa de PI ($u_{m_{PI}}$) e da pureza (u_p) estão na unidade de fração mássica (g de CE/g de amostra), estas devem ser divididas pelo resultado da fração mássica de carbamato de etila (115 ng/g => 115×10^{-9} g/g) para poderem ser combinadas com as outras duas incertezas: da recuperação (u_{rec}) e da curva de calibração (u_{cc}). Assim, a Tabela 4 apresenta os resultados das incertezas (relativas) para todas as fontes abordadas neste trabalho.

Tabela 4. Contribuições individuais das incertezas relativas

Incerteza ^a	Valor adimensional
$u_{R\acute{a}rea}$	0,0161047
$u_{m_{amostra}}$	0,0000079
$u_{m_{PI}}$	0,0109155
u_p	0,0002547
u_{rec}	0,0437957
u_{cc}	0,0048843

a: $u_{R\acute{a}rea}$: incerteza da razão de área, $u_{m_{amostra}}$: incerteza da massa de amostra, $u_{m_{PI}}$: incerteza da massa de padrão interno, u_p : incerteza da determinação de pureza, u_{rec} : incerteza da recuperação e u_{cc} : incerteza da curva de calibração.

Com base na Tabela 4, observa-se que as maiores contribuições estão relacionadas à recuperação, à repetitividade do equipamento (razão de área) e à curva de calibração, sendo geralmente estas as maiores contribuições no cálculo da incerteza. O elevado valor encontrado para a incerteza da massa de PI adicionada é consequência da pequena massa de carbamato de etila deuterado pesada, próxima à precisão da balança, sendo que a expressão que calcula esta incerteza (Equação 16) considera ainda as incertezas da massa de solvente e da massa de solução adicionada na amostra. Assim, pela propagação destas fontes de incerteza tem-se um resultado relativamente alto para um método primário. Contudo, esta fonte de incerteza deve ser considerada já que advém da equação que define o mensurando (1).

Dentre as incertezas das grandezas de entrada, aquela proveniente do método primário gravimétrico ($u_{m_{amostra}}$) apresentou o menor valor. Este resultado está de acordo com o esperado, já que a única fonte de incerteza considerada é a resolução da balança.

Como a construção da curva de calibração reflete uma razão CE/CE d-5 e tendo o padrão deuterado, praticamente, o mesmo tempo de retenção e propriedades físico-químicas que o analito carbamato de etila, esta incerteza é propagada por todos os pontos de construção da curva, refletindo em um valor de incerteza menor quando utilizamos a quantificação por padrão interno marcado isotopicamente.

Os valores baixos para a incerteza da razão de área e da curva de calibração, quando comparados à incerteza da recuperação, demonstram uma boa repetitividade do equipamento.

O valor da incerteza padrão combinada pode ser obtido a partir da substituição dos dados da Tabela 4 na Equação 7. Assim:

$$u_c = \sqrt{(0,01610472)^2 + (0,0048843)^2 + (0,0000079)^2 + (0,0109155)^2 + (0,0002547)^2 + (0,0437957)^2}$$

$$u_c = \sqrt{0,0023205} = 0,0481715$$

Sendo esta incerteza relativa, para se obter a incerteza na unidade de fração mássica utilizada, multiplica-se a incerteza padrão combinada calculada pela fração mássica média de carbamato de etila. Desta forma, $u_c = 0,0481715 \times 115,4329 = 5,5605347$ ng/g.

Neste estudo, a maior incerteza é a da recuperação, que neste caso é do tipo B. Assim, para uma confiança de 95% os graus de liberdade são infinitos e o fator de abrangência, k , é igual a 2.

Uma vez que a incerteza padrão combinada e o fator de abrangência foram obtidos, procede-se para a etapa final, que é o cálculo da incerteza expandida.

A incerteza expandida desta análise é expressa pela Equação 42:

$$U = u_c \times k \quad (42)$$

onde: u_c = incerteza padrão combinada; k = fator de abrangência.

Desta forma, calculando a incerteza expandida (Equação 42), tem-se:

$$U = 5,5605347 \times 2 = 11,121069 \text{ ng/g}$$

Assim, como resultado final da análise, tem-se, para a fração mássica de carbamato de etila, o seguinte resultado:

$$w_{[\text{carbamato de etila}]} = (115 \pm 11) \text{ ng/g}$$

já que a incerteza expandida é representada por no máximo 2 algarismos significativos. Esta corresponde a cerca de 10% do valor médio de fração mássica encontrado para o carbamato de etila nesta análise e está de acordo com o esperado para esta faixa de fração mássica (ppb).

CONCLUSÃO

A abordagem *bottom-up* utilizada para o cálculo da incerteza de medição desenvolvido para análise de carbamato de etila em cachaça apresentou um valor compatível com o método primário gravimétrico empregado para o preparo das soluções e a pesagem das amostras, assim como com o uso do padrão interno deuterado.

A metodologia de análise desenvolvida para a quantificação de carbamato de etila em cachaça apresentou boa repetitividade, refletida nos reduzidos valores dos componentes de incerteza da razão de área e da curva de calibração.

O componente de incerteza dominante é o relacionado à recuperação do método.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq (Prometro - processo 554445/2006-9) pelo apoio financeiro e à Divisão de Metrologia de Materiais da Dimci/Inmetro pelas análises de DSC.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, VIM; *Vocabulário Internacional de Metrologia: Conceitos Fundamentais e Gerais e Termos Associados (VIM 2008)*, 1ª ed., Rio de Janeiro, 2009.
2. Associação Brasileira de Normas Técnicas – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial; *Guia para a Expressão da Incerteza de Medição*, 3ª ed., Rio de Janeiro, 2003.
3. Williams, A.; *Accred. Qual. Assur.* **1996**, *1*, 14.
4. EURACHEM/CITAC Working Group; *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, 2ª ed., London, 2000.
5. de Oliveira, E. C.; Aguiar, P. F.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 1655.
6. Horwitz, W.; Albert, R.; *Analyst* **1997**, *122*, 615.
7. Horwitz, W.; *J. AOAC Int.* **1998**, *81*, 785.
8. Hund, E.; Massart, D. L.; Smeyers-Verbeke, J.; *Anal. Chim. Acta* **2003**, *480*, 39.
9. de Beer, J. O.; Baten, P.; Nsengyumva, C.; Smeyers-Verbeke, J.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *32*, 767.
10. Associação Brasileira de Normas Técnicas, NBR ISO/IEC 17025; *Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio de calibração*, 2ª ed., Rio de Janeiro, 2005.
11. Dias, M. G.; Camões, M. F. G. F. C.; Oliveira, L.; *Food Chem.* **2008**, *109*, 815.
12. Ratola, N.; Santos, L.; Herbert, P.; Alves, A.; *Anal. Chim. Acta* **2006**, *573-574*, 202.
13. Leito, S.; Mölder, K.; Künnapas, A.; Herodes, K.; Leito, I.; *J. Chromatogr., A* **2006**, *1121*, 55.
14. Kuselman, I.; Shenhar, A.; *Accred. Qual. Assur.* **1997**, *2*, 180.
15. Love, J. L.; *Accred. Qual. Assur.* **2002**, *7*, 95.
16. de la Cruz, M. H. C.; Mattos, J. S.; Nunes, F. F.; Alvarenga, S. D. S.; Monteiro, T. M.; Cunha, R. D. C.; Rodrigues, J. M.; Aquino Neto, F. R.; Cunha, V. S.; *Resumos do Simpósio de Metrologia 2008*, Querétaro, México, 2008.
17. American Society for Testing and Materials, E-928; *Standard Test Method for Determination of Purity by Differential Scanning Calorimetry*, West Conshohocken, 2003.
18. Marcó, A.; Companyó, R.; Rubio, R.; Pueyo, M.; Vilalta, E.; *Microchim. Acta* **2007**, *159*, 387.
19. IUPAC; *Compendium of Chemical Terminology*, 2ª ed., Oxford, 1997.
20. Burns, D. T.; Danzer, K.; Townshend, A.; *Pure Appl. Chem.* **2002**, *74*, 2201.