

UFRRJ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

DISSERTAÇÃO

**Determinação da Incerteza Expandida Associada à Análise
de Açúcares Redutores pelo método de Lane-Eynon**

Juarez Vicente

2010



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

**DETERMINAÇÃO DA INCERTEZA EXPANDIDA ASSOCIADA À
ANÁLISE DE AÇÚCARES REDUTORES PELO MÉTODO DE LANE-
EYNON**

JUAREZ VICENTE

Sob a Orientação do Professor
Luiz Augusto da Cruz Meleiro

Co-orientação do Professor
Marcelo Azevedo Neves

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Seropédica, RJ
Maio de 2010

664.10202
V632d
T
Vicente, Juarez, 1985-.
Determinação da incerteza
expandida associada à análise de
açúcares redutores pelo método de
Lane-Eynon / Juarez Vicente - 2010.
79 f.: il.

Orientador: Luiz Augusto da Cruz
Meleiro.

Dissertação (mestrado) -
Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro, Programa de Pós-Graduação
em Ciência e Tecnologia de
Alimentos.

Bibliografia: f. 61-63.

1. Açúcar - Teses. 2. Açúcar -
Análise Teses. I. Meleiro, Luiz
Augusto da Cruz, 1965-. II.
Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós-Graduação
em Ciência e Tecnologia de
Alimentos. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

JUAREZ VICENTE

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de concentração em Ciência de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 07/05/2010

Luiz Augusto da Cruz Meleiro. D.Sc. DEQ/IT/UFRRJ
(Orientador)

Paulo Paschoal Borges. D.Sc. DQUIM/INMETRO

Cristiane Hess de Azevedo Meleiro. D.Sc. DTA/IT/UFRRJ

Tatiana Saldanha. Ph.D. DTA/IT/UFRRJ

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Ana e Ivo.
À Ivana, Lilian, Tia Paula, Nicolas e aos meus avós

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela existência e as oportunidades que sempre concedeste-me.

À toda minha família pelo apoio e incentivo, especialmente a dois heróis que Deus deu-me a oportunidade de que existissem e de serem eternos pertencentes em minha vida, chamados Mãe e Pai... Seres únicos, insubstituíveis, dos quais sinto o maior orgulho de tê-los que mesmo apesar da distância sempre estiveram presentes nas decisões, alegrias, decepções, através de opiniões, conselhos, carinhos... dois anjos dotados de qualidades e bondades raras, exemplos de vida, persistência, amor, doação e partilha. Exemplos que sempre fizeram parte e espelharam-me em todas as etapas da minha caminhada, verdadeiros amores da minha vida, amo muito vocês!

À Tati, por compartilhar de TODOS os momentos ao meu lado, sejam eles felizes ou difíceis, por ser minha companheira, minha amiga, minha namorada, por topar nossas loucuras, compreender nossas dificuldades, por me aceitar antes de qualquer coisa, por suportar toda a minha impaciência nesta nossa tão importante conquista. Obrigado por todos os seus preciosos ensinamentos, pelo seu apoio, pela sua paciência e dedicação. Enfim, por fazer parte da minha e partilhar da sua vida comigo... A ti meu amor, meu muito obrigado.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em especial ao Departamento de Tecnologia de Alimentos por todas as oportunidades de aprendizado, de aplicação dos conhecimentos adquiridos, aos cursos, congressos, palestras, seminários e viagens, expresso todo o meu carinho e profunda gratidão a todos os membros em especial às professoras Dr^a. Arlene Gaspar e Dr^a. Cristiane Hess pelo apoio e incentivo constante.

Aos meus professores orientadores Dr. Luiz Meleiro e Dr. Marcelo Neves pela atenção, paciência, dedicação, amizade, respeito, humildade e a todos os conhecimentos repassados.

Ao Prof. M. Sc. Ormino e ao Prof. Dr. Helio Jr. (Depto Engenharia Química) pela humildade, compreensão, colaboração, amizade e aos preciosos ensinamentos repassados.

A todos os amigos, estagiários, bolsistas, pesquisadores e inúmeros colegas que já passaram e/ou aos que atuam no Laboratório Analítico de Alimentos e Bebidas. Obrigado pelo apoio, compreensão, paciência e auxílio nas pesquisas.

Aos meus amigos em especial Juan, Ceará, Clitor, Aderbson, Dalua e John.

De antemão, à banca pela atenção e ao tempo dedicado às correções e certamente pelas prováveis contribuições que enriquecerão esta dissertação.

RESUMO

Do ponto de vista técnico-científico, a palavra “incerteza” expressa a dúvida em relação a um resultado analítico. A aplicação do conceito de incerteza de medição é fundamental para os laboratórios brasileiros que almejam obter o reconhecimento da capacidade de realização de ensaios em conformidade com a norma ABNT NBR ISO/IEC 17025. Independentemente da área de atuação, é de extrema importância o estudo e o conhecimento da incerteza de medição associada a um resultado de análise, em particular quando aplicado à indústria de alimentos. A incerteza expandida informa o grau de confiabilidade de um resultado analítico e, através dela, é possível avaliar, a um nível de abrangência estabelecido, se o resultado de uma análise transmite credibilidade, ou seja, se o valor da incerteza está em uma faixa de concentração aceitável ou não. Quando o percentual de incerteza ultrapassa o limite aceitável, é necessário conhecer quais as variáveis do método que mais contribuem para a incerteza e executar as medidas corretivas a fim de minimizar este impacto e, conseqüentemente, reduzir a incerteza total. O objetivo geral deste trabalho foi determinar a incerteza expandida associada à análise titulométrica de açúcares redutores totais (ART) pelo método de Lane-Eynon, tendo como matriz uma amostra de mel, utilizando balança analítica e semi analítica e buretas de 10mL e 25mL. Para o cálculo da incerteza padrão (u), utilizaram-se os dados obtidos nos certificados de calibração de equipamentos e vidrarias empregados na análise. A incerteza combinada (u_c) foi obtida derivando os fatores de influência e considerando, quando necessário, o grau de liberdade efetivo (ν_{eff}), dado pela Equação de Welch-Satterthwaite. Obteve-se a incerteza expandida (U) multiplicando-se por 2 (dois) o valor de u_c para um nível de confiança de 95,45%. Os resultados obtidos mostraram que a incerteza expandida de ART utilizando balança analítica não foi significativa (<2%) e que a variável que mais influenciou foi o volume de amostra gasto (~80%), seguido do Título (~20%). A análise da incerteza expandida de ART obtida com balança semi analítica e buretas de 10mL e 25mL gerou resultados confiáveis. No entanto, deve haver cautela neste caso, especialmente ao se utilizar bureta de 25mL, visto que o valor percentual de incerteza superou 3,5%. Observa-se que a variável que mais contribui para a incerteza foi o Título com 79,82% (bureta de 10mL) e 87,10% (bureta de 25mL).

Palavras-chave: Açúcares redutores totais (ART), incerteza expandida e confiabilidade.

ABSTRACT

From the scientific viewpoint, the word “uncertainty” expresses doubt about an analytic result. The implementation of the concept of uncertainty of measurement is a crucial step that the Brazilian laboratories must take in the process for obtaining the certification of the ability to perform essays in accordance with the Brazilian technical norm ABNT NBR ISO/IEC 17025. Regardless the technical area of application, the determination of the uncertainty of measurement associated with the result of an analysis is extremely important, especially in the food industry. The expanded uncertainty is related with the degree of reliability of an analytical result, and by means of this information it is possible to evaluate if the result of an analysis is consistent, i.e., if the uncertainty associated to the measurement remains inside an acceptable range. When the percentage of uncertainty exceeds a threshold, it is necessary to find the process variables that more intensely contribute to increasing the uncertainty and, in the sequence, to take corrective actions in order to minimize the impact caused for those variables over the uncertainty of measurement. The aim of this study was to detect the uncertainty of measurement associated with the analysis of total reducing sugars (TRS) by the Lane-Eynon method. The equipments used were analytical and semi analytical balances, burettes with 10mL and 25mL, and the food matrix studied was wild honey. To perform the calculations of the standard uncertainty, u , information about the uncertainty of the laboratory materials used in the analysis – obtained from the certificate of calibration. The combined uncertainty, u_c , was obtained by deriving the influence factors and considering, if necessary, the effective degree of freedom, ν_{eff} , as stated in the Welch-Satterthwaite equation. The expanded uncertainty, U , was obtained by multiplying u_c by the appropriate coverage factor, $k = 2$ (at level of confidence of 95,45%). The results showed that the expanded uncertainty obtained for the analysis of TRS was less than 2,0% when the analytical balance was used. The process variable having the greatest impact was the volume (close to 80,0%), followed by the title (close to 20,0%). The analysis of the expanded uncertainty obtained for the analysis of TRS when the semi analytical balance, and 10mL as well as 25mL burettes were used provided reliable results. However, care must be taken in such a combination of equipments, especially when using the 25mL burettes, since the percentage of uncertainty was great than 3,5%, too close to the limit established by the *Codex Alimentarius*, 4,0%. It was observed that, in this case, the variable having the greatest impact on the uncertainty was the title, with 79,82% (10mL burettes), and 87,10% (25mL burettes).

Keywords: Total reducing sugars (TRS), expanded uncertainty and reliability.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Divisor utilizado em cada distribuição de probabilidade	18
Tabela 2. Relação entre nível de confiança e fator de abrangência	24
Tabela 3. Valores de incerteza	36
Tabela 4. Componentes da incerteza	45
Tabela 5. Componentes da incerteza do Título	48
Tabela 6. Contribuição das componentes da incerteza do Título	49
Tabela 7. Contribuição das etapas para a incerteza de ART	51
Tabela 8. Dados das variáveis do Título com balança semi-analítica e buretas de 10mL e 25mL	52
Tabela 9. Contribuição das variáveis para a incerteza do Título utilizando balança semi-analítica e buretas de 10mL	53
Tabela 10. Contribuição das variáveis para a incerteza do Título utilizando balança semi-analítica e buretas de 25mL	53
Tabela 11. Volumes (mL) da amostra de mel para o cálculo de ART nas condições de balança semi-analítica com buretas de 10mL e 25mL	54
Tabela 12. Contribuição das variáveis para a incerteza do teor de ART utilizando balança semi-analítica e bureta de 10mL	55
Tabela 13. Contribuição das variáveis para a incerteza do teor de ART utilizando balança semi-analítica e bureta de 25mL	55
Tabela 14. Valores de pH inicial e final da reação em pHmetro ligado ao Redutec®	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da distribuição normal (forma de um sino).	19
Figura 2. Representação química de uma aldose (polihidroxialdeído) e uma cetona (poliidroxicetona), respectivamente.	27
Figura 3. Moléculas de lactose (A) e sacarose (B), dois importantes dissacarídeos presentes na cana e no leite, respectivamente.	29
Figura 4. Reações do Método de Lane-Eynon.	30
Figura 5. Reações do Método ADNS.	31
Figura 6. Redutec® - Determinador de Açúcares Redutores utilizado no experimento.	35
Figura 7. Diagrama de identificação das variáveis de influência quanto à contribuição de incerteza final.	40
Figura 8. Variáveis de contribuição na incerteza do Título.	49
Figura 9. Contribuições de cada variável do método de Lane-Eynon na incerteza total.	52
Figura 10. Contribuições para incerteza do Título utilizando balança semi-analítica e buretas de 10mL e 25mL.	53
Figura 11. Contribuições para incerteza do teor de ART utilizando balança semi-analítica e buretas de 10mL e 25mL.	56

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS OU SÍMBOLOS

U – Incerteza expandida.

u_c – Incerteza combinada.

u – Incerteza padrão.

$u(x)$ – Incerteza padrão associada aos dados de entrada.

$u(y)$ – Incerteza padrão associada aos dados de saída.

u_A – Incerteza padrão do tipo A.

u_B – Incerteza padrão do tipo B.

u_a – Incerteza padrão relativa a amostra.

u_p – incerteza padrão relativa ao padrão.

k – Fator de abrangência ou coeficiente de expansão.

p – Probabilidade ou nível de confiança.

s – Desvio padrão amostral.

s^2 – Variância amostral.

\bar{x} - Média aritmética amostral.

σ – Desvio padrão populacional.

μ – Média aritmética populacional.

n – Número de medições ou repetições.

ART – % Açúcares redutores totais.

ABNT NBR ISO/IEC 17025 – Requisitos gerais para competência de laboratório de ensaio e calibração.

CGCRE/INMETRO – Coordenação Geral de Acreditação do Inmetro.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia e Qualidade Industrial.

T – Título da solução padrão de glicose.

d – Diluição (volume do balão volumétrico utilizado para a diluição).

d_a – Diluição relativa à amostra.

d_p – Diluição relativa ao padrão.

m_a – massa da amostra (g).

m_p – massa do padrão (g).

ν_{eff} – Grau de liberdade efetivo.

V_a – Volume (mL) da amostra.

V_p – Volume (mL) da solução padrão.

VIM – Vocabulário Internacional de Metrologia.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1. Incerteza.....	15
2.1.1 Avaliação da Incerteza Padrão do Tipo A.....	16
2.1.2 Avaliação da Incerteza Padrão do Tipo B.....	17
2.2. Incerteza Padrão.....	18
2.2.1 Distribuição Normal (Gaussiana).....	19
2.2.2 Distribuição Retangular (Uniforme).....	20
2.2.3 Distribuição Triangular.....	21
2.3. Incerteza Padrão Combinada.....	21
2.3.1 Coeficiente de sensibilidade.....	23
2.4. Incerteza Expandida.....	23
2.5. Expressões e Terminologias.....	24
2.6. Carboidratos.....	25
2.6.1 Nomenclatura e Classificação dos Carboidratos.....	27
2.6.2 Métodos de Análises de Carboidratos.....	30
2.7. Titulação Redox.....	33
2.8 Matriz.....	34
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1. Materiais.....	35
3.2 Métodos.....	37
3.2.1 Procedimento experimental para determinação do teor de ART.....	37
3.2.2 Identificação das fontes de incerteza.....	40
3.2.2 Cálculo das incertezas padrão, combinada e expandida.....	41
3.2.3 Avaliação das componentes.....	41
3.2.4 Avaliação da contribuição de incerteza do Título e ART utilizando balança semi analítica e buretas de 10mL e de 25mL.....	46
3.2.5 Determinação do ponto final da reação com medição de pH.....	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.1 Título.....	48
4.2 ART na amostra de mel.....	50
4.3 Determinação da incerteza expandida utilizando balança semianalítica e bureta de 10mL e de 25mL.....	52
4.4 Determinação do ponto final da reação por medição de pH.....	56
4.5 Sugestões para Trabalhos Futuros.....	58
5. CONCLUSÕES.....	59
6. REFERÊNCIAS.....	61
7. ANEXOS.....	64

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas é perceptível o elevado crescimento no uso de técnicas ou ferramentas estatísticas na área científica e industrial, com foco na melhoria contínua da qualidade, produtividade e na obtenção de novos produtos.

Cada vez mais é visível e necessário que tomadas de decisões sejam baseadas em resultados analíticos e por meio desses resultados, produtos e subprodutos são comprados, limites e legislações são instituídas, empresas são fechadas ou mantidas, autoridades tomam atitudes e prejuízos ou lucros acontecem.

Sendo assim, quando se emite um resultado de qualquer espécie, é necessário saber, ou ao menos estimar, o quanto se pode confiar neste resultado, ou o quanto o mesmo está próximo da realidade. A confiança em tal resultado é obtida através de um conjunto de procedimentos visando favorecer o aumento da qualidade da informação.

Para obtermos dados experimentais confiáveis, é necessário que executemos um procedimento bem definido, com os detalhes operacionais que são dependentes da finalidade do experimento.

A aplicação do conceito de incerteza de medição é fundamental para os laboratórios brasileiros que almejam obtenção de reconhecimento da capacidade de realização de ensaios em conformidade com a norma ABNT NBR ISO/IEC 17025.

A norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 estabelece os requisitos gerais necessários para a competência de realização de ensaios e/ou calibrações. Esta norma se aplica a todos os laboratórios que realizam ensaios e/ou calibrações, independente do número de pessoas ou da extensão do escopo das suas atividades, e deve ser utilizada no desenvolvimento do seu sistema de gestão para qualidade, operações técnicas e administrativas do laboratório.

A utilização da palavra incerteza transmite certo desconforto imediato, uma sensação de insegurança. Do ponto de vista técnico-científico, esta palavra expressa dúvida em relação a um resultado analítico. Independentemente da área de atuação, é de extrema importância o estudo e o conhecimento da incerteza de medição associada a um resultado de análise, em particular quando aplicada a indústria de alimentos. O conhecimento da incerteza possibilita a tomada de decisões quanto às conformidades econômicas, legais e de saúde em produtos passíveis de fiscalização.

Medição é definida pelo VIM (2009) como o “processo de obtenção experimental de um ou mais *valores* que podem ser, razoavelmente, atribuídos a uma *grandeza*”. Em geral, o

resultado de uma medição é somente uma aproximação ou estimativa do valor verdadeiro e, dessa forma, só é completa quando acompanhada pela incerteza dessa estimativa. Entretanto, incerteza de medição é um parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas.

A busca pela melhoria da qualidade analítica de resultados é um desafio contínuo e que deve estar presente em laboratórios de análise e calibração. Dessa forma, os laboratórios que atuam na área de alimentos e que almejam a acreditação, devem comprovar a sua capacidade de realização de ensaios em conformidade com a norma ABNT NBR ISO/IEC 17025.

Além de ser um requisito para obtenção da acreditação, o laboratório pretendente deve estimar a incerteza expandida dos resultados de análise para os quais almeja o reconhecimento. A incerteza de medição, por ser uma ferramenta importante no monitoramento da qualidade analítica de ensaios, vem se desenvolvendo em elevada expansão em diversas áreas do conhecimento, inclusive na área de alimentos em ensaios químicos. No entanto, é notório que os grandes responsáveis pela produção de conhecimento científico nesta área são, principalmente, os profissionais dos ramos da física, engenharia mecânica e elétrica devido ao grande número de trabalhos científicos divulgados no meio acadêmico.

Uma área que já utiliza esta ferramenta para o controle de seus produtos e processos, devido à importância de seus resultados e a necessidade de que os mesmos sejam extremamente confiáveis é a indústria farmacêutica, em especial, a produção de fármacos.

Este trabalho concentra esforços no sentido de contribuir para o aumento de informações relativas a incertezas de medições aplicadas a laboratórios de análise de alimentos, utilizando como objeto de estudo a técnica de análise titulométrica de açúcares de ampla utilização em laboratórios deste setor.

O objetivo geral deste trabalho foi determinar a incerteza expandida associada à análise de açúcares redutores pelo método de Lane-Eynon, utilizando amostra de mel como matriz. Para tanto, estabeleceram-se alguns objetivos específicos que consistiram em distinguir, conceituar e aplicar corretamente os diferentes tipos de incerteza; identificar as diferentes formas de contribuições de incerteza e tratá-las adequadamente; identificar as etapas que contribuem significativamente para a incerteza final do resultado; calcular o grau de liberdade efetivo (v_{eff}) e o fator de abrangência (k) adequado e, determinar a incerteza expandida associada ao título obtido no padrão de glicose.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Incerteza

Incerteza refere-se à falta de conhecimento, à dúvida e/ou à insegurança de uma ação ou efeito, neste caso, porém de um resultado. A utilização desta palavra do ponto de vista técnico-científico, expressa a dúvida ou a imperfeição em relação a um resultado analítico (INMETRO, 2003).

Segundo o Vocabulário Internacional de Metrologia *Incerteza de medição* é um parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos *valores* atribuídos a um *mensurando*, com base nas informações utilizadas (VIM, 2009).

O Guia EURACHEM/CITAC (2002) define Incerteza (de medição), baseado no conceito adotado pelo VIM de 2002 como sendo “um parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão de valores que poderiam ser razoavelmente atribuídas ao mensurando”. Essa mesma definição é também utilizada pela norma do INMETRO NIT-DICLA-021 (2007), a qual harmoniza a avaliação da incerteza de medição na calibração. Esse “parâmetro” pode ser um desvio padrão (ou múltiplo dele), ou ainda a metade de um intervalo correspondente a um nível de confiança estabelecido. (EURACHEM/CITAC, 2002).

A incerteza de medição compreende, em geral, muitos componentes, dos quais alguns podem ser estimados por meio da distribuição estatística dos resultados das séries de medições e podem ser caracterizados como desvios padrão experimentais. Os demais componentes, que também podem ser caracterizados por desvios padrão, são avaliados com base na distribuição de probabilidades assumidas, levando em conta a experiência e outras informações (EURACHEM/CITAC, 2002).

De acordo com INMETRO (2003) diversas são as fontes de incerteza de medição possíveis, as quais prevalecem: a definição incompleta do mensurando; a realização imperfeita do mensurando; amostragem não representativa; conhecimento inadequado dos efeitos das condições ambientais sobre a medição; erro de tendência pessoal na leitura de instrumentos; valores inexatos dos padrões de medição e materiais de referência; valores inexatos de constantes e de outros parâmetros; aproximações ou suposições incorporadas ao método e procedimentos de medição e variações nas observações repetidas do mensurando sob condições aparentemente idênticas (EURACHEM/CITAC, 2002).

As fontes de incerteza citadas acima podem não ser necessariamente independentes,

ou seja, uma fonte pode contribuir para que a outra aconteça ou se intensifique. Naturalmente, um efeito sistemático que não tenha sido reconhecido, não pode ser considerado na avaliação da incerteza do resultado de uma medição, porém contribui para seu erro (EURACHEM/CITAC, 2002; INMETRO, 2003).

Na estimativa da incerteza total, pode ser necessário tratar separadamente cada fonte de incerteza para se obter a contribuição de cada uma individualmente. Cada uma das distintas contribuições é denominada “*componente de incerteza*”. Quando cada componente de incerteza é expresso como um desvio padrão, essa componente é conhecida por *incerteza padronizada* (EURACHEM/CITAC, 2002)

A incerteza do resultado de uma medição normalmente contém vários componentes. Esses diversos componentes, variáveis ou incertezas de entrada $u(x)$, podem ser agrupados em duas categorias, de acordo com as características do método utilizado para avaliá-los, sendo avaliação da incerteza do Tipo A e avaliação da incerteza do Tipo B (MENDES & ROSÁRIO, 2005).

2.1.1 Avaliação da Incerteza Padrão do Tipo A

A avaliação da incerteza tipo A é “o método de avaliação pela análise estatística de uma série de observações”, portanto, pode ser caracterizado pelo desvio padrão experimental (EURACHEM/CITAC, 2002; MENDES & ROSÁRIO, 2005).

O desvio padrão experimental da média é obtido de um procedimento de análise, do cálculo da média aritmética ou de uma análise de regressão adequada (INMETRO, 2003).

A melhor estimativa de uma grandeza que varia aleatoriamente é a média aritmética, \bar{x} , das diversas, n , observações independentes obtidas sob as mesmas condições de medição. A variância estimada, s^2 , ou desvio padrão estimado, s , caracteriza a variabilidade dos valores medidos, X_i , ou seja, a dispersão em torno do valor médio (MENDES & ROSÁRIO, 2005).

A melhor estimativa da variância da média é a variância experimental da média, $s^2(\bar{x})$, que origina o desvio padrão experimental da média, $s(\bar{x})$, cuja equação é:

$$s^2(\bar{x}) = \frac{s^2}{n} \quad (1)$$

Logo,

$$\bar{s} = s(\bar{x}) = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (2)$$

O desvio padrão experimental da média, equação (2), quantifica quanto o valor médio representa a grandeza a ser medida X_i . Quanto maior for o número de repetições, tanto melhor será esta estimativa (MENDES & ROSÁRIO, 2005).

Por razões principalmente de caráter econômico o número de repetições, n , de uma medição é reduzido, variando tipicamente entre três e dez. Quando isso acontece, é necessário utilizar um coeficiente, conhecido como coeficiente t-Student, que considera o fato da amostragem ser pequena. Essa distribuição t-Student permite estimar a incerteza tipo A, obtida estatisticamente, mesmo com pequeno número de repetições (MENDES & ROSÁRIO, 2005).

Deste modo, a Incerteza padrão tipo A, u_A , para um nível de significância (confiança) de 95,45% de probabilidade é obtida através da equação (3) abaixo:

$$u_A = \frac{s}{\sqrt{n}} t \quad (3)$$

Onde t é o valor $t_p(v)$ da distribuição-t, para v graus de liberdade, os quais são iguais a $n-1$ para uma grandeza única estimada pela média aritmética de n observações independentes.

2.1.2 Avaliação da Incerteza Padrão do Tipo B

A avaliação da incerteza padrão do Tipo B “é o método de avaliação da incerteza por outros meios que não a análise estatística de uma série de observações” (EURACHEM/CITAC, 2002; MENDES & ROSÁRIO, 2005). Neste caso, a avaliação é baseada no julgamento científico. Geralmente são calculados em função de uma probabilidade assumida ou por desvios padrões estimados, que levam em conta a experiência do analista ou outras observações (INMETRO, 2003; MENDES & ROSÁRIO, 2005).

Mendes e Rosário (2005) enfatizam que incertezas do tipo B são determinadas a partir de informações acessórias e externas ao processo de medição, tais como resultados de medições similares anteriores, experiência e conhecimento do comportamento do instrumento, dados do fabricante, dados do certificado de calibração e manuais de instrução. Os autores citam que gradientes e oscilações de temperatura durante a medição, tipo de medidor (analógico ou digital), instabilidade da rede elétrica, instabilidade de padrões, deformações mecânicas, estabilidade temporal são alguns exemplos deste tipo de incerteza.

Uma avaliação da incerteza padrão do tipo B exige discernimento baseado na experiência e conhecimento geral, sendo essa uma habilidade que pode ser desenvolvida com a prática pelo analista. Quando bem fundamentada, utilizando adequadamente a informação disponível, essa pode ser tão confiável quanto uma avaliação do tipo A, especialmente em uma situação em que a avaliação do tipo A é baseada somente em um número pequeno de medições estatisticamente independentes (INMETRO, 2003).

Algumas observações são importantes para avaliação da incerteza. Sempre que possível os erros sistemáticos devem ser corrigidos, e, ao adicionar as incertezas do tipo B, deve ser feita uma análise criteriosa para que não haja repetição, isto é, que não se considere mais de uma vez a mesma fonte de incerteza (MENDES & ROSÁRIO, 2005).

2.2. Incerteza Padrão

É a incerteza associada aos dados de entrada $u(x)$ relativos ao resultado de medição e é expressa como um desvio padrão estimado do mensurando. Em alguns casos utiliza-se a incerteza padrão relativa de medição, que é a incerteza padrão de medição associada a uma estimativa dividida pelo módulo desta estimativa, portanto adimensional. Quando a estimativa for igual a zero este conceito não se aplica (INMETRO, 2003).

Essa incerteza deve expressar todas as componentes, tipos A e B, correspondentes a um desvio padrão. Para obtê-la divide-se o valor de cada contribuição de incerteza pelo seu respectivo divisor correspondente à distribuição de probabilidade assumida ou atribuída, de acordo com a Tabela 1 abaixo, que mostra o divisor atribuído a cada distribuição (MENDES & ROSÁRIO, 2005).

Tabela 1. Divisor utilizado em cada distribuição de probabilidade.

Distribuição	Divisor
Normal (certificado de calibração)	k (Fator de abrangência)
Retangular	$\sqrt{3}$
Triangular	$\sqrt{6}$

Fonte: MENDES & ROSÁRIO, 2005.

2.2.1 Distribuição Normal (Gaussiana)

É a distribuição de probabilidade mais importante dentre as utilizadas em Metrologia. Sua função densidade de probabilidade tem forma de um sino (Figura 1) sendo média, μ , e desvio padrão, σ , representados abaixo (MENDES & ROSÁRIO, 2005).

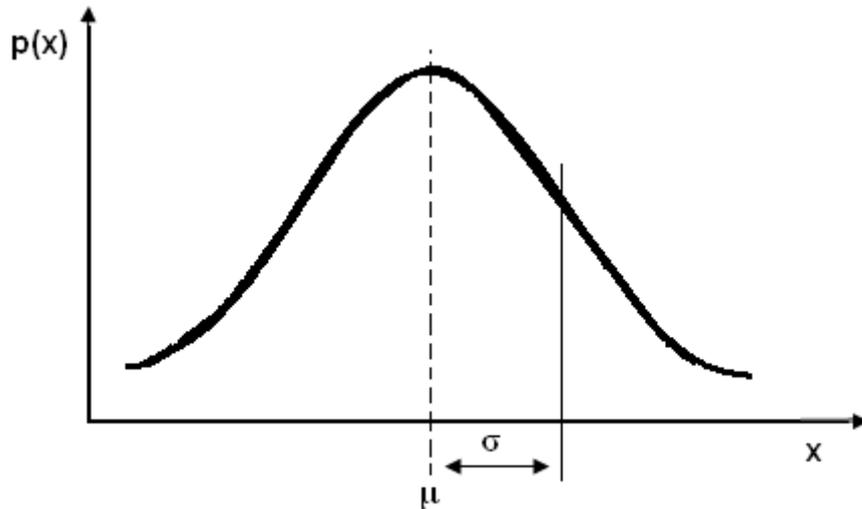


Figura 1. Representação da distribuição normal.

A distribuição normal possui a seguinte equação (4):

$$p(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{z^2}{2}} \quad (4)$$

onde:

$$z = \frac{x - \mu}{\sigma} \quad (5)$$

Segundo Mendes e Rosário (2005) quanto maior o número de medições feitas de um mesmo mensurando, mais próximos da “normalidade”, ou seja, mais próximo da distribuição normal será seu comportamento. À medida que aumenta o número de medições ($n > 200$) a distribuição tende a ser normal.

Para se obter uma distribuição próxima à normal, faz-se necessário um número grande de medições ($n > 200$). Entretanto, como não é viável realizar em um laboratório 200 medições de um mesmo mensurando, deve-se aplicar um fator de correção com o objetivo de aproximar, ou estimar, a distribuição de pequenos valores a uma distribuição normal. Esse fator é conhecido como t-Student, e é calculado em função do tamanho da amostra, n , e do grau de liberdade, ν , além do nível de confiança (probabilidade) desejado. Utiliza-se,

geralmente, o nível de confiança de 95,45% (MENDES & ROSÁRIO, 2005). O coeficiente t-Student é um dado tabelado (anexo A), porém também pode ser facilmente calculado através dos conceitos de estatística básica .

Qualquer que seja a distribuição estatística, a distribuição das médias amostrais será normalmente distribuída. À medida que aumenta o tamanho da amostra, as médias amostrais tenderão progressivamente a uma distribuição normal, sendo o desvio padrão da distribuição normal representado matematicamente pela equação (6) abaixo (sendo s o desvio padrão da amostra). Essa tendência é denominada de Teorema do Limite Central (MENDES & ROSÁRIO, 2005).

$$s(\bar{x}) = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (6)$$

2.2.2 Distribuição Retangular (Uniforme)

É uma distribuição que descreve razoavelmente, em termos de probabilidade, o conhecimento inadequado sobre a grandeza de entrada, na ausência de qualquer outra informação que não os limites de variabilidade (INMETRO, 2003).

Sabe-se que valores de uma grandeza em questão, próximos ao centro do intervalo de variabilidade são mais prováveis do que valores próximos aos limites, quando uma distribuição triangular ou normal pode ser um modelo melhor empregado. No entanto, se os valores próximos aos limites são mais prováveis do que valores próximos ao centro, uma distribuição em forma de “U” pode ser mais apropriada (INMETRO, 2003).

A distribuição retangular é bem aplicada quando há uma distribuição com densidade de probabilidade constante entre os limites superior e inferior, devendo assim ser suposta para a possível variabilidade da grandeza de entrada (INMETRO, 2003). Desta maneira quando a distribuição de probabilidade for a mesma num determinado intervalo, ou seja, quando a probabilidade de ocorrer de maneira igual a todo o intervalo, tem-se uma distribuição retangular, cujo divisor é $\sqrt{3}$ (MENDES & ROSÁRIO, 2005).

A distribuição retangular é adotada, na maioria dos casos, para a resolução de instrumentos de medição, por ser considerada uma distribuição mais conservadora, pois aumenta um pouco a incerteza final. Sendo assim quando na dúvida de qual distribuição adotar, recomenda-se a retangular por fornecer uma incerteza maior e não privilegiar nenhum intervalo (MENDES & ROSÁRIO, 2005).

Quando não houver base para se crer que é mais provável um erro maior ou um erro menor, a estimativa de incerteza deve ser tratada como caracterizando uma distribuição retangular (INMETRO, 2002).

2.2.3 Distribuição Triangular

É a distribuição utilizada quando a probabilidade de ocorrência do resultado de uma medição for maior na parte central, e que apresente a tendência de decair linearmente nas extremidades de um determinado intervalo (MENDES & ROSÁRIO, 2005).

Se os limites de um intervalo de dados forem informados sem um nível de confiança, mas com razões para supor que valores extremos sejam improváveis, assume-se geralmente uma distribuição triangular, utilizando-se o divisor da distribuição como $\sqrt{6}$ (INMETRO, 2002; MENDES & ROSÁRIO, 2005).

Quando houver uma tendência, ou seja, quando um erro menor ou então um erro maior for considerado substancialmente mais provável a estimativa da incerteza deve ser tratada como uma distribuição triangular (INMETRO, 2002).

Alguns profissionais de Metrologia adotam a distribuição triangular para estimar a incerteza de indicadores analógicos (tipo ponteiro). Sua incerteza final é menor quando comparada à utilização da distribuição retangular para este mesmo caso (MENDES & ROSÁRIO, 2005).

2.3. Incerteza Padrão Combinada

A incerteza combinada ou incerteza padrão combinada (u_c) é a incerteza padrão do resultado de uma medição quando este resultado é obtido por meio dos valores de várias outras grandezas (MENDES & ROSÁRIO, 2005).

Esta incerteza é definida matematicamente como igual à raiz quadrada positiva de uma soma de termos, sendo estes as variâncias e/ou covariâncias destas outras grandezas, ponderadas de acordo com quanto o resultado da medição varia com mudanças nestas grandezas. Calcula-se a incerteza combinada, u_c , conforme as expressões matemáticas (7), (8) e (9) (INMETRO, 2003):

O Guia para a Expressão da Incerteza de Medição (INMETRO, 2003) declara que a

incerteza padrão combinada, $u_c(y)$, é a *combinação* das incertezas do Tipo A e do Tipo B. Define ainda, que esta incerteza é a raiz quadrada positiva da variância combinada, $u_c^2(y)$, que é dada por:

$$u_c^2(y) = \sum_{i=1}^n \left[\frac{\partial y}{\partial x} \right]^2 u^2(x_i) \quad (7)$$

ou

$$u_c^2(y) = \sum_{i=1}^N u_i^2(x) \quad (8)$$

ou

$$u_c(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^N u_i^2(x)} \quad (9)$$

A incerteza combinada, u_c , pode ser obtida derivando os fatores de influência, considerando quando necessário o grau de liberdade efetivo, ν_{eff} , através da equação de Welch-Satterthwaite (10) (11) (INMETRO, 2003; MENDES & ROSÁRIO, 2005):

$$\nu_{\text{eff}} = \frac{u^4(y)}{\sum_{i=1}^n \frac{u_i^4(y)}{\nu_i}} \quad (10)$$

ou

$$\frac{u_c^4}{\nu_{\text{eff}}} = \frac{u_1^4}{\nu_1} + \frac{u_2^4}{\nu_2} \dots \frac{u_n^4}{\nu_n} \quad (11)$$

Os graus de liberdade, ν , são iguais a $n-1$ para uma grandeza única estimada pela média aritmética de n observações independentes. Se n observações independentes são usadas para determinar tanto a inclinação como a interseção de uma linha reta pelo método dos mínimos quadrados, o grau de liberdade de suas respectivas incertezas padrão é $\nu = n-2$ (INMETRO, 2003).

O número de grau de liberdade efetivo, ν_{eff} , é o número de termos de uma soma menos o número de restrições aos termos da soma. Quando fazemos um numero reduzido de medições, aproxima-se de uma distribuição normal, aplicando-se o fator de correção da distribuição de t-Student (MENDES & ROSÁRIO, 2005).

Estima-se o grau de liberdade efetivo resultante da incerteza combinada quando as incertezas padrão de várias fontes de incerteza são consideradas para estimar a incerteza padrão combinada (MENDES & ROSÁRIO, 2005).

2.3.1 Coeficiente de sensibilidade

É a variação diferencial na estimativa de saída gerada por uma variação diferencial em uma estimativa de entrada dividida por esta variação na estimativa de entrada (NIT-DICLA-021, 2007).

As derivadas parciais, $\frac{\partial y}{\partial x}$, apresentadas na equação (7), são frequentemente denominadas *coeficientes de sensibilidade*, e, descrevem como a estimativa de saída, y , varia em função das alterações dos valores das estimativas de entrada, $x_1, x_2... x_n$. Em particular, a alteração em y provocada por uma variação em Δx_i na estimativa de entrada x_i , é dada por $(\Delta y)_i = (\partial y / \partial x_i)(\Delta x_i)$. Caso esta alteração seja gerada pela incerteza padrão da estimativa x_i , a variação correspondente em y é $(\partial y / \partial x_i) u(x_i)$. A variância combinada, $u_c^2(y)$, pode ser vista como a soma de termos, onde cada um deles representa a variância estimada associada com a estimativa de saída y gerada pela variância estimada, associada com cada estimativa de entrada x_i (INMETRO, 2003).

Os coeficientes de sensibilidade são determinados experimentalmente e medem a variação em Y causada por uma variação em um dado X_i , enquanto se mantêm constantes as demais grandezas de entrada (INMETRO, 2003). É importante conhecer o coeficiente de sensibilidade porque este parâmetro informa quanto uma variável influencia no resultado final de uma medida indireta e, através dele, minimizar tal influência e reduzir assim a sua incerteza (MENDES & ROSÁRIO, 2005).

2.4. Incerteza Expandida

Incerteza Expandida, U , é a grandeza que define um intervalo em torno do resultado de uma medição, com o qual se espera abranger uma fração da distribuição dos valores que possam ser razoavelmente atribuídos ao mensurando (INMETRO, 2003).

Essa Incerteza é calculada multiplicando-se a incerteza combinada, u_c , por um fator de abrangência, k , a uma dada probabilidade assumida (geralmente 95,45%) da distribuição de Student (t) (MENDES & ROSÁRIO, 2005).

Nos casos em que uma distribuição gaussiana (normal) possa ser atribuída ao mensurando e a incerteza padrão associada à estimativa de saída tenha suficiente confiabilidade, o fator de abrangência padronizado, $k = 2,00$, deve ser utilizado (NIT-DICLA 021).

O valor k atribuído a expansão requerida para a incerteza combinada calculada. A multiplicação por um constante, k , não fornece nenhuma informação adicional, é apenas uma maneira de representar a incerteza final a um nível de confiança estabelecido. O valor obtido atribuído o intervalo de dados com a probabilidade de ocorrência associado ao resultado de medição. A incerteza expandida, U , pode ser calculada através das equações (12) e (13) abaixo (INMETRO, 2003; MENDES & ROSÁRIO, 2005):

$$U = k \cdot u_c \quad (12)$$

Ou

$$U = k_p \cdot u_c \quad (13)$$

Assumindo-se uma distribuição normal, a Tabela 2, a seguir relaciona o fator de abrangência, k , a um dado nível de confiança, p . Quando temos um número elevado de medições ($n > 30$), utiliza-se como regra $k = 2$ para expressar a incerteza expandida (MENDES & ROSÁRIO, 2005):

Tabela 2. Relação entre nível de confiança e fator de abrangência.

Nível de confiança p (%)	Fator de abrangência k
68,27	1,000
90,00	1,645
95,00	1,960
95,45	2,000
99,00	2,576
99,73	3,000

Fonte: MENDES & ROSÁRIO (2005).

2.5. Expressões e Terminologias

É de extrema importância que as expressões utilizadas em Metrologia sejam bem entendidas, pois se tratando de um assunto relativamente recente faz-se necessário que os conceitos sejam apresentados de modo bem claro.

As expressões “mensurando”, “erro” e “incerteza” são frequentemente mal interpretadas. Assim sendo, com o intuito de tornar mais clara a presente discussão, o

Vocabulário Internacional de Metrologia (2009) define mensurando como a “*Grandeza que se pretende medir*”. Semelhante, é o conceito adotado pelo Guia para a Expressão da Incerteza de Medição (INMETRO, 2003), que define Mensurando como sendo a “*grandeza a ser medida*”, como também, a “*Grandeza específica sujeita à medição*” (NIT-DICLA 021).

É importante ressaltar a distinção dos conceitos “erro” e “incerteza”. Erro de medição é definido como a “*Diferença entre o valor medido de uma grandeza e um valor de referência*” (VIM 2008).

Matematicamente, o erro pode ser positivo ou negativo: quando positivo, denota que a medição do instrumento é maior que o valor verdadeiro; já quando o erro é negativo, a medição é menor que o valor verdadeiro (MENDES & ROSÁRIO, 2005).

Uma situação simples, mas que se presta a ilustrar o conceito matemático de erro, é quando intencionalmente adiantamos a hora marcada em um relógio em cinco minutos (por exemplo, para evitar atrasos). Neste caso, estamos frente a um erro positivo de + 5 (mais cinco) minutos, por exemplo. Se quisermos saber a hora exata, temos que subtrair da leitura (medição) cinco minutos (erro).

Portanto, temos um valor numérico para o erro quando conhecemos o valor verdadeiro do mensurando, determinado através de uma calibração e/ou de um ajuste. Desta forma, podemos somar tal valor de erro, ou diminuí-lo, da leitura e assim obter o valor verdadeiro.

Conforme definido na seção 2.1, ressalta-se novamente que a incerteza de medição é um “*Parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas*” (VIM, 2009).

A incerteza expressa, porém, o efeito de uma flutuação do valor obtido na medição e é conceituada como a dúvida associada ao valor que se procura. Como não existe valor absoluto para a medição, a incerteza sempre existirá e não poderá ser eliminada.

2.6. Carboidratos

É a classe de biomoléculas mais abundante na natureza e é o principal meio de abastecimento energético, através de oxidação, em células não fotossintéticas. O carboidrato é a única fonte energética aceita pelo cérebro, importante para o funcionamento do coração e todo sistema nervoso (FELTRE, *et. al.*, 1974).

Os açúcares, amidos e a celulose, compostos que têm importantes funções estruturais e de energia nos seres vivos, são todos hidratos de carbono; os açúcares são os carboidratos

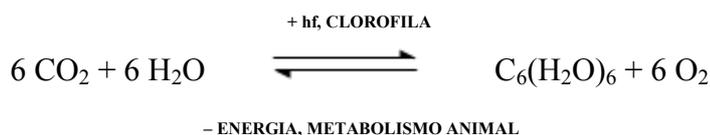
solúveis em água. Os carboidratos recebem o nome de hidratos de carbono ou carboidratos porque a fórmula geral empírica de muitos membros da família pode ser escrita por $C_n(H_2O)_n$, ou seja, carbono hidratado. No entanto, nota-se que não são todos os hidratos de carbono que são representados por essa fórmula (FELTRE, *et al.*, 1974; ALLINGER *et al.*, 1991).

Os carboidratos existem difundidos em toda natureza e alguns existem praticamente puros, tais como: sacarose, glicose, frutose, amido e celulose, este último no algodão, madeira e papel. Em termos de volume de produção mundial, os carboidratos ficam atrás apenas dos óleos vegetais. Cerca de 95% da biomassa produzida na natureza é formada de carboidratos (200 bilhões de toneladas). Apesar desta enorme quantidade, apenas 3% são usadas pelo homem. O resto se decompõe e é reciclado pela natureza (FERREIRA, *et.al.*, 2001).

Na utilização industrial, excluindo a alimentação, essa percentagem cai muito mais e seu uso é restrito a alguns mono e dissacarídeos de baixo peso molecular. Esses carboidratos de baixos pesos moleculares são extremamente atrativos como matéria-prima para experimentos laboratoriais de química, devido aos seguintes aspectos: disponibilidade em grandes quantidades, baixos custos, produtos oriundo de tecnologia renováveis e ecologicamente adequados (FERREIRA, *et.al.*, 2001).

A importância dos carboidratos para os seres humanos é difícil de ser avaliada. Na alimentação, os carboidratos têm função no suprimento energético e como elemento estrutural das células. São ingeridos diretamente em alimentos como pães, batatas, milho, ervilhas e indiretamente em carnes, ovos e gorduras de animais que tenham sido alimentados por gramíneas e grãos (ALLINGER *et al.*, 1991).

A produção de carboidratos efetua-se naturalmente pelas plantas através da fotossíntese. As plantas contêm um pigmento verde denominado clorofila que catalisa a conversão de dióxido de carbono e água em açúcar. A reação não é termodinamicamente favorável, mas ocorre porque o sol fornece energia na forma de luz (ALLINGER *et al.*, 1991).



Enquanto as plantas produzem carboidratos a partir de dióxido de carbono e água, os animais degradam os hidratos de carbono a dióxido de carbono e água. Os animais obtêm carboidratos ao comerem plantas e os combinam com oxigênio do ar em uma reação à

fotossíntese. A oxidação dos carboidratos fornece ao animal a energia necessária para a manutenção da vida e ao mesmo tempo regenera o dióxido de carbono que as plantas utilizam na fotossíntese (CONN & STUMPF, 1975; ALLINGER *et al.*, 1991).

Todos os carboidratos são poliidroxiáldeídos, poliidroxicetonas ou moléculas que dão origem por meio de hidrólise a tais compostos. Os monossacarídeos são as menores moléculas de carboidratos e compreendem os açúcares de quatro, cinco e seis átomos de carbono. A sacarose, açúcar de mesa, é um dos dissacarídeos que por hidrólise origina dois açúcares (frutose e glicose). Os polissacarídeos que incluem o amido e a celulose originam por hidrólise muitas moléculas de monossacarídeos (ALLINGER *et al.*, 1991).

A Figura 2 mostra a estrutura química de um poliidroxiáldeído (D-glicose) e uma poliidroxiacetona (D-frutose).

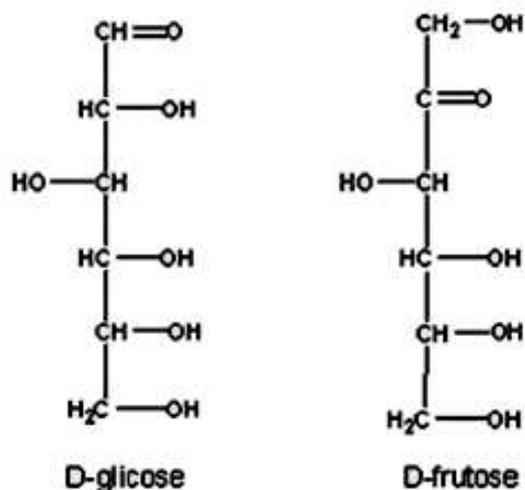


Figura 2. Representação da fórmula molecular de uma aldose (poliidroxiáldeído, D-glicose) e uma cetose (poliidroxicetona, D-frutose).

2.6.1 Nomenclatura e Classificação dos Carboidratos

Os carboidratos foram primeiramente nomeados de acordo com a sua ocorrência natural: açúcar de beterraba, açúcar de cana, açúcar de uva, açúcar de malte, açúcar do leite, amido, glicogênio hepático. Os nomes triviais foram então formados, muitas vezes a partir do sufixo “-ose” para designar carboidratos. Nomes decorrentes desta forma, por exemplo, são frutose (açúcar da fruta), maltose (açúcar do malte), xilose (açúcar da madeira) e celulose (membranas celulares) (CONN & STUMPF, 1975; HODGE & OSMAN, 1976).

2.6.1.1 Monossacarídeos

Os monossacarídeos são os açúcares mais simples, consistem basicamente de uma unidade de poliidroxi aldeídos ou cetonas alifáticas chamadas respectivamente aldoses ou cetoses (HODGE & OSMAN, 1976). Devido a alta polaridade, são sólidos cristalinos em temperatura ambiente, solúveis em água e insolúveis em solventes orgânicos (FRANCISCO JR., 2008). Na nomenclatura oficial, o sufixo “-ose” é anexado ao prefixo para denotar o número de átomos de carbono do monossacarídeo: trioses (n=3), tetroses (n=4), pentoses (n=5), hexoses (n=6). Para distinguir aldoses de cetoses, as cetoses são designadas como “-uloses”. Assim, a cetose mais simples é a triulose e mais comum é a d-frutose, que é uma hexulose (CONN & STUMPF, 1975; HODGE & OSMAN, 1976).

Por serem poliidroxi aldeídos ou cetonas de cadeia aberta, os monossacarídeos são muito reativos. Apresentam uma importante propriedade, que é a capacidade de serem oxidados por íons cúpricos (Cu^{+2}) e férricos (Fe^{+3}). Os açúcares com tal propriedade são denominados açúcares redutores. O grupo carbonila é oxidado a carboxila com a concomitante redução, por exemplo, do íon cúprico (Cu^{+2}) à cuproso (Cu^{+}). Tal princípio é útil na análise de açúcares (HODGE & OSMAN, 1976; FRANCISCO JR., 2008).

As plantas protegem o monossacarídeo reativo no transporte e armazenamento por condensação, com perda de água, tornando-o menos reativo como um oligo e/ou polissacarídeo. Por exemplo, os açúcares redutores mais comuns, glicose e frutose, são condensados de maneira que suas funções (carbonilas reativas) são perdidas para formar um açúcar dissacarídeo não-redutor, a sacarose. A sacarose menos reativa é então transportada para todas as partes da planta por síntese enzimática de um oligo e/ou polissacarídeo. A partir do agrupamento de frutose e glicose são formados outros açúcares como a sacarose. Outros polissacarídeos são formados a partir de outros açúcares que surgem por transformações enzimáticas de hexoses fosforiladas e açúcares nucleotídeos (CONN & STUMPF, 1975; HODGE & OSMAN, 1976).

2.6.1.2 Oligossacarídeos

Os oligossacarídeos são polímeros solúveis em água e formados por cadeias curtas de monossacarídeos. Os mais comuns são os dissacarídeos, dos quais se destacam a sacarose (açúcar da cana) e a lactose (açúcar do leite), ambos representados na Figura 3 (HODGE & OSMAN, 1976).

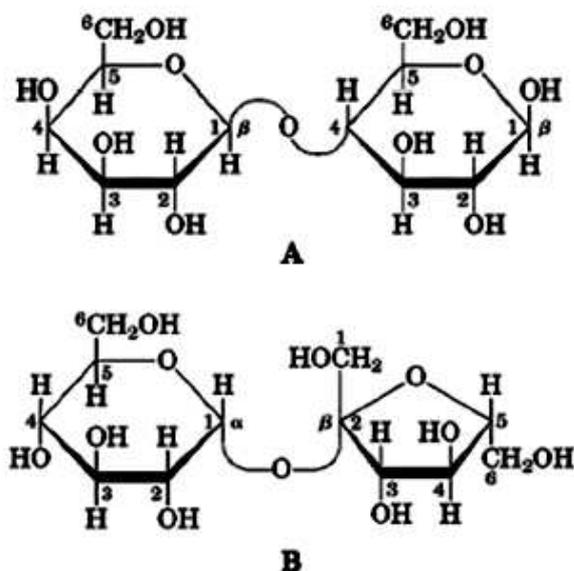


Figura 3. Fórmulas moleculares de lactose (A) e sacarose (B), importantes dissacarídeos presentes no leite e na cana.

A sacarose é hoje no Brasil um dos mais importantes produtos devido a produção do álcool combustível, cuja obtenção se dá também por fermentação. A primeira etapa é a hidrólise da sacarose, da qual se obtém uma mistura de glicose e frutose, também conhecida por açúcar invertido, comumente utilizado na fabricação de doces, para evitar a cristalização da sacarose e conferir maior maciez ao doce. O termo invertido é empregado porque, após a hidrólise, o desvio da luz polarizada sofre inversão de sentido, inicialmente para a direita e, após a hidrólise, para a esquerda. A etapa seguinte consiste na fermentação, semelhante à da produção de bebidas alcoólicas. A lactose também pode sofrer fermentação. O processo de fermentação láctea é utilizado na produção de queijos e iogurtes. O tipo de produto depende do microorganismo empregado (FRANCISCO JR., 2008).

2.6.1.3 Polissacarídeos

São cadeias longas de unidades glicosídicas de açúcares sintetizados por enzimas de apenas um tipo de hexoses e pentoses. A primeira cadeia consiste geralmente de um ou dois tipos de monossacarídeos. Cadeias laterais podem ser construídas por açúcares diferentes dos da cadeia principal, com diferentes tipos de ligações glicosídicas (HODGE & OSMAN, 1976).

Açúcares contendo mais de 20 unidades são denominados polissacarídeos, os quais

podem possuir milhares de monossacarídeos e predominam a forma dos carboidratos na natureza. A diferenciação é dada pela unidade monomérica, comprimento e ramificação das cadeias. Quando os polissacarídeos contêm apenas um tipo de monossacarídeo, ele é denominado de homopolissacarídeo. Se estiverem presentes dois ou mais tipos de monossacarídeos, o resultado é um heteropolissacarídeo (CONN & STUMPF, 1975; FRANCISCO JR., 2008).

2.6.2 Métodos de Análises de Carboidratos

Existem diversos métodos para a análise de açúcares. Eles podem ser divididos em titulométricos (EDTA, Lane-Eynon, Luff-Schoorl), gravimétricos (Musson-Walker), espectrofotométricos (ADNS, Antrona, Fenol-Sulfúrico, Somogyi-Nelson) (MEYER, 1976), ópticos (SILVA, *et. al.*, 2003) e instrumentais (Cromatográficos – CLAE-IR) (DRUZIAN *et. al.*, 2005).

2.6.2.1 Método Lane-Eynon

Os métodos químicos mais amplamente utilizados para a determinação quantitativa dos açúcares possuem a capacidade para reduzir, em meio a soluções alcalinas de metais, como prata, mercúrio, bismuto e cobre. De todos os métodos, os que dependem da redução de íons cúpricos a óxido cuproso são os mais amplamente utilizados (MEYER, 1976).

Neste método, o cobre presente na solução de Fehling (solução alcalina de cobre em tampão de tartarato duplo de sódio e potássio) é reduzido a óxido cuproso (Figura 4). O sal de sódio que se forma como produto primário da oxidação do açúcar redutor sofre posterior oxidação, na sequência da reação (MEYER, 1976).

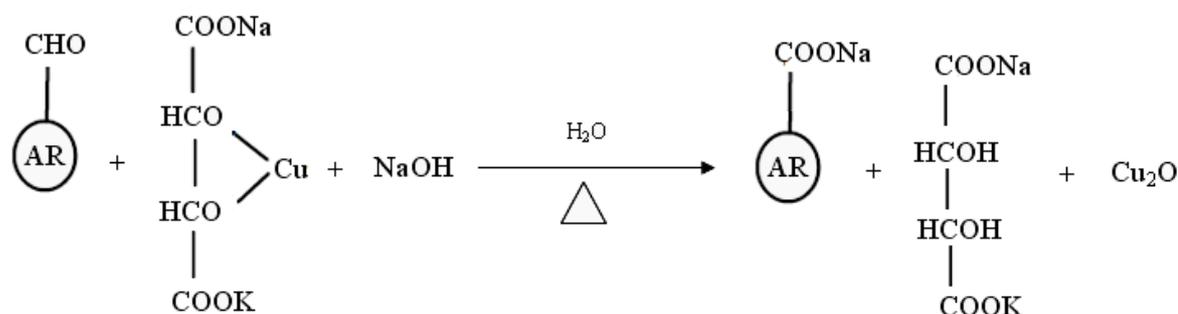


Figura 4. Representação das reações referentes ao Método de Lane-Eynon.

2.6.2.2 Método do ácido 3-5-dinitrossalicílico (ADNS)

O ADNS é reduzido pelo açúcar redutor em meio alcalino para ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, enquanto que, no caso mais simples o grupamento aldeído parece ser oxidado a ácido aldônico (Figura 5). Entretanto a equivalência entre o ácido aminonitrossalicílico produzido e a quantidade do açúcar não é exata e diferentes açúcares produzem diferente intensidade na cor desenvolvida. Isso sugere que a química da reação deva ser mais complexa que a apresentada, podendo estar relacionada com as reações de decomposição de açúcares em solução alcalina (MEYER, 1976).

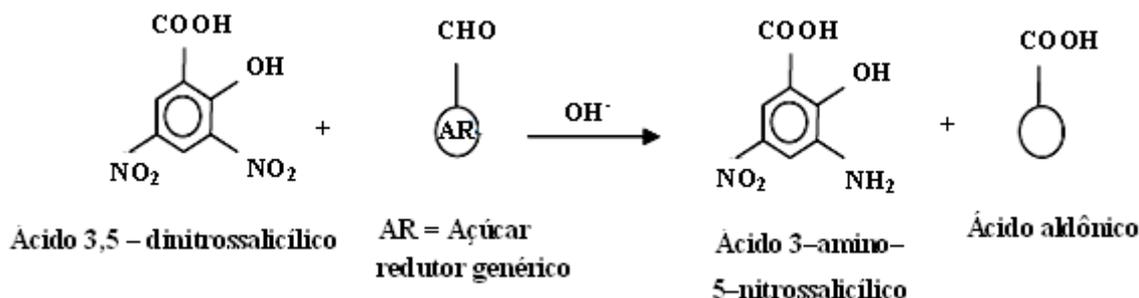


Figura 5. Reações do Método ADNS.

2.6.2.3 Método de antrona

A reação de antrona se baseia na ação hidrolítica e desidratante do ácido sulfúrico sobre os carboidratos. Quando a reação é levada a efeito com carboidratos com ligações glicosídicas, estas são hidrolisadas e os açúcares simples desidratados para furfural ou hidroximetilfurfural. Essas substâncias se condensam com a antrona (9,10-dihidro-9-oxoantraceno) formando um produto de coloração azul-petróleo (MEYER, 1976).

2.6.2.4 Método do fenol-sulfúrico

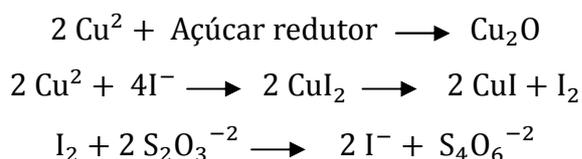
Baseia-se na determinação de açúcares simples, polissacarídeos e seus derivados incluindo os metil-ésteres com grupos redutores livres, após a desidratação dos mesmos pelo ácido sulfúrico e subsequente complexação dos produtos formados com o fenol. A mudança da cor da solução é medida na região do visível e é proporcional à quantidade de açúcares presentes na amostra. A reação é sensível e de cor estável (MEYER, 1976).

2.6.2.5 Método complexométrico de EDTA

Os açúcares presentes na amostra reagem com uma solução de cobre, antes e depois da inversão. Os íons Cu^{+2} se reduzem a Cu^+ que precipitará como Cu_2O . O excesso de cobre que não reagiu é determinado posteriormente por complexometria com EDTA (MEYER, 1976).

2.6.2.6 Método de Luff-Schoorl

O açúcar redutor se oxida e os íons Cu^{+2} se reduzem a Cu^+ , que precipitará como Cu_2O . O excesso de Cu^{+2} se determina iodometricamente (MEYER, 1976).



2.6.2.7 Método Munson-Walker

Fundamenta-se na quantificação do precipitado de óxido cuproso formado após a redução de íons cobre bivalentes, em meio básico, pelos açúcares redutores (glicose e frutose) (MEYER, 1976).

2.6.2.8 Método de Somogyi-Nelson

Os glicídeos redutores aquecidos em meio alcalino, transformam-se em enodióis (dois átomos de carbono duplamente ligados) que reduzem o íon cúprico presente a íon cuproso. O óxido cuproso assim formado reduz a reação arsênio-molibdico a óxido de molibdênio de coloração azul cuja intensidade de cor é proporcional a quantidades de açúcares redutores existentes na amostra (MEYER, 1976; SILVA, *et. al.*, 2003).

2.6.2.9 Método por refratometria – em escala grau Brix (°B)

Esse método é largamente utilizado na indústria açucareira, constitui em um método

físico baseado no princípio da refração (quando uma luz passa de um meio para outro, sua velocidade diminui ou aumenta conforme as diferenças nas estruturas atômicas ou densidades ópticas das duas substâncias). Com o índice de refração, IR, não é possível determinar qual(is) o(s) açúcar(es) presente(s), porém, o IR indica a quantidade de açúcar presente em uma solução, pois tem uma relação com a concentração de sólidos solúveis (° Brix) que é a unidade de interesse (SILVA, *et. al.*, 2003).

2.6.2.10 Método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) têm sido utilizadas para determinação de açúcares em diversos tipos de alimentos e bebidas, como sucos, sorvetes, frutas e vegetais, e chocolates. Entre os métodos cromatográficos, a técnica mais sensível e rápida para determinar estes compostos em outros produtos, é a Cromatografia Líquida de Troca Aniônica com Detecção Amperométrica Pulsada (HPAEPAD). Entretanto, para usá-la como método de rotina, além do alto preço do equipamento, é necessária a adição de bases fortes no eluente pós-coluna para detecção e a regeneração da coluna entre as corridas. Diversos estudos mostram que os métodos por CLAE são muito mais práticos, rápidos e simples no manuseio da amostra, mais facilmente interpretados, pois cada açúcar origina somente um pico e a análise é realizada a temperatura ambiente (DRUZIAN, *et. al.*, 2005).

2.7. Titulação Redox

É uma técnica que utiliza agentes oxidantes para a titulação de agentes redutores e vice-versa. Tem como restrição básica a necessidade de grande diferença entre os potenciais de oxidação e redução para se obter resultados mais confiáveis. Os produtos da reação são detectados por meio de indicadores químicos ou métodos eletrométricos (indicadores físicos).

Titulações que envolvem reações de transferências de elétrons entre agentes oxidantes (que os recebem) e agentes redutores (que os perdem) são utilizadas para a determinação de muitas substâncias. O ponto final da titulação é identificado visualmente segundo vários métodos e conforme a reação envolvida. Os indicadores de oxi-redução são substâncias que se deixam oxidar ou reduzir reversivelmente com mudança de coloração, essa mudança se dá como consequência de variação de potencial dos sistemas envolvidos na reação de oxi-

redução durante a titulação. Se o reagente é corado, ele próprio pode atuar como indicador, como por exemplo, sulfato de cobre (CuSO_4). Em certos casos são usados indicadores específicos (amido-coloração azul com iodo), assim como corantes que atuam de maneira irreversível (mudança de coloração) como o alaranjado de metila que atua como indicador irreversível nas titulações com bromato de potássio (KBrO_3) (DEMIATE, *et. al.*, 2002).

2.8 Matriz

Devido à complexidade de matrizes alimentícias, os efeitos da matriz e suas interferências são considerados como fontes de incerteza de medições, além de condições ambientais e outros fatores que causam variações aleatórias e não estão diretamente inseridas na expressão matemática do cálculo para o mensurando (EURACHEM/CITAC, 2002).

Como o foco principal desta dissertação foi a utilização da ferramenta estatística de incerteza de medição e conseqüentemente, a determinação da incerteza expandida associada ao método, utilizou-se o mel neste trabalho pelo fato desta matriz possuir baixo conteúdo de interferentes como proteínas e lipídeos na sua composição (SILVA, *et. al.*, 2003).

A escolha pela matriz – mel – baseou-se também na sensibilidade do método a elevadas concentrações de açúcares redutores (SILVA, *et. al.*, 2003), e, pela alta concentração de açúcares redutores (glicose) no mel de abelha.

A matriz utilizada nesta dissertação foi uma amostra de mel, da flora “Morrão de Candeia” (Safrá 2008), obtida no setor da fazendinha da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, localizada no município de Seropédica – RJ.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A técnica utilizada para o estudo foi a análise titulométrica para a quantificação de Açúcares Redutores pelo método de Lane-Eynon, recomendada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). A escolha do método em questão baseia-se na gama de produtos alimentícios em que esta análise é aplicada e pela grande importância que seu resultado possui, tanto do ponto de vista fiscal, levando em conta o aspecto nutricional, quanto com relação à saúde dos consumidores.

Os experimentos foram realizados no Laboratório Analítico de Alimentos e Bebidas – LAAB, do Departamento de Tecnologia de Alimentos – Instituto de Tecnologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (DTA/IT/UFRRJ), campus Seropédica – RJ.

3.1. Materiais

As análises foram realizadas utilizando um Determinador de Açúcares Redutores (Redutec[®]) Modelo TE – 088, Marca TECNAL[®] (Figura 6);



Figura 6. Redutec[®] – Determinador de Açúcares Redutores utilizado nos experimentos.

Todas as vidrarias volumétricas (balões volumétricos, pipetas volumétricas e buretas) que foram utilizadas nesta dissertação foram calibradas por laboratórios acreditados pela Coordenação Geral de Acreditação do Inmetro (CGCRE/INMETRO).

Os certificados de calibração dos balões e pipetas volumétricas (ANEXO A) são compostos do valor nominal, valor calibrado, incerteza expandida (U) e fator de abrangência (k). O que difere no certificado de calibração dessas vidrarias, em relação ao das buretas, é que nestas últimas há a calibração em mais de um ponto. Por exemplo, uma bureta de 10mL fornece no certificado de calibração valores nominais de 1, 5 e 10mL com os seus respectivos valores calibrados, cada um com sua incerteza expandida e fator de abrangência individual.

A Tabela 3 apresenta as vidrarias e os equipamentos utilizados neste trabalho de pesquisa com suas respectivas especificações de calibração:

Tabela 3. Valores de incerteza das vidrarias e equipamentos utilizados nesta dissertação.

Vidraria/ Equipamento/ (Unidade)	Código	Volume nominal (mL)	Volume calibrado (mL)	U (incerteza expandida)	k (fator de abrangência)	u^* (incerteza padrão combinada)
Bureta de 10mL	707282	1	0,998	0,003	2,649	0,001
		5	4,967	0,010	2,087	0,005
		10	9,991	0,020	2,035	0,010
Bureta de 10mL	707287	1	0,994	0,003	2,649	0,001
		5	4,943	0,010	2,181	0,005
		10	9,960	0,020	2,023	0,010
Bureta de 25mL	712130	5	5,021	0,010	2,320	0,005
		15	15,061	0,030	2,021	0,015
		25	24,975	0,015	2,018	0,007
Pipeta	V297	5	5,001	0,010	2,105	0,005
Pipeta	V304	10	10,008	0,020	2,042	0,010
Pipeta	V308	10	10,005	0,020	2,036	0,010
Balão volumétrico	V364	100	100,037	0,020	2,019	0,010
Balão volumétrico	V385	250	250,000	0,050	2,023	0,025
Balão volumétrico	V393	500	499,88	0,10	2,021	0,05
Balança analítica (g)	BEL	–	–	Máx 0,0002	2,000	0,0001

u^* - refere-se à incerteza padrão combinada da vidraria e/ou do equipamento, que é calculada

dividindo-se a incerteza expandida, U , pelo coeficiente de expansão, k , declarado no certificado de calibração – U/k (conforme equação (15) mostrada adiante).

A amostra de mel, foi adquirida do Apiário da Fazendinha da UFRRJ em Seropédica – RJ, da flora “Morrão de Candeia” de 2008. O padrão de glicose anidra utilizado no experimento para obtenção do Título, T , foi seco em estufa à $105^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por duas horas e resfriado à temperatura ambiente em um dessecador para posteriormente ser utilizado no preparo da solução de referência.

3.2 Métodos

A metodologia proposta para o estudo foi avaliada a partir da expressão (14) que representa o teor de açúcares redutores (%), separando cada variável significativa do método e tratando-a adequadamente para avaliação da contribuição individual de incerteza no resultado final do ensaio

$$\text{ART} = \frac{d_a T 100}{m_a V_a} \quad (14)$$

Onde:

d_a = diluição da amostra (volume do balão volumétrico) (mL).

T = título da solução padrão de glicose (g).

m_a = massa da amostra (g).

V_a = volume (mL) da amostra gasto na titulação.

3.2.1 Procedimento experimental para determinação do teor de ART

Esta análise seguiu o procedimento (MQT-014) descrito pela IN nº 20 de 21 de julho de 1999 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Princípio do método:

Os glicídios redutores são solubilizados em água, separados por filtração e determinados pelo método Lane-Eynon, onde os íons cúpricos da solução de Fehling são

reduzidos quantitativamente, sob ebulição, a óxido cuproso por titulação com solução de açúcar redutor. O ponto final é alcançado quando um pequeno excesso do açúcar redutor descolora o azul de metileno.

Material

✓ Equipamentos:

Balança analítica; Banho-maria; Estufa; Placa aquecedora.

✓ Vidraria, Utensílios e outros:

Balões volumétricos de 100, 250 e 1000mL; Bastão de vidro; Béquer de 250mL; Bureta de 25mL; Erlenmeyer de 250mL; Funil; Papel de filtro qualitativo; Pinça de metal; Pipeta graduada de 1mL; Pipeta volumétrica de 10mL; Proveta de 50mL.

✓ Reagentes:

Ácido láctico ($C_3H_6O_3$) p.a.; Solução de azul de metileno ($C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot 3H_2O$) a 1% (m/v); Solução de ferrocianeto de potássio trihidratado ($K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$) a 15% (m/v); Solução de sulfato de zinco heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) ou acetato de zinco dihidratado ($(CH_3COO)_2Zn \cdot 2H_2O$) a 30% (m/v);

Etapa 1 – Preparo da Solução de Fehling A:

Dissolver 34,639g de sulfato de cobre pentahidratado ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) p.a. em água e diluir a 1000mL em balão volumétrico;

Etapa 2 – Preparo da Solução de Fehling B:

Dissolver 173g de tartarato duplo de sódio e potássio ($C_4H_4NaO_6 \cdot 4H_2O$) p.a. (sal de Rochelle) e 125g de hidróxido de sódio (NaOH) p.a. em água. Diluir a 1000mL em balão volumétrico;

Etapa 3 – Preparo da Solução Padrão de Glicose ($C_6H_{12}O_6$):

No experimento, o título foi obtido utilizando-se glicose padrão anidra, previamente seca em estufa a $105^\circ C \pm 2^\circ C$, cuja massa de $0,5004g \pm 0,0002g$ com $k = 2,00$ foi mensurada e avolumada para balão volumétrico de $100,037mL \pm 0,020mL$, com $k = 2,019$. Os dados de U e k da massa e volume foram obtidos nos certificados de calibração da balança analítica e do balão volumétrico respectivamente.

Etapa 4 – Determinação do Título da Solução de Fehling:

Colocar na bureta a solução padrão. Transferir com pipeta volumétrica 10mL de cada uma das soluções de Fehling A e B para erlenmeyer de 250mL. Adicionar 40mL de água e aquecer até ebulição. Gotejar a solução padrão, sem agitação, até quase o final da titulação. Manter em ebulição. Adicionar 1 gota de solução de azul de metileno a 1% e completar a titulação até descoramento do indicador. A titulação deve ser feita sob ebulição e não pode ultrapassar 3 minutos.

Título da Solução de Fehling:

$$T = \frac{\text{Volume gasto de glicose} \cdot \text{massa de glicose (0,50)}}{\text{Diluição (balão volumétrico de 100mL)}}$$

Prepararam-se os licores de Fehling em um erlenmeyer de vidro com capacidade aproximada de 125mL utilizando 10,008mL \pm 0,020mL, $k = 2,042$ para a solução de Fehling A; 10,005mL \pm 0,020mL, $k = 2,036$ para a solução de Fehling B e, aproximadamente, 40mL de água destilada.

Etapa 5 – Procedimento para Determinação do teor de ART no mel

Pesar 25g de amostra homogeneizada em béquer de 250mL. Adicionar 50mL de água quente e homogeneizar com bastão de vidro. Transferir para balão volumétrico de 250mL. Adicionar 2mL de ácido láctico, 5mL de solução de ferrocianeto de potássio a 15% e 5mL de solução de sulfato ou acetato de zinco a 30%. Agitar bem e completar o volume. Deixar sedimentar por 15 minutos. Filtrar em papel de filtro seco para erlenmeyer.

Colocar na bureta de 25mL o filtrado obtido. Pipetar volumetricamente 10mL de solução de Fehling A e 10 mL de solução de Fehling B para erlenmeyer de 250mL. Adicionar 40mL de água. Aquecer até ebulição e gotejar a solução da amostra até o líquido sobrenadante ficar levemente azulado. Mantendo a ebulição, adicionar 1 gota de solução de azul de metileno a 1% e continuar a titulação sob ebulição, até descoloração do indicador. Esta titulação não deverá ultrapassar 3 minutos, manter em ebulição durante toda a titulação.

Procedimento para titulação da solução padrão de glicose e para as amostras

Com a caldeira aquecida, transferiu-se um dos licores de Fehling para o compartimento reacional do Redutec[®] (Figura 6), aguardou-se 1 minuto em ebulição e iniciou-se a titulação com a solução padrão de glicose anteriormente preparada.

Quando a solução começou a perder a coloração azulada, dada pelo íon Cu^{+2} , adicionou-se duas gotas do indicador azul de metileno e prosseguiu-se a titulação até a descoloração total da solução azul e aparecimento de um precipitado de coloração vermelho tijolo (Cu_2O), indicando o final da titulação.

Cálculos

Porcentagem de Açúcares:

$$\% \text{ de ART} = \frac{d \cdot 100 \cdot T}{V \cdot m}$$

Onde:

d = volume da solução.

100 = porcentagem.

T = título da solução de Fehling.

V = volume da amostra gasto na titulação (mL).

m = massa da amostra (g).

3.2.2 Identificação das fontes de incerteza

A primeira etapa consistiu em identificar as fontes (variáveis) que contribuem diretamente para a incerteza do resultado e são apresentadas na Figura 7 através de um diagrama de Ishikawa (ou diagrama de causa e efeito).

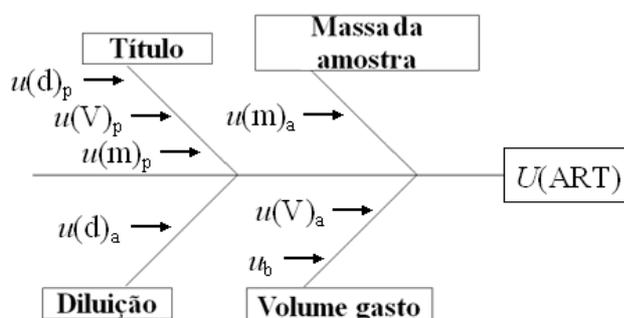


Figura 7. Diagrama de causa e efeito para identificação das variáveis de influência que contribuem para a estimativa da incerteza de medição de ART.

Esse diagrama facilita a visualização de maneira global do problema proposto, sendo possível observar quais os parâmetros ou sub-variáveis que compõem cada uma das variáveis de influência no teor de açúcares redutores totais.

Após a identificação das variáveis de influência (ou fontes de incerteza), descontam-se dos valores de leitura (medições), os erros sistemáticos e aleatórios a elas associados, obtidos de certificados de calibração ou da experiência do analista com o instrumento de medição, ou ainda, no caso de balões volumétricos ou pipetas volumétricas, pode-se utilizar o valor calibrado (já descontado o erro) diretamente ao invés do valor nominal.

3.2.2 Cálculo das incertezas padrão, combinada e expandida.

Para o cálculo da incerteza padrão (u) de cada etapa, utilizaram-se os dados obtidos nos certificados de calibração de balança, pipetas e balões volumétricos empregados na análise, dividindo-os pelos seus respectivos fatores de abrangência (k) declarados, de acordo com a expressão (15) abaixo:

$$u(y) = \frac{U}{k} \quad (15)$$

A incerteza padrão combinada (u_c) foi obtida derivando os fatores de influência, obtendo-se os coeficientes de sensibilidade, considerando quando necessário, o grau de liberdade efetivo (v_{eff}) através da equação de Welch-Satterthwaite.

Obteve-se a incerteza expandida (U) multiplicando-se por 2 (dois) o valor encontrado na incerteza padrão combinada para uma probabilidade de 95,45% (MENDES & ROSÁRIO, 2005)

A seguir é apresentada a contribuição de cada etapa para a obtenção da estimativa da incerteza com o uso do método de Lane-Eynon para análise de açúcares redutores totais:

3.2.3 Avaliação das componentes

3.2.3.1 Incerteza do Título

É uma componente que se subdivide em variáveis que alteram significativamente seu resultado e sua incerteza. Para estimar a incerteza do componente 'T', partiu-se da equação

(16) que a representa, aplicando adequadamente a derivada de suas variáveis de influência direta para obter a incerteza padrão combinada (20) tendo considerado as incertezas padrão de cada variável, e posteriormente, obter a incerteza expandida (21).

$$T = \frac{m_p V_p}{d_p} \quad (16)$$

Onde:

m_p = massa (g) de glicose utilizada no preparo de sua respectiva solução padrão;

V_p = volume (mL) da solução padrão de glicose gasto na titulação;

d_p = diluição da solução padrão de glicose – volume (mL) do balão volumétrico.

Derivando-se as variáveis de entrada (x_i), na primeira variável da expressão (16) faz-se a derivada do Título em relação à massa *da amostra utilizada* (17):

$$\frac{\partial T}{\partial m_p} = \frac{V_p}{d_p} \quad (17)$$

Em seguida, determinamos a derivada Título em relação ao volume de amostra gasto na titulação:

$$\frac{\partial T}{\partial V_p} = \frac{m_p}{d_p} \quad (18)$$

E por último, a derivada do Título em relação à diluição a que a amostra foi submetida:

$$\frac{\partial T}{\partial d_p} = \frac{m_p V_p}{d_p^2} \quad (19)$$

Após o cálculo da derivada parcial, são substituídos na equação, os valores de medição (leitura) obtidos de cada variável com suas respectivas incertezas associadas já divididas do fator de abrangência (k).

Logo, combinam-se estas variáveis oriundas de fontes não correlacionadas, com o uso da equação (7) citada anteriormente. Substituindo os componentes, a Equação (20) a referente à incerteza combinada do Título é descrita como:

$$u_c(T) = \sqrt{\left(\frac{v_p}{d_p}\right)^2 \cdot u(m)_p^2 + \left(\frac{m_p}{d_p}\right)^2 \cdot u(V)_p^2 + \left(\frac{m_p \cdot v_p}{d_p^2}\right)^2 \cdot u(d)_p^2} \quad (20)$$

3.2.3.2 Volume de solução padrão de glicose (V_p)

É atribuída uma distribuição normal à variável volume da solução padrão de glicose gasto na titulação, avaliada com desvio padrão e coeficiente de variação percentual (CV %). Para essa variável, não se utiliza apenas uma medição para representá-la e sim a média de, no mínimo, três repetições. Dessa maneira, faz-se uso da equação de Welch-Satterthwaite para calcular seu grau de liberdade efetivo, v_{eff} , e conseqüentemente seu respectivo fator de abrangência, k , para posteriormente obter a incerteza expandida associada a essa variável.

$$U = u_c k \quad (21)$$

3.2.3.3 Massa do padrão de glicose (m_p)

A massa (g) de glicose utilizada no preparo do padrão é mensurada apenas uma vez, ou seja, a massa de glicose é pesada e dissolvida no preparo da solução, portanto, não há repetição para o dado. Foi atribuída a ela uma distribuição de probabilidade do tipo retangular (divisor = $\sqrt{3}$), pois a probabilidade durante a pesagem de ocorrer qualquer valor, na última de casa decimal da balança analítica, é igualmente distribuída a todos.

A pureza do padrão de glicose é uma contribuição de incerteza do Tipo B (não contribuindo diretamente no cálculo do Título (T) e ART), já que sua massa “real” gasta na reação com Cu^{++} é determinada na pela padronização com o Licor de Fehling.

3.2.3.4 Diluição da solução padrão de glicose (d_p)

A diluição refere-se ao volume do balão volumétrico utilizado no preparo da solução padrão de glicose, assim como a massa, esta variável é mensurada apenas uma vez, portanto, não há repetição para o dado. É atribuída a ela uma distribuição de probabilidade do tipo triangular (divisor = $\sqrt{6}$), pois para esse volume, há uma tendência (central) em diluir para 100mL.

Incerteza de ART

3.2.3.5 Massa da amostra (m_a)

Uma componente da incerteza de influência direta na quantificação de açúcares redutores (equação 14) é a massa da amostra. É uma variável a qual se atribui uma distribuição de probabilidade do tipo retangular (divisor = $\sqrt{3}$), pois não há uma tendência em mensurá-la com um valor “mais provável” considerando a última casa decimal da balança analítica ou semi-analítica e é um dado sem repetição. A incerteza a ela associada, é obtida no certificado de calibração da balança analítica com seu respectivo fator de abrangência, k .

3.2.3.6 Diluição da amostra (d_a)

A diluição a qual a amostra foi submetida é mais uma componente da incerteza de influência direta na quantificação de açúcares redutores (equação 14). É uma variável que também se atribui uma distribuição de probabilidade do tipo triangular (divisor = $\sqrt{6}$), pois há uma tendência (valor calibrado) em mensurá-la conforme descrito no procedimento de análise. É um dado sem repetição e a sua incerteza é obtida no certificado de calibração do balão volumétrico empregado no ensaio com seu respectivo fator de abrangência, k .

3.2.3.7 Volume de amostra gasto na titulação (V_a)

Para o cálculo da incerteza do volume enquanto componente de influência direta na quantificação de açúcares redutores, equação (14), há a necessidade de avaliá-lo com no mínimo três repetições, possibilitando o cálculo da sua incerteza padrão da média, \bar{s} , tratando-se de uma distribuição normal. Assim sendo, emprega-se a equação (34), apresentada mais adiante, que leva em conta \bar{s} e a incerteza padrão do instrumento de medição de volume (bureta), u_b . Essa incerteza padrão com seu respectivo fator de abrangência, k , são obtidos no certificado de calibração da bureta, adotando-se a maior incerteza dos pontos calibrados, no intervalo de volume (faixa de trabalho) do volume lido durante a titulação de uma determinada amostra.

A Tabela 4 apresenta a planilha dos componentes que contribuem de forma direta na estimativa da incerteza pelo método de Lane-Eynon na determinação de açúcares redutores.

Tabela 4. Planilha dos componentes da incerteza da análise de ART pelo método de Lane-Eynon.

Grandeza	Estimativa da grandeza (x)	Distribuição de probabilidade	Divisor	Fonte de incerteza	Contribuição de incerteza padrão – $u(x)$	Unidade	Graus de liberdade (ν_{eff})
Massa da amostra	1,5000	Retangular	$\sqrt{3}$	Balança	0,0001	g	2,000
Volume (diluição)	250,000	Triangular	$\sqrt{6}$	Balão volumétrico	0,025	mL	2,023
Volume (titulação)	10,05	Normal	2,00	Bureta	0,010	mL	2,023
Massa de glicose (Título)	0,0501	Normal	2,00	Balança	0,0001	g	2,000

A Tabela 4 possibilita observar a influência que cada etapa apresenta na variabilidade e qualidade global do resultado de medição, dando indicando onde é necessário mais atenção para a melhoria contínua da análise em questão.

Após a realização da avaliação separadamente da contribuição de cada etapa de incerteza, derivou-se parcialmente a equação (14) que representa o teor de açúcares redutores, para inserção dos dados obtidos anteriormente e determinação da incerteza combinada do teor de açúcares redutores, dada pela equação (26).

A primeira derivada da equação (14) foi em relação à diluição, equação (22);

$$\frac{\partial ART}{\partial d_a} = \frac{T \ 100}{m_a \ V_a} \quad (22)$$

Em seguida, derivou-se a equação (14) em relação ao Título, obtendo-se a equação (23);

$$\frac{\partial ART}{\partial T} = \frac{d_a \ 100}{m_a \ V_a} \quad (23)$$

A terceira derivada foi em relação à massa da amostra, como mostra a equação (24);

$$\frac{\partial ART}{\partial m_a} = \frac{d_a \ T \ 100}{m_a^2 \ V_a} \quad (24)$$

E por último, a derivada da equação (14) em relação ao volume de amostra gasto na titulação, fornecendo a equação (25);

$$\frac{\partial ART}{\partial V_a} = \frac{d_a T 100}{m_a V_a^2} \quad (25)$$

Logo, a incerteza combinada do teor de ART é dada por:

$$u_c(ART) = \sqrt{\left(\frac{T \cdot 100}{m_a \cdot V_a}\right)^2 \cdot u(d_a)^2 + \left(\frac{d_a \cdot 100}{m_a \cdot V_a}\right)^2 \cdot u(T)^2 + \left(\frac{d_a \cdot T \cdot 100}{m_a^2 \cdot V_a}\right)^2 \cdot u(m_a)^2 + \left(\frac{d_a \cdot T \cdot 100}{m_a \cdot V_a^2}\right)^2 \cdot u(V_a)^2} \quad (26)$$

A incerteza expandida foi obtida multiplicando-se o valor obtido na equação (26) pelo fator de abrangência, $k = 2$, para um nível de confiança de 95,45%, através da equação (27), a seguir:

$$U = u_c(ART) k \quad (27)$$

Para avaliar as contribuições de incerteza em cada etapa do método propriamente dito e assim permitir observar sua importância na influência do resultado da análise, utilizou-se como amostra a matriz mel, devido ao seu alto conteúdo percentual de açúcares redutores. A massa de mel foi pesada em balança analítica ($1,5000\text{g} \pm 0,0002\text{g}$) com $k = 2,00$ e diluída em balão volumétrico de $250,000\text{mL} \pm 0,050\text{mL}$, com $k = 2,023$. Os valores de incerteza padrão, u , foram obtidos dividindo a incerteza expandida, U , do certificado pelo fator de abrangência, k .

3.2.4 Avaliação da contribuição de incerteza do Título e ART utilizando balança semi analítica e buretas de 10mL e de 25mL.

Nesses experimentos avaliou-se a contribuição de incerteza de cada etapa do método Lane-Eynon para ART e do Título (padrão de glicose) utilizando balança semi analítica, com resolução de 3 (três) casas decimais.

A massa de glicose pesada em balança semi analítica para o preparo da solução padrão foi $2,504\text{g} \pm 0,001\text{g}$ com $k = 2,00$ e diluição a $499,88\text{mL} \pm 0,10\text{mL}$ com $k = 2,021$. A massa de mel foi pesada utilizando a mesma balança semi analítica ($1,503\text{g} \pm 0,001\text{g}$ com $k = 2,00$) e diluída em balão volumétrico de $250,000\text{mL} \pm 0,050\text{mL}$, com $k = 2,023$. Os valores de incerteza padrão, u , foram obtidos dividindo-se o valor de U pelo k , de cada massa.

Da mesma maneira, para o cálculo da incerteza do volume gasto na titulação (incerteza padrão de repetitividade) levou-se em conta a incerteza da própria bureta na faixa de volume gasto, o número de repetições e sua variabilidade, associada ao valor t – Student para um nível de confiança de 95,45%. A seguir aplicou-se a equação (34) que contempla as duas variáveis.

3.2.5 Determinação do ponto final da reação com medição de pH.

Durante a realização das titulações da solução padrão de glicose para a obtenção do Título, fez-se o acompanhamento da mudança de cor que determina o ponto final da reação, através de uma possível relação da redução de Cu^{+2} para a precipitação de Cu_2O em intervalos de pH específicos.

As titulações da análise de açúcares redutores e da solução padrão de glicose pelo método Lane-Eynon ocorreu em temperatura próxima a $80 \pm 5^\circ\text{C}$, inserindo um eletrodo (Modelo L 2896), preenchido com KCl em gel, que trabalha nesta faixa de temperatura (termo-resistível) no compartimento reacional do Redutec[®]. Tal eletrodo foi então conectado a um medidor de pH para determinar o possível ponto final da reação através dessa medição.

Fez-se comparações com leituras de pH realizadas com medidor de pH de bancada à temperatura ambiente e com medidor de pH conectado ao Redutec[®] através do eletrodo, que em meio reacional, estava na temperatura de $80 \pm 5^\circ\text{C}$, no início e imediatamente após o final da reação a fim de verificar a existência de correlação entre as diferentes medições.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios obtidos e expressos como resultados de um ensaio são decorrentes do método proposto em função das repetições e dos tratamentos a que a amostra foi sujeita. Os valores de incerteza não influenciam este dado, mas sim são influenciados por este valor que é apresentado após o sinal de \pm ($\bar{x} \pm U$). É sobre este valor que a incerteza atua, expressando a flutuação do resultado e, como consequência, a confiabilidade do resultado de medição.

O diagrama de Ishikawa apresentado anteriormente na Figura 7 desmembra o método de análise em quatro principais fontes de incerteza, que são as fontes de incerteza de contribuição direta na incerteza total, as quais derivam da expressão matemática de cálculo do teor de açúcares redutores (%), que são: massa da amostra (m_a); diluição (d_a), ou seja, o volume do balão volumétrico no qual a amostra foi diluída; o volume de amostra gasto na titulação (V_a) e o Título (T), que é o padrão de glicose.

Cada uma dessas fontes fornece diferentes contribuições de incerteza e para cada uma delas há uma maneira diferente de se tratar. É necessário primeiramente obter a contribuição da chamada incerteza padrão de cada uma delas para, posteriormente, uni-las através da incerteza combinada, u_c , para variáveis não correlacionadas.

4.1 Título

A Tabela 5 apresenta as componentes de incerteza em relação ao Título do padrão de glicose. Os cálculos do mensurando e da incerteza de medição relacionados ao Título estão descritos no Anexo D.

Tabela 5. Componentes da incerteza do Título.

Grandeza	Estimativa da grandeza (x)	Distribuição de probabilidade	Divisor	Fonte de incerteza	Contribuição de incerteza padrão – $u(x)$	Unidade	Graus de liberdade (ν_{eff})
Massa do padrão	0,5004	Retangular	$\sqrt{3}$	Balança	0,0001	g	2,000
Volume (diluição)	100,037	Triangular	$\sqrt{6}$	Balão volumétrico	0,010	mL	2,019
Volume (titulação)	10,01	Normal	2,00	Bureta	0,010	mL	2,035

A Tabela 6 mostra os dados relativos às contribuições de incerteza padrão de cada uma das componentes citadas na Tabela 5 com os dados obtidos no experimento.

Tabela 6. Contribuição das componentes da incerteza do Título.

Grandeza	Estimativa da grandeza (x)	Distribuição de probabilidade	Incerteza padrão $u(x)$	Unidade	Coefficiente de sensibilidade $c(i)$	Contribuição (%)	Graus de liberdade (ν_{eff})
Massa do padrão	0,5004	Retangular	0,0001	g	$1,0 \times 10^{-10}$	0,99	2,000
Volume (diluição)	100,037	Triangular	0,010	mL	$2,5 \times 10^{-11}$	0,25	2,019
Volume (titulação)	10,01	Normal	0,010	mL	$1,0 \times 10^{-8}$	98,76	2,035

Através da Tabela 6 é possível observar a contribuição majoritária do volume de titulação da solução padrão de glicose como sendo a única variável em potencial para contribuição do aumento de incerteza do Título.

A Figura 8 ilustra a predominância da contribuição da variável volume (V) sobre a incerteza total do Título:

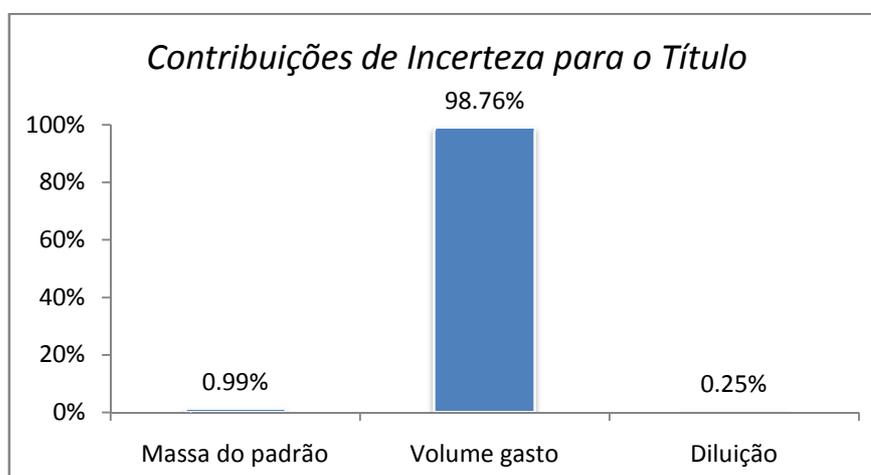


Figura 8. Contribuição das variáveis sobre a incerteza do Título.

Conforme apresentado no Anexo D, o resultado do Título com sua respectiva incerteza expandida, U , foi de $0,0501\text{g} \pm 0,0002\text{g}$. O valor percentual de incerteza em relação ao Título obtido no experimento não foi significativo, visto que representou um valor próximo à 0,40%. Em casos em que este valor ultrapassa 4% para essa faixa de concentração (100g/100g), deve-se identificar a fonte ou as fontes que mais contribuem para o aumento da incerteza total e tomar as ações corretivas para minimizar o problema.

Nesse exemplo, se o valor da incerteza fosse significativo, seria necessário tomar alguma providência em relação ao volume gasto, já que esta fonte de incerteza é responsável por quase 99% da incerteza total da variável Título. Nesse caso, o foco seria o instrumento de medição de volume, ou seja, a bureta.

4.2 ART na amostra de mel

A amostra de mel foi utilizada com intuito de verificar as variáveis e as contribuições das incertezas em relação ao método e aos componentes e suas influências sobre o resultado final da análise. Esta matriz foi escolhida devido a sua alta concentração de açúcares redutores, condição necessária à boa sensibilidade analítica de Lane-Eynon. Os cálculos relacionados ao valor de ART e sua incerteza estão descritos no Anexo E.

Desta maneira obtiveram-se os dados da concentração de açúcares redutores (\bar{x}), a sua incerteza expandida, U , e o seu fator de abrangência, k , ($83,1\% \pm 0,7\%$, com $k = 2,00$) associados. Esse valor representa uma incerteza expandida pequena (0,84%), caracterizada como não significativa em relação ao resultado final de análise (teor de açúcares redutores). Isto é justificado pelo fato de que, para a faixa de concentração de 100g/100g, os valores estimados para incertezas expandidas aceitas pelo *Codex Alimentarius* (preparado pelo Reino Unido) são de até 4%, variando, portanto, com intervalo de confiança aceitável de 96 à 104g/100g. Esse dado é calculado de acordo com a faixa de concentração através da função “trompete” de Horwitz/Thompson (THOMPSON, 2004; JUNQUEIRA, 2007).

Essa função foi determinada por estudos colaborativos e mostra que quanto menor for a faixa de concentração do analito, maior é o percentual de intervalo aceito para a incerteza expandida, chegando à 44% para concentrações menores do que 100 μ g/kg (JUNQUEIRA, 2007) (Anexo C).

Resultados semelhantes foram encontrados por Brown, *et.al.*, (2008) estudando a estabilidade das medições da produção de mercúrio vaporizado. Os autores encontraram que a incerteza expandida associada à geração na produção da massa de mercúrio vaporizado é da ordem de 94,4ng.min⁻¹ \pm 2,4ng.min⁻¹, ou seja, 2,54% do resultado.

A avaliação deste resultado estendeu-se, ainda, no sentido de verificar neste percentual qual ou quais das variáveis que mais contribuem para o aumento do valor de incerteza do resultado. Dessa forma, pode-se determinar quais são as etapas do método em que deve haver maior cautela na execução.

A Tabela 7 apresenta a contribuição percentual de cada componente da expressão matemática do método sobre a incerteza. Desta forma, pode-se avaliar de maneira quantitativa quais as variáveis que realmente contribuem e quais não contribuem para o aumento da incerteza ou imprecisão do resultado.

Tabela 7. Contribuição das etapas para a incerteza de ART.

Grandeza	Estimativa da grandeza (x)	Distribuição de probabilidade	Incerteza padrão $u(x)$	Unidade	Coefficiente de sensibilidade $c(i)$	Contribuição (%)	Graus de liberdade (ν_{eff})
Volume (diluição)	250,000	Triangular	0,025	mL	$6,91 \times 10^{-5}$	0,05	2,023
Massa de glicose (Título)	0,0501	Normal	0,0001	g	$2,75 \times 10^{-2}$	20,08	2,000
Massa da amostra	1,5000	Triangular	0,0001	g	$3,07 \times 10^{-5}$	0,02	2,000
Volume (titulação)	10,05	Normal	0,010	mL	0,10935249	79,85	2,035

Como se observa na Tabela 7, o volume médio gasto da solução de mel na titulação do Licor de Fehling é a variável que influencia fortemente (79,85%) na incerteza expandida do resultado, seguida do Título (20,08%). O volume gasto na titulação da amostra apresenta uma grande contribuição na incerteza, justificado pelo fato de que a observação do ponto final da reação dá-se pela acuidade visual do analista. Isso indica a forte dependência entre a experiência do analista e a repetibilidade/reprodutibilidade do método.

A Tabela 7 permite uma avaliação detalhada da metodologia de ensaio em estudo, possibilitando rastrear as etapas com potencial para influenciar a incerteza do método.

A Figura 9 ilustra graficamente a contribuição (%) de cada uma das diferentes variáveis do método na incerteza do ensaio.

A partir desses dados evidencia-se que quase 80% da atenção com relação à confiabilidade do método, deve estar voltada para a titulação da amostra que, neste caso, depende da acuidade visual e da experiência do analista. Por se tratar de uma avaliação sensorial, que depende da sensibilidade humana, sugere-se que sejam testadas novas maneiras de verificar o ponto final da reação de precipitação do Cu_2O , de modo a diminuir a contribuição deste fator sobre o valor da incerteza total na análise de açúcares redutores.

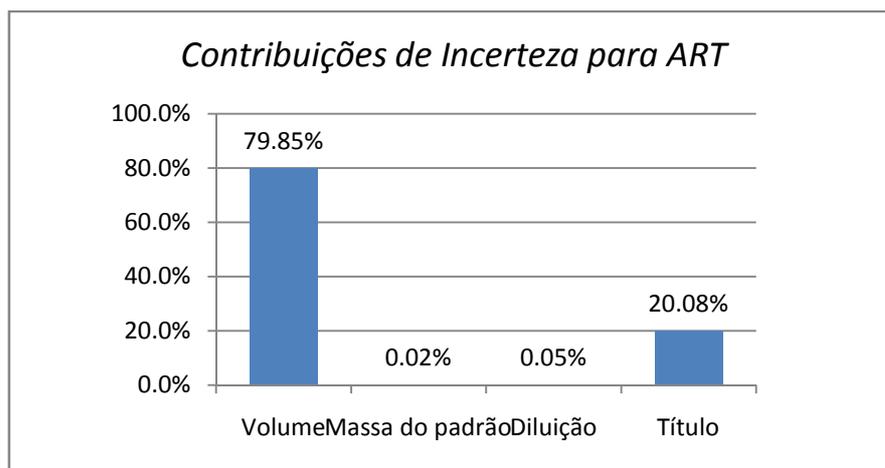


Figura 9. Contribuições de cada variável para a estimativa de incerteza do método Lane-Eynon.

4.3 Determinação da incerteza expandida utilizando balança semianalítica e bureta de 10mL e de 25mL

A incerteza expandida e os dados experimentais obtidos para essas condições de análise estão apresentados na Tabela 8 e os cálculos no Anexo F.

Tabela 8. Dados das variáveis do Título com balança semianalítica e buretas de 10 e 25mL.

	Volume do padrão de glicose (mL)	Massa do padrão de glicose (g)	Diluição (mL)	Incerteza padrão (u) do volume (mL)	Incerteza padrão (u) da massa (g)	Incerteza padrão (u) da diluição (mL)	Valor do T (g)	Incerteza Expandida, U	Incerteza Expandida, $U\%$
Bureta 10mL	9,99	2,504	499,88	0,03	0,005	0,05	0,0500	0,0004	0,80
Bureta 25mL	10,40	2,504	499,88	0,08	0,005	0,05	0,0521	0,0008	1,54

A contribuição de incerteza expandida na variável Título utilizando balança semianalítica, tanto com bureta de 10mL como com bureta de 25mL não foi significativa, ambas apresentando valores menores do que 2% segundo a equação de Horwitz/Thompson. Dessa maneira, pode-se concluir que, para esse método de análise, não haverá contribuições significativas que afetem a incerteza do Título mesmo se forem utilizadas uma balança semianalítica e uma bureta de 25mL. As Tabelas 9 e 10 a seguir apresentam os dados da contribuição de incerteza utilizando balança semianalítica e buretas de 10mL e 25mL, respectivamente.

Tabela 9. Contribuição das variáveis para a incerteza do Título utilizando balança semi-analítica e bureta de 10mL.

Grandeza	Estimativa da grandeza (x)	Distribuição de probabilidade	Incerteza padrão $u(x)$	Unidade	Coefficiente de sensibilidade $c(i)$	Contribuição (%)	Graus de liberdade (ν_{eff})
Volume (diluição)	499,88	Triangular	0,005	mL	$2,51 \times 10^{-11}$	0,08	2,021
Massa da amostra	2,504	Retangular	0,005	g	$9,00 \times 10^{-9}$	29,01	2,000
Volume (titulação)	9,99	Normal	0,010	mL	$2,20 \times 10^{-8}$	70,91	2,023

Tabela 10. Contribuição das variáveis para a incerteza do Título utilizando balança semi-analítica e bureta de 25mL.

Grandeza	Estimativa da grandeza (x)	Distribuição de probabilidade	Incerteza padrão $u(x)$	Unidade	Coefficiente de sensibilidade $c(i)$	Contribuição (%)	Graus de liberdade (ν_{eff})
Volume (diluição)	499,88	Triangular	0,005	mL	$2,72 \times 10^{-11}$	0,02	2,021
Massa da amostra	2,504	Triangular	0,005	g	$1,00 \times 10^{-8}$	5,88	2,000
Volume (titulação)	10,40	Normal	0,015	mL	$1,60 \times 10^{-7}$	94,10	2,021

A Figura 10 ilustra graficamente as contribuições de incerteza para o Título utilizando balança semianalítica e buretas de 10mL e 25mL.

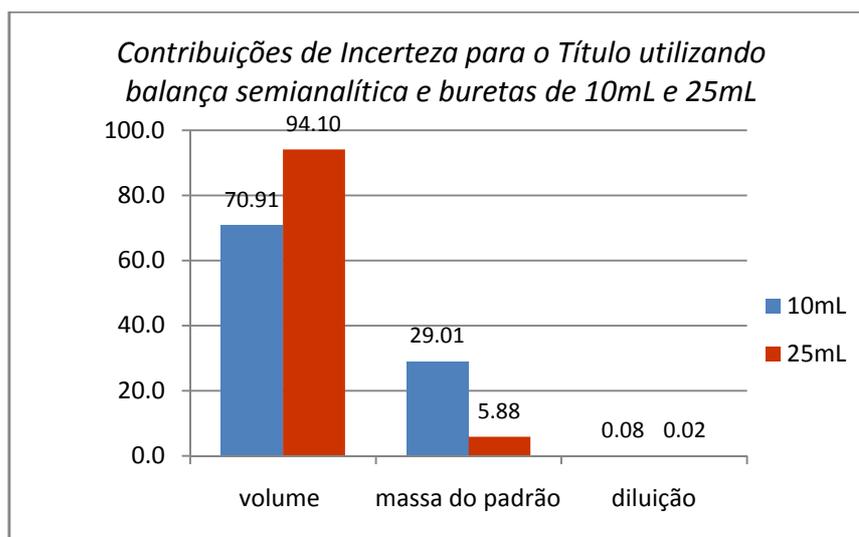


Figura 10. Contribuições para incerteza do Título utilizando balança semianalítica e buretas de 10mL e 25mL.

Aplicando a quantificação de ART utilizando balança semianalítica de buretas de 10mL e 25mL, com o Título também obtido nestas condições, a massa de mel foi pesada utilizando a mesma balança semianalítica à $1,503\text{g} \pm 0,001\text{g}$ com $k = 2,00$ e diluída em balão volumétrico de $250,000\text{mL} \pm 0,050\text{mL}$, com $k = 2,023$. Os volumes da amostra de mel obtidos no experimento tanto para bureta de 10mL como para a de 25mL são apresentados na Tabela 11 a seguir.

Tabela 11. Volumes (mL) da amostra de mel para o cálculo de ART nas condições de balança semi-analítica com buretas de 10mL e 25mL.

	V médio (mL), com n = 5	σ	\bar{s}	Maior estimativa da incerteza	Unidade	Incerteza padrão, u , (bureta)	Incerteza padrão $(u(V))^*$	Y_{eff}	% ART [ver (90) e (92)].
V (mL) com bureta de 10mL	9,98	0,0273861	0,04	0,020	mL	0,010	0,04	2,023	83,33%
V (mL) com bureta de 25mL	10,17	0,0447214	0,06	0,030	mL	0,015	0,06	2,021	85,21%

*a incerteza padrão do volume, $u(V)$, foi calculada pela Equação (34) para cada uma das buretas.

Desta forma, o valor de ART (concentração de açúcares redutores) acompanhado de sua incerteza expandida e fator de abrangência, utilizando balança semi analítica e bureta de 10mL é de $83,3\% \pm 1,5\%$, com $k = 2,00$. A incerteza expandida representa 1,79% do teor de ART, valor abaixo do limite para a faixa de incerteza expandida aceitável pelo *Codex Alimentarius*, de acordo com a função de Horwitz/Thompson.

Já o valor de ART e, conseqüentemente, sua incerteza expandida e seu fator de abrangência utilizando balança semi analítica e bureta de 25mL é de $85\% \pm 3\%$, com $k = 2,00$. A incerteza expandida neste caso representa um valor muito próximo do limite (3,53% do teor de ART).

Em ambos os casos o percentual de incerteza expandida em relação ao resultado do ensaio não ultrapassa o limite crítico de aceitação (4%) estabelecido pelo *Codex Alimentarius* para essa faixa de concentração.

Resultados muito maiores foram encontrados por Silva, *et. al.*, (2005) quando determinaram a incerteza associada ao teor de água de equilíbrio em produtos agrícolas, e verificaram que as sementes destes possuem teores de $16,4\% \pm 3,4\%$ (jacarandá-da-bahia), $19,7\% \pm 5,4\%$ (angico-vermelho) e $15,3\% \pm 1,7\%$ (óleo-copaíba). Os valores percentuais de incerteza para esses produtos são de 20,7%, 27,4% e 11,1%, respectivamente.

Dias, *et. al.*, (2008) avaliaram a concentração (em mg/100g) de carotenóides (*trans* β -caroteno, licopenos totais e luteína) e sua incerteza associada em duas espécies de tomates (“lido” e “para salada”). Os resultados mostraram que o tomate da variedade “lido” apresentou $1,00 \pm 0,14\text{mg}/100\text{g}$ (14%) para *trans* β -caroteno; $8 \pm 2\text{mg}/100\text{g}$ (25%) para licopenos totais e $0,100 \pm 0,017\text{mg}/100\text{g}$ (17%) para luteína. Já para a variedade “para salada” apresentou $0,390 \pm 0,056\text{mg}/100\text{g}$ (14,4%) para *trans* β -caroteno; $2,30 \pm 0,57\text{mg}/100\text{g}$ (24,8%) para licopenos totais e $0,080 \pm 0,015\text{mg}/100\text{g}$ (19%) para luteína. Quando comparado com a faixa de incerteza expandida aceitável pelo Codex Alimentarius que é de 32% para a concentração de $0,1\text{mg}/100\text{g}$ os valores estão adequados.

Portanto, é necessário primeiramente conhecer as variáveis do método que contribuem para compor a incerteza expandida total, visto que o percentual de incerteza expandida utilizando bureta de 25mL atingiu um valor muito próximo do limiar de aceitação. As Tabelas 12 e 13 ilustram as contribuições das etapas na incerteza para a quantificação de ART utilizando balança semi analítica e buretas de 10mL e de 25mL, respectivamente.

Tabela 12. Contribuição das variáveis para a incerteza do teor de ART utilizando balança semi analítica e bureta de 10mL.

Grandeza	Estimativa da grandeza (x)	Distribuição de probabilidade	Incerteza padrão $u(x)$	Unidade	Coefficiente de sensibilidade $c(i)$	Contribuição (%)	Graus de liberdade (veff)
Volume (diluição)	250,00	Triangular	0,025	mL	$6,94 \times 10^{-5}$	0,01	2,021
Massa de glicose (Título)	0,0500	Retangular	0,0002	g	0,444448	79,82	2,000
Massa da amostra	1,503	Retangular	0,0005	g	$7,685 \times 10^{-4}$	0,14	2,000
Volume (titulação)	9,98	Normal	0,010	mL	0,111557784	20,03	2,021

Tabela 13. Contribuição das variáveis para a incerteza do teor de ART utilizando balança semi analítica e bureta de 25mL.

Grandeza	Estimativa da grandeza (x)	Distribuição de probabilidade	Incerteza padrão $u(x)$	Unidade	Coefficiente de sensibilidade $c(i)$	Contribuição (%)	Graus de liberdade (veff)
Volume (diluição)	250,00	Triangular	0,025	mL	$7,26 \times 10^{-5}$	0,00	2,021
Massa de glicose (Título)	0,0521	Retangular	0,0002	g	1,711985667	87,10	2,000
Massa da amostra	1,503	Retangular	0,0005	g	$8,04 \times 10^{-4}$	0,04	2,000
Volume (titulação)	10,17	Normal	0,015	mL	0,252729647	12,86	2,021

A Figura 11 ilustra graficamente os dados acima, com as contribuições significativas de incerteza expandida dadas por balança semi analítica e buretas de 10mL e 25mL.

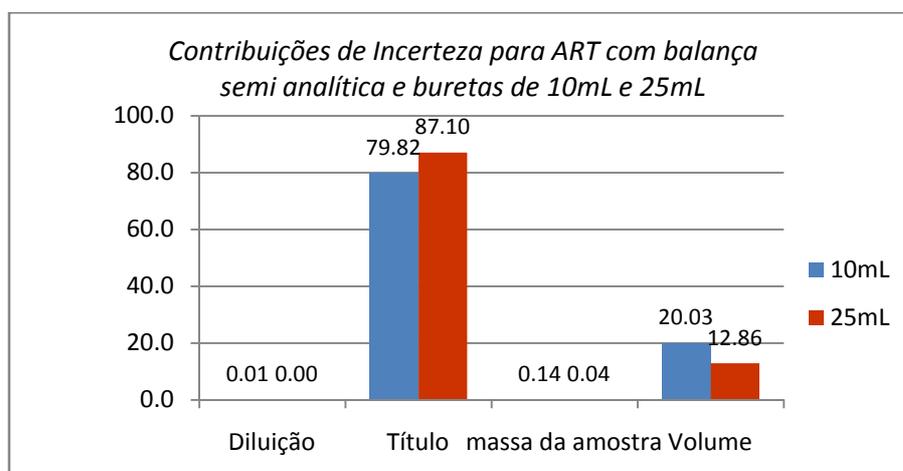


Figura 11. Contribuições para incerteza do teor de ART utilizando balança semi analítica e buretas de 10mL e 25mL.

Observa-se na Figura 11 que o Título é a variável que influencia significativamente a incerteza do método, contribuindo com 79,82% (10mL) e 87,10% (25mL), não importando a bureta que se utilize para tal procedimento.

É necessário considerar que, quando utilizamos a incerteza padrão da massa do Título, tanto no caso da bureta de 10mL, quanto para a de 25mL, $u(m)T_{10mL\ e/ou\ 25mL}$, utilizando balança semi analítica, o resultado do ensaio foi estendido para quatro casas decimais, já que o primeiro algarismo não nulo do valor de incerteza também estava nesta decimal. É nesta casa decimal que começa a ocorrer flutuação do dado, embora esse dado não seja percebido visualmente na balança semi analítica por possuir três casas decimais.

Os resultados obtidos foram 0,0004g e 0,0008g para bureta de 10mL e 25mL, respectivamente. Esses resultados não foram expressivos no valor do Título obtido com balança semi-analítica, mas apontam para a necessidade de cautela na aplicação do método, especialmente quando utilizado com a bureta de 25mL na aplicação com ART nestas mesmas condições de análise.

4.4 Determinação do ponto final da reação por medição de pH

Na expectativa de que a incerteza expandida possa, em algum ensaio, representar valor igual ou maior do que 4% nesta faixa de concentração, testou-se a possibilidade de minimizar

o impacto da variável V , tanto no valor T como no ART, na contribuição de incerteza total. A hipótese proposta foi efetuar a leitura do ponto final da reação através de um instrumento de medição de pH e não mais de modo visual.

Durante este trabalho, avaliou-se a possibilidade de verificar o ponto final da reação através de um eletrodo termo-sensível, com objetivo de avaliar a possibilidade de propor uma alternativa de leitura instrumental para indicar o ponto final da reação. Esta proposta baseou-se no fato de que a determinação do ponto final da reação não dependeria da sensibilidade sensorial do analista, mas sim de um valor obtido da leitura direta de um aparelho. A Tabela 14 apresenta os dados obtidos neste experimento.

Tabela 14. Valores de pH inicial e final da reação com medidor de pH ligado ao Redutec[®].

Dias	0		1		2		3	
	pH inicial	pH final						
	12,53	12,53	12,03	12,21	12,11	12,09	12,05	12,42
	12,51	12,57	12,14	12,21	12,23	12,09	11,94	12,27
	12,39	12,32	12,00	12,35	12,16	12,07	12,03	12,30
	12,41	12,59	12,16	12,36	12,18	12,12	12,09	12,34
	12,36	12,38	12,00	12,43	12,11	12,09	12,12	12,35
	12,36	12,35	12,26	12,09	12,10	12,10	12,10	12,30
	12,34	12,32	11,89	12,16	12,08	12,07	12,11	12,28
	12,38	12,40	11,89	12,39	12,13	12,05	12,10	12,25
Média	12,41	12,43	12,05	12,28	12,14	12,09	12,07	12,31
<i>s</i>	0,07131	0,112853	0,13135965	0,12305632	0,04949747	0,0213809	0,05994045	0,054494
CV (%)	0,57	0,91	1,09	1,00	0,41	0,18	0,50	0,44
IC (95,45%)	0,06	0,10	0,11	0,11	0,04	0,02	0,05	0,05

s – desvio padrão; CV% – coeficiente de variação percentual e IC (95,45%) – Intervalo de confiança à 95,45%.

Nessa análise, faz-se um aquecimento do licor de Fehling (solução de Fehling A + Fehling B) até a ebulição durante um minuto após o que, se iniciou a titulação com amostra (concentração desconhecida de açúcar) ou solução padrão de glicose. Quando se inicia a titulação com a amostra, ou com a solução padrão, não há variação significativa do pH até o ponto final da reação, caracterizado pela precipitação de Cu_2O .

Os valores da Tabela 14 mostram que ora o pH apresentou valores iniciais maiores e valores finais menores, ora o inverso também ocorreu. Além disso, a variação entre esses dados de pH foi pouco expressiva, com valores não excedendo um valor de pH. Dessa forma, as leituras de pH obtidas experimentalmente não apresentaram variações significativas o

suficiente durante as titulações para que pudessem servir como informação característica sobre o ponto final desejado.

4.5 Sugestões para Trabalhos Futuros

Sugerem-se como trabalhos futuros a investigação utilizando outras técnicas instrumentais para determinar o ponto final desta reação tais como:

- ✓ Condutividade;
- ✓ Amperometria;

5. CONCLUSÕES

Com o desenvolvimento deste trabalho foi possível distinguir os diferentes tipos de incerteza, identificar suas fontes e tratá-las adequadamente. A utilização das equações referentes à metodologia de análise de incerteza permitiu avaliar a influência e contribuição das variáveis, atribuir fatores adequados, interpretar os resultados obtidos e extrair informações relevantes de dados de um certificado de calibração.

Observou-se que a incerteza expandida associada à análise de ART pelo método Lane-Eynon não é significativa (<2%). Portanto, pode-se concluir que nas condições normais do experimento, o método possui baixo percentual de incerteza expandida, o que garante confiabilidade ao resultado.

Observou-se que, embora a variável volume (V) seja a que mais contribui para a composição do valor de incerteza total – tanto para a variável Título (~99%), quanto para o ART (~80%) – verificou-se que não há necessidade de otimizar esta variável, visto que sua incerteza expandida não atinge nem a metade do limite aceitável pelo *Codex Alimentarius*.

Pode-se considerar que o volume (V) é a única variável que pode contribuir de forma significativa na incerteza das variáveis T e ART.

Quando se utilizou a balança semi analítica e buretas de 10mL e 25mL, percebeu-se que a incerteza total associada ao método aumentou, porém não atingiu o limiar de confiabilidade (4%). Contudo, a utilização desta combinação de equipamentos requer muita cautela, especialmente ao se utilizar bureta de 25mL, visto que o valor percentual de incerteza superou 3% nestas condições de ensaio. Neste caso, observou-se que a variável que mais contribuiu para o aumento da incerteza foi o Título, com 79,82% para bureta de 10mL e 87,10% para bureta de 25mL.

Já para a incerteza do Título, no experimento realizado com balança semi analítica, utilizando tanto buretas de 10mL, quanto de 25mL, a variável volume foi a mais significativa, contribuindo com 70,91% e 94,10% para a estimativa de incerteza, respectivamente. Este resultado evidencia que o instrumento de medição de volume – neste estudo de caso, a bureta – é o equipamento responsável pela maior contribuição para o aumento de incerteza na metodologia.

Pode-se concluir que, com analistas bem treinados, o método titulométrico de oxirredução de análise de açúcares Lane-Eynon é uma técnica bastante confiável, mesmo em condições de utilização de balança semi analítica e com bureta de 10mL. Por outro lado, a

utilização deste tipo de balança associada ao uso de buretas de 25mL requer atenção especial, visto que os ensaios nessas condições atingiram níveis de incerteza próximos ao limite crítico.

A tentativa de minimizar o impacto da variável volume na contribuição de incerteza expandida através da medição do ponto final da reação de redução do cobre (Cu^{+2}) a óxido cuproso (Cu_2O) pelo método potenciométrico não obteve sucesso.

A realização deste trabalho de pesquisa contribuiu de modo significativo para o aumento de informações relacionadas à incerteza de ensaios físico-químicos de análise de alimentos, em especial para análise titulométrica de açúcares redutores pelo método Lane-Eynon. Os resultados obtidos com esta dissertação têm grande potencial para contribuir para o aumento da qualidade dos serviços prestados pelo Laboratório de Análise de Alimentos e Bebidas, LAAB-UFRRJ.

6. REFERÊNCIAS

ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005. **Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração**. 2ª Ed. ANBT/INMETRO: Rio de Janeiro, 2005. 31p.

ALLINGER, N. L. *et.al.*. Hidratos de Carbono. In: _____. **Química Orgânica**. Segunda edición. Barcelona: Editorial Reverté, AS, 1991. Cap 25, p 959 – 997.

BRASIL, Instrução Normativa Nº 20 de 21 de Julho de 1999. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Métodos físico-químicos para controle de produtos cárneos e seus ingredientes, sal e salmoura**. MQT-014.

BROWN, A. S.; BROWN, R. J. C.; CORNS, W. T.; STOCKWELL, P. B. **Establish SI traceability for measurement of mercury vapour**. *The Analyst*, 2008, 133, 946–953. DOI: 10.1039/b803724h. The Royal Society of Chemistry, 2008.

CONN, E.; STUMPF, P.K. **Introdução à bioquímica**. Tradução da 3ª edição americana, supervisão José Reinaldo Magalhães. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 1975.

DEMIATE, I. M.; WOSIACKI, G.; CZELUSNIAK, C.; NOGUEIRA, A. **Determinação de açúcares redutores e totais em alimentos. Comparação entre método colorimétrico e titulométrico**. Ponta Grossa. *PUBLICATIO UEPG – Exact and Soil Science, Agrarian S. and Engineering*, 8(1): 65 – 78, 2002.

DIAS, M. G.; CAMÕES, M. F. G. F. C.; OLIVEIRA, L. **Uncertainty estimation and in-house method validation of HPLC analysis of carotenoids for food composition data production**. ScienceDirect – Analytical Methods, *Food Chemistry* 109, p. 815 – 824, 2008.

DRUZIAN, J. I.; DOKI, C.; SCAMPARINI, A. R. P. **Determinação simultânea de açúcares e polióis por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-IR) em sorvetes de baixas calorias (“diet”/“light”)**. Videira (SC): UNOESC. *Ciênc. Tecnol. Alimentos*. vol. 25 n° 2. Apr/June., 2005.

EURACHEM/CITAC. **Determinando a Incerteza na Medição Analítica**. 2ª Edição Internacional. 1ª Edição Brasileira do GUIA EURACHEM/CITAC publicada pelo INMETRO/ABNT, 2002.

EURACHEM/RELACRE 1. **Exemplos de Cálculos de Incerteza**. Edição: Setembro 2002. Grupo de Trabalho GT01 – “Incertezas” do *Comité Eurachem*, 2002.

FELTRE, R.; YOSHINAGA, S. **Química orgânica**. v 4. São Paulo: Editora Moderna, 1974. 670p.

FERREIRA, V. F.; SILVA, F. C.; PERRONE, C. C. **Sacarose no laboratório de química orgânica**. *Quim. Nova*, v. 24, n. 6. São Paulo, Nov/Dec, 2001.

FRANCISCO JR., W. E. Carboidratos: Estrutura, Propriedades e Funções. **Química Nova na Escola** – Conceitos Científicos em Destaque, Araraquara, n 29. Ago 2008.

HODGE, J. E.; OSMAN, E. M. Carbohydrates. In: FENNEMA, O. R. **Principles of Food Science – Food Chemistry**. Part I. V4. Madison: Marcel Dekker, Inc, 1976. Cap 3, p 41 – 138.

INMETRO. **Guia para a Expressão da Incerteza de Medição**. Edição Revisada. 3ª Edição Brasileira. *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*. Rio de Janeiro: INMETRO/ABNT, 2003.

JORNADA, D. H. **Calcular a incerteza em ensaios é realmente importante?** CERTIFICAR – Empresa de consultoria para laboratórios. Porto Alegre/RS. Disponível em: http://www.portalcertificar.com.br/download.php?arquivo=art_15.pdf. Acessado em: 06/01/2010.

JUNQUEIRA, R. G. **Orientações Sobre Incerteza de Medição (Preparado pelo Reino Unido)**. *Codex Alimentarius Commission – CX/MAS 07/28/2 – Add.2*. ALM/FAFAR/UFGM, 2007.

MENDES, A.; ROSARIO, P. P. **Metrologia e Incerteza de Medição**. São Paulo: Editora EPSE, 2005.

MEYER, L. H. Carbohydrates. In: _____. **Food Chemistry**. Michigan: AVI, 1976. Cap 3, p 65 – 113.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos - Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 3ª Edição. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2007. 480p.

NIT-DICLA-021. **Expressão da Incerteza de Medição na Calibração**. Versão brasileira da EA-4/02. INMETRO. Rev nº 03, Ago 2007.

RAIZER, A.; NYLAND, F.; AMARAL, M. H. **Cálculo de Incerteza para Compatibilidade Eletromagnética**. Florianópolis, SC: UFSC. *Seminário Internacional de Metrologia Elétrica (VII SEMETRO)*, Belo Horizonte, 2007.

SILVA, R. N.; MONTEIRO, V. N.; ALCANFOR, J. D. X.; ASSIS, E. M.; ASQUIERI, E. R. **Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel**. Goiânia: UFG. *Ciênc. Tecnol. Alimentos*. vol. 23 nº 3. Campinas, Sept/Dec., 2003.

SILVA, W. P.; SILVA, C. D. P. S.; LIMA, A. G. B. **Incerteza na determinação do teor de água de equilíbrio de produtos agrícolas.** *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, Especial, v.7, n.2, p. 159 – 164, 2005.

THOMPSON, M. **AMC Technical Brief**. n 17. *Royal Society of Chemistry*. July, 2004.

VIM. **Vocabulário Internacional de Metrologia: conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM 2008)**. 1ª Edição Brasileira (3ª Edição Internacional). Rio de Janeiro: INMETRO, 2009.

7. ANEXOS

Anexo A. Modelo de certificado de calibração de pipeta volumétrica

 HEXOLAB	 CAL 0189	<h1 style="margin: 0;">CERTIFICADO DE CALIBRAÇÃO</h1>	Reg. nº HXL-VID-R00090/08 Folha 1 / 1 Laboratório de calibração acreditado pela CGCRE/INMETRO de acordo com a NBR ISO/IEC 17025 sob o nº 189
Laboratório Avançado de Metrologia Ltda.			
DADOS DO CLIENTE			
Nome:	Roni Alzi Vidros Científicos Ltda.		
Endereço:	Rua 29 de Julho 151 – Bonsucesso – Rio de Janeiro – RJ CEP: 21043-540		
Nº O.S.:	0530/07		
IDENTIFICAÇÃO DO INSTRUMENTO CALIBRADO			
Objeto:	Pipeta		
Tipo do objeto:	Volumétrica (de borossilicato)		
Fabricante:	Roni Alzi		
Identificação:	V-269		
Temp. de referência:	20 °C		
Capacidade nominal:	1 mL		
Valor de uma divisão:	-		
DADOS AMBIENTAIS			
Temperatura (°C)	Pressão atm. (mm Hg)	Umidade relativa (%)	
20,7	760	52	
INSTRUMENTOS UTILIZADOS			
Instrumento	Nº de identificação	Nº de certificado	
Balança 3	13910466	EBM 2007/453A	
Balança 1	00515	EBM 2007/456A	
Barômetro	1882-01	IFM PR 2737/2005	
Higrômetro	1	VISOMES LV 6453/2006	
Picnômetro	2	INMETRO DIMCI 0184/2007	
Termômetro 5	02010173	IFM TE 1708/2005	
Termômetro 1	9679964	IFM TE 1707/2005	
RESULTADOS			
Volume nominal (mL)	Volume Calibrado a 20°C (mL)	Incerteza expandida (mL)	Fator de abrangência (-)
1	0,9977	0,0025	2,649
Data de calibração:	04/01/2008		
Data de emissão:	05/01/2008		
_____ Cassio Vinicius Marques de Sá Gerente Técnico			
<p>Breve descrição do método: A metodologia empregada segue os procedimentos internos do HEXOLAB, estando baseados na norma ABNT MB-3119, que consiste em determinar o volume de água destilada contido pela vidraria a ser calibrada, por meio de pesagens sucessivas da mesma. Conhecendo-se as condições ambientais, estas estabilizadas, calcula-se estatisticamente o volume calibrado a 20 °C da vidraria, assim como a sua incerteza expandida.</p> <p>Obs.1: A incerteza expandida de medição relatada é declarada como a incerteza padrão da medição multiplicada pelo fator de abrangência relatado, que para uma distribuição normal corresponde a uma probabilidade de abrangência de aproximadamente 95%. A incerteza padrão de medição foi determinada de acordo com a publicação EA-4/02.</p> <p>Obs.2: Os resultados relatados só se aplicam exclusivamente aos instrumentos calibrados acima descritos, não sendo permitida a sua reprodução parcial.</p>			
_____ HEXOLAB - Laboratório Avançado de Metrologia Ltda. - Av. Braz de Pina 2095 sala 201 Vista Alegre - Rio de Janeiro - RJ - CEP: 21235-600 - Tel: 0xx-21-2481-7100 - Tel/Fax: 0xx-21-2481-7685			

Anexo B. Função inversa da Distribuição de Student “t”								
GL, v, (n-1)	p= 40%, $\alpha=0,6$	p= 60%, $\alpha=0,4$	p= 80%, $\alpha=0,2$	p= 90%, $\alpha=0,1$	p= 95%, $\alpha=0,05$	p= 95,45%, $\alpha=0,0455$	p= 98%, $\alpha=0,02$	p= 99%, $\alpha=0,01$
1	0,727	1,376	3,078	6,314	12,706	13,968	31,821	63,657
2	0,617	1,061	1,886	2,920	4,303	4,527	6,965	9,925
3	0,584	0,978	1,638	2,353	3,182	3,307	4,541	5,841
4	0,569	0,941	1,533	2,132	2,776	2,869	3,747	4,604
5	0,559	0,920	1,476	2,015	2,571	2,649	3,365	4,032
6	0,553	0,906	1,440	1,943	2,447	2,517	3,143	3,707
7	0,549	0,896	1,415	1,895	2,365	2,429	2,998	3,499
8	0,546	0,889	1,397	1,860	2,306	2,366	2,896	3,355
9	0,543	0,883	1,383	1,833	2,262	2,320	2,821	3,250
10	0,542	0,879	1,372	1,812	2,228	2,284	2,764	3,169
11	0,540	0,876	1,363	1,796	2,201	2,255	2,718	3,106
12	0,539	0,873	1,356	1,782	2,179	2,231	2,681	3,055
13	0,538	0,870	1,350	1,771	2,160	2,212	2,650	3,012
14	0,537	0,868	1,345	1,761	2,145	2,195	2,624	2,977
15	0,536	0,866	1,341	1,753	2,131	2,181	2,602	2,947
16	0,535	0,865	1,337	1,746	2,120	2,169	2,583	2,921
17	0,534	0,863	1,333	1,740	2,110	2,158	2,567	2,898
18	0,534	0,862	1,330	1,734	2,101	2,149	2,552	2,878
19	0,533	0,861	1,328	1,729	2,093	2,140	2,539	2,861
20	0,533	0,860	1,325	1,725	2,086	2,133	2,528	2,845
21	0,532	0,859	1,323	1,721	2,080	2,126	2,518	2,831
22	0,532	0,858	1,321	1,717	2,074	2,120	2,508	2,819
23	0,532	0,858	1,319	1,714	2,069	2,115	2,500	2,807
24	0,531	0,857	1,318	1,711	2,064	2,110	2,492	2,797
25	0,531	0,856	1,316	1,708	2,060	2,105	2,485	2,787
26	0,531	0,856	1,315	1,706	2,056	2,101	2,479	2,779
27	0,531	0,855	1,314	1,703	2,052	2,097	2,473	2,771
28	0,530	0,855	1,313	1,701	2,048	2,093	2,467	2,763
29	0,530	0,854	1,311	1,699	2,045	2,090	2,462	2,756
30	0,530	0,854	1,310	1,697	2,042	2,087	2,457	2,750
40	0,529	0,851	1,303	1,684	2,021	2,064	2,423	2,704
50	0,528	0,849	1,299	1,676	2,009	2,051	2,403	2,678
60	0,527	0,848	1,296	1,671	2,000	2,043	2,390	2,660
70	0,527	0,847	1,294	1,667	1,994	2,036	2,381	2,648
80	0,526	0,846	1,292	1,664	1,990	2,032	2,374	2,639
120	0,526	0,845	1,289	1,658	1,980	2,021	2,358	2,617
Infinito	0,524	0,842	1,282	1,645	1,960	2,000	2,326	2,576

Anexo C. Valores de Estimações de Incerteza de Medição.

Concentração	Incerteza expandida (%)	Intervalo de Concentração Aceitável*
100g/100g	4	96 a 104g/100g
10g/100g	5	9,5 a 10,5g/100g
1g/100g	8	0,92 a 1,08g/100g
1g/kg	11	0,89 a 1,11g/kg
100mg/kg	16	84 a 116mg/kg
10mg/kg	22	7,8 a 12,2mg/kg
1mg/kg	32	0,68 a 1,32mg/kg
< 100µg/kg	44	56 a 144µg/kg

* valores dentro destes intervalos podem ser considerados como sendo da mesma população analítica; a incerteza expandida baseia-se em resultados de estudos colaborativos.

Fonte: Junqueira, 2007.

Anexo D. Cálculos de incerteza para o Título (T).

Título

A primeira componente calculada foi o Título (T). Esta variável é composta de sub-variáveis que, por sua vez, também possuem incertezas a elas associadas e que devem ser tratadas adequadamente para atribuir ao Título a incerteza combinada e expandida. Este procedimento é representado pela equação (16).

Com os dados de massa de glicose (0,5004g), diluição (100,037mL) e volume médio do padrão gasto na titulação (10,01mL) ($n=10$), obteve-se o resultado conforme apresentado a seguir:

$$T = \frac{m_p \cdot V_p}{d_p} \quad (16)$$

$$T = \frac{0,5004g \cdot 10,01mL}{100,037mL} \quad (28)$$

$$T = 0,0501g \quad (29)$$

A seguir, calculou-se a incerteza padrão de cada uma das variáveis com auxílio da equação (15);

$$u(y) = \frac{U}{k} \quad (15)$$

A incerteza padrão da massa, $u(m)_p$, da solução padrão de glicose utilizada, foi obtida dividindo a incerteza expandida, U , máxima da balança analítica (0,0002g) por seu respectivo fator de abrangência, k , (2,000). Estes dados foram obtidos do certificado de calibração do equipamento.

$$u(m)_p = \frac{0,0002}{2,000} \quad (30)$$

$$u(m)_p = 0,0001g \quad (31)$$

O cálculo da incerteza padrão da diluição, $u(d)_p$, a que a solução padrão de glicose foi submetida teve os dados retirados do certificado de calibração do instrumento. A incerteza padrão foi obtida dividindo a incerteza expandida, U , do balão volumétrico (0,020mL) por seu respectivo fator de abrangência, k , (2,019):

$$u(d)_p = \frac{0,020}{2,019} \quad (32)$$

$$u(d)_p = 0,010\text{mL} \quad (33)$$

A incerteza padrão do volume, $u(V_p)$, da solução padrão de glicose gasto na titulação é uma variável à qual se atribui uma distribuição do tipo normal, pois seus dados tendem a apresentar um comportamento de curva do tipo normal. Dessa forma, esta variável é avaliada por seu intervalo de confiança, IC , a uma probabilidade de 95,45% (multiplicando pelo valor t-Student, *ver Anexo B*) ou a incerteza padrão da média, \bar{s} , e seu CV%; Por conta disso, é necessário que se faça uma série de, no mínimo, três repetições para que seja avaliada a flutuação de seus dados. Para obtenção da incerteza padrão desta variável, remete-se ao certificado de calibração da bureta utilizada no experimento. Como citado anteriormente, para a calibração da bureta é realizada uma calibração de três pontos, nos volumes nominais de 1, 5 e 10mL para bureta com capacidade volumétrica de 10mL (como as utilizadas neste experimento). Observa-se que no certificado de calibração há três volumes calibrados com valores próximos aos volumes nominais, com seus respectivos fatores de abrangência, k . Dessa forma, em função do volume gasto, adota-se a maior incerteza expandida daquela faixa de valores com seu respectivo valor de k .

O volume médio gasto da solução padrão de glicose foi de 10,01mL. Desta maneira, considerou-se o valor de incerteza expandida máxima, que neste caso é para o valor nominal de 10,00mL, com $U = 0,020\text{mL}$ e $k = 2,035$. Quando se aplica $u = U/k$, encontra-se a contribuição de incerteza padrão provinda da bureta.

Já para o cálculo da incerteza padrão de $u(V)_p$, dado pela equação (28), inicialmente obtém-se a $u_{\text{bureta}} = 0,020/2,035 = 0,010\text{mL}$ e a seguir faz-se o somatório da raiz quadrada positiva da u_{bureta} com a incerteza padrão da média ($\bar{s} = 0,02$) das repetições ($n = 10$), conforme a expressão (34) abaixo.

$$u(V) = \sqrt{\bar{s}^2 + u_b^2} \quad (34)$$

$$u(V_p) = \sqrt{0,02^2 + 0,010^2} \quad (35)$$

$$u(V_p) = 0,02\text{mL} \quad (36)$$

De posse dos valores experimentais de cada uma das variáveis do cálculo e de suas respectivas contribuições de incerteza padrão, calculou-se a intensidade da contribuição de cada uma delas individualmente para a incerteza global, conforme demonstrado a seguir.

$$T = \frac{m_p \cdot V_p}{d_p} \quad (16)$$

A primeira derivada da equação (16) foi em relação à massa do padrão de glicose:

$$\frac{\partial T}{\partial m_p} = \frac{V_p}{d_p} \quad (17)$$

Em seguida a derivada da variável em relação ao volume de amostra gasto na titulação:

$$\frac{\partial T}{\partial V_p} = \frac{m_p}{d_p} \quad (18)$$

E por último a derivada em relação à diluição a que a amostra foi submetida:

$$\frac{\partial T}{\partial d_p} = \frac{m_p \cdot V_p}{d_p^2} \quad (19)$$

Quando se deriva todas as variáveis dá-se origem a seguinte expressão (37)

$$\frac{\partial T}{\partial m_p} = \frac{V_p}{d_p}; \frac{\partial T}{\partial V_p} = \frac{m_p}{d_p}; \frac{\partial T}{\partial d_p} = \frac{m_p \cdot V_p}{d_p^2} \quad (37)$$

A incerteza combinada em relação ao Título, $u_c T$, corresponde à combinação de todas as variáveis não correlacionadas através de uma expressão matemática definida como o somatório da raiz quadrada positiva de todas as incertezas padrões das variáveis da equação:

$$u_c(T) = \sqrt{\left(\frac{V_p}{d_p}\right)^2 \cdot u(m_p)^2 + \left(\frac{m_p}{d_p}\right)^2 \cdot u(V_p)^2 + \left(\frac{m_p \cdot V_p}{d_p^2}\right)^2 \cdot u(d_p)^2} \quad (38)$$

Substituindo os valores experimentais com suas respectivas incertezas padrão, $u(y)$, obtém-se origem a incerteza combinada em relação ao Título, T :

$$u_c(T) = \sqrt{\left(\frac{10,01}{100,037}\right)^2 \cdot 0,0001^2 + \left(\frac{0,5004}{100,037}\right)^2 \cdot 0,02^2 + \left(\frac{0,5004 \cdot 10,01}{100,037^2}\right)^2 \cdot 0,010^2} \quad (39)$$

$$u_c(T) = \sqrt{1,0 \cdot 10^{-8}} \quad (40)$$

$$u_c(T) = 0,0001\text{g} \quad (41)$$

A incerteza expandida do Título, $U(T)$, foi obtida multiplicando $u_c(T)$ por 2,00, de acordo com Mendes e Rosário (2005), através da seguinte equação (21).

$$U = u_c \cdot k \quad (21)$$

$$U(T) = 0,0001 \cdot 2,00 \quad (42)$$

$$U(T) = 0,0002\text{g} \quad (43)$$

Dessa forma, a variável Título, T , torna-se uma componente com U e k , que será utilizada posteriormente na quantificação de açúcares redutores.

Com esse procedimento obteve-se as informações desejadas para o padrão de glicose, com incerteza expandida e fator de abrangência do Título: **0,0501g ± 0,0002g, $k = 2,00$** .

Observa-se que em relação à variável T , não há diferença em se adotar a incerteza expandida relacionada à balança analítica, visto que neste caso utiliza-se a última casa decimal. Como esta informação não transmite confiança, fica caracterizado a dependência da sensibilidade do equipamento, que por sua vez indica uma incerteza expandida baixa (0,40%).

Anexo E. Cálculo de incerteza para ART

A concentração de açúcares redutores foi calculada com base na equação (13), substituindo os dados obtidos de massa de amostra de $1,5000\text{g} \pm 0,0002\text{g}$, $k = 2,00$, diluída para $250,000\text{mL} \pm 0,050\text{mL}$, com $k = 2,023$. O valor do T como apresentado em 4.1 e volume médio (V) = $10,05\text{mL}$, com $\sigma = 0,04\text{mL}$, ($n = 6$) e $\bar{s} = 0,04$:

$$\text{ART} = \frac{250,000 \cdot 0,0501 \cdot 100}{1,5000 \cdot 10,05} \quad (44)$$

$$\text{ART} = \mathbf{83,1\%} \quad (45)$$

Com o valor de ART calculado para amostra de mel, calculou-se a incerteza padrão de cada componente do resultado obtido na equação (45), para em seguida calcular sua incerteza combinada e posteriormente a incerteza expandida deste resultado:

- Incerteza padrão: $u = U/k$;
- $u(m)_a = 0,0002/2,00 = 0,0001\text{g}$ (massa da amostra);
- $u(d)_a = 0,050/2,023 = 0,025\text{mL}$ (diluição); e
- $uT = 0,0002/2,00 = 0,0001\text{g}$ (Título).

Para o cálculo de $u(V)$, equação (34), inicialmente obteve-se:

- $u(V)_b = 0,020/2,023 = 0,010\text{mL}$

e a seguir fez-se o somatório da raiz quadrada positiva da $u(V)_b$ com \bar{s} , obtida com $V_{a(\text{médio})} = 10,05\text{mL}$ ($n=6$) e desvio padrão (σ) = $0,04$ das repetições.

$$u(V) = \sqrt{\bar{s}^2 + u_b^2} \quad (34)$$

$$u(V_a) = \sqrt{0,04^2 + 0,010^2} \quad (46)$$

$$u(V_a) = 0,04\text{mL} \quad (47)$$

De posse de todos os dados, aplicou-se a derivada da expressão (14) do total de açúcares redutores para o cálculo da u_c com a equação (7), substituindo os valores.

$$\text{ART} = \frac{d_a \cdot T \cdot 100}{m_a \cdot V_a} \quad (14)$$

Derivou-se primeiramente a expressão 14, em relação à diluição (48):

$$\frac{\partial \text{ART}}{\partial d_a} = \frac{T \cdot 100}{m_a \cdot V_a} \quad (48)$$

A segunda derivada em relação ao Título forneceu:

$$\frac{\partial \text{ART}}{\partial T} = \frac{d_a \cdot 100}{m_a \cdot V_a} \quad (49)$$

A seguir, a derivada em relação à massa:

$$\frac{\partial \text{ART}}{\partial m_a} = \frac{d_a \cdot T \cdot 100}{m_a^2 \cdot V_a} \quad (50)$$

E finalmente a derivada desta expressão em relação ao volume:

$$\frac{\partial \text{ART}}{\partial V_a} = \frac{d_a \cdot T \cdot 100}{m_a \cdot V_a^2} \quad (51)$$

Logo, obteve-se a expressão unificada destas variáveis, que corresponde à incerteza combinada de ART:

$$u_c(\text{ART}) = \sqrt{\left(\frac{T \cdot 100}{m_a \cdot V_a}\right)^2 \cdot u(d_a)^2 + \left(\frac{d_a \cdot 100}{m_a \cdot V_a}\right)^2 \cdot u(T)^2 + \left(\frac{d_a \cdot T \cdot 100}{m_a^2 \cdot V_a}\right)^2 \cdot u(m_a)^2 + \left(\frac{d_a \cdot T \cdot 100}{m_a \cdot V_a^2}\right)^2 \cdot u(V_a)^2} \quad (52)$$

Substituindo os valores com os dados obtidos experimentalmente:

$$u_c(\text{ART}) = \sqrt{\left(\frac{0,0501 \cdot 100}{1,5000 \cdot 10,05}\right)^2 \cdot 0,025^2 + \left(\frac{250,000 \cdot 100}{1,5000 \cdot 10,05}\right)^2 \cdot 0,0001^2 + \left(\frac{250,000 \cdot 0,0501 \cdot 100}{1,5000^2 \cdot 10,05}\right)^2 \cdot 0,0001^2 + \left(\frac{250,000 \cdot 0,0501 \cdot 100}{1,5000 \cdot 10,05^2}\right)^2 \cdot 0,04^2} \quad (53)$$

$$u_c(\text{ART}) = \sqrt{0,109469} \quad (54)$$

$$u_c(\text{ART}) = 0,33086\% \quad (55)$$

A seguir calculou-se a incerteza expandida em relação de ART, $U(\text{ART})$ (56);

$$U(\text{ART}) = u_c(\text{ART}) \cdot k \quad (56)$$

$$U(\text{ART}) = 0,33086 \cdot 2,00 \quad (57)$$

$$U(\text{ART}) = \mathbf{0,66172\% \sim 0,7\%} \quad (58)$$

Anexo F. Cálculo de incerteza do Título utilizando balança semi analítica e buretas de 10mL e 25mL.

O cálculo da incerteza padrão, u , relacionada à massa do padrão de glicose e da amostra de mel utilizados neste experimento foi realizado através da equação (15) utilizando a incerteza expandida máxima, $U = 0,01\text{g}$, da balança semi analítica com seu respectivo fator de abrangência, $k = 2,00$.

Cálculo da incerteza padrão;

- massa:

$$u(m_p) = \frac{U}{k} \quad (15)$$

$$u(m_p) = \frac{0,01}{2,000} = 0,005\text{g} \quad (59)$$

- diluição da solução padrão de glicose:

$$u(d_p) = \frac{U}{k} \quad (15)$$

$$u(d_p) = \frac{0,10}{2,021} = 0,05\text{mL} \quad (60)$$

- volume:

Inicialmente calcula-se a contribuição de incerteza padrão da bureta (u_b) de 10mL e 25mL respectivamente:

$$u(b) = \frac{U}{k} \quad (15)$$

$$u_{(10\text{mL})} = \frac{0,020}{2,023} = 0,010\text{mL} \quad (61)$$

$$u_{(25\text{mL})} = \frac{0,030}{2,021} = 0,015\text{mL} \quad (62)$$

Em seguida, insere-se a contribuição da bureta na expressão (34) com o da incerteza padrão de repetitividade, \bar{s} , ou intervalo de confiança, IC , obtida experimentalmente para o dado.

$$u(V) = \sqrt{\bar{s}^2 + u^2} \quad (34)$$

Para a bureta de 10mL:

$$u(V_p)_{10mL} = \sqrt{0,03^2 + 0,01^2} \quad (63)$$

$$u(V_p)_{10mL} = 0,03mL \quad (64)$$

Para a bureta de 25mL:

$$u(V_p)_{25mL} = \sqrt{0,08^2 + 0,015^2} \quad (65)$$

$$u(V_p)_{25mL} = 0,08mL \quad (66)$$

Com as incertezas padrões de cada um dos parâmetros, tem-se a possibilidade de uni-las para o cálculo da incerteza combinada, equação (38), e, conseqüentemente, à incerteza expandida na probabilidade de 95,45%, segundo a distribuição *t-Student*.

Para a estimativa da incerteza utilizando balança semi analítica e bureta de 10mL:

$$u_c(T)_{10mL} = \sqrt{\left(\frac{v_p}{d_p}\right)^2 \cdot u(m)_p^2 + \left(\frac{m_p}{d_p}\right)^2 \cdot u(V)_p^2 + \left(\frac{m_p \cdot v_p}{d_p^2}\right)^2 \cdot u(d)_p^2} \quad (38)$$

$$u_c(T)_{10mL} = \sqrt{\left(\frac{9,99}{499,88}\right)^2 \cdot 0,005^2 + \left(\frac{2,504}{499,88}\right)^2 \cdot 0,03^2 + \left(\frac{2,504 \cdot 9,99}{499,88^2}\right)^2 \cdot 0,05^2} \quad (67)$$

$$u_c(T)_{10mL} = 0,0002g \quad (68)$$

Desta maneira, a incerteza expandida, U , é calculada como segue:

$$U = u_c \cdot k \quad (21) \quad \longrightarrow \quad U_{cT_{10mL}} = u_c T_{10mL} \cdot k$$

$$U_c(T)_{10mL} = 0,0002 \cdot 2,00 \quad (69)$$

$$U_c(T)_{10mL} = 0,0004g \quad (70)$$

Logo, a resposta para o valor do Título $\pm U$ nestas condições, é: **0,0500g \pm 0,0004g**, com $k=2,00$.

Para a estimativa da incerteza combinada utilizando balança semi analítica e bureta de 25mL, substituindo-se os valores na equação (38) tem-se:

$$u_c(T)_{25mL} = \sqrt{\left(\frac{10,40}{499,88}\right)^2 \cdot 0,005^2 + \left(\frac{2,504}{499,88}\right)^2 \cdot 0,08^2 + \left(\frac{2,504 \cdot 10,40}{499,88^2}\right)^2 \cdot 0,05^2} \quad (71)$$

$$u_c(T)_{25mL} = 0,0004 \quad (72)$$

$$U(T)_{25mL} = 0,0004 \cdot 2,00 \quad (73)$$

$$U(T)_{25mL} = 0,0008g \quad (74)$$

Logo, a resposta para o valor do Título $\pm U$ nestas condições, é: **0,0521g \pm 0,0008g**, com ***k=2,00***.

Anexo G. Cálculos de incerteza de ART utilizando balança semi analítica e buretas de 10mL e 25mL.

Cálculo da incerteza padrão da variável volume gasto e bureta utilizada.

$$u(V) = \sqrt{\bar{s}^2 + u_b^2} \quad (34)$$

Para a bureta de 10mL:

$$u(V)_{10\text{mL}} = \sqrt{0,04^2 + 0,01^2} \quad (75)$$

$$u(V)_{10\text{mL}} = 0,04\text{mL} \quad (76)$$

Para a bureta de 25mL:

$$u(V)_{25\text{mL}} = \sqrt{0,06^2 + 0,015^2} \quad (77)$$

$$u(V)_{25\text{mL}} = 0,06\text{mL} \quad (78)$$

A incerteza padrão da diluição da amostra de mel é dada por:

$$u(d_a) = \frac{U}{k} \quad (15)$$

$$u(d_a) = \frac{0,050}{2,023} = 0,025\text{mL} \quad (79)$$

A incerteza padrão da massa da amostra de mel foi obtida de acordo com:

$$u(m_a) = \frac{U}{k} \quad (15)$$

$$u(m_a) = \frac{0,001}{2,00} = 0,0005\text{g} \quad (80)$$

$$U = u_c \cdot k \quad (15)$$

A incerteza combinada de ART, $u_c\text{ART}$ na equação (52), é a união de todas as incertezas padrões destas variáveis associadas ao cálculo de ART.

$$u_c(\text{ART}) = \sqrt{\left(\frac{T \cdot 100}{m_a \cdot V_a}\right)^2 \cdot u(d_a)^2 + \left(\frac{d \cdot 100}{m_a \cdot V_a}\right)^2 \cdot u(T)^2 + \left(\frac{d \cdot T \cdot 100}{m_a^2 \cdot V_a}\right)^2 \cdot u(m_a)^2 + \left(\frac{d \cdot T \cdot 100}{m_a \cdot V_a^2}\right)^2 \cdot u(V_a)^2} \quad (52)$$

O cálculo para incerteza expandida de ART com a bureta de 10mL (considerando o Título e sua incerteza) e balança semi analítica é dada por:

$$u_c(\text{ART})_{10\text{mL}} = \sqrt{\left(\frac{0,0500 \cdot 100}{1,503 \cdot 9,98}\right)^2 \cdot 0,025^2 + \left(\frac{250,00 \cdot 100}{1,503 \cdot 9,98}\right)^2 \cdot 0,0004^2 + \left(\frac{250,00 \cdot 0,0500 \cdot 100}{1,503^2 \cdot 9,98}\right)^2 \cdot 0,0005^2 + \left(\frac{250,00 \cdot 0,0500 \cdot 100}{1,503 \cdot 9,98^2}\right)^2 \cdot 0,04^2} \quad (81)$$

$$u_c(\text{ART})_{10\text{mL}} = 0,746219647 \quad (82)$$

$$U(\text{ART})_{10\text{mL}} = 0,746219647 \cdot 2,00 \quad (83)$$

$$U(\text{ART})_{10\text{mL}} = 1,5\% \quad (84)$$

e o cálculo para incerteza expandida de ART com a bureta de 25mL (considerando o Título e sua incerteza) e balança semi-analítica é dada por:

$$u_c(\text{ART})_{25\text{mL}} = \sqrt{\left(\frac{0,0521 \cdot 100}{1,503 \cdot 10,17}\right)^2 \cdot 0,025^2 + \left(\frac{250,00 \cdot 100}{1,503 \cdot 10,17}\right)^2 \cdot 0,0008^2 + \left(\frac{250,00 \cdot 0,0521 \cdot 100}{1,503^2 \cdot 10,17}\right)^2 \cdot 0,0005^2 + \left(\frac{250,00 \cdot 0,0521 \cdot 100}{1,503 \cdot 10,17^2}\right)^2 \cdot 0,06^2} \quad (85)$$

$$u_c(\text{ART})_{25\text{mL}} = 1,401995536 \quad (86)$$

$$U(\text{ART})_{25\text{mL}} = 1,401995536 \cdot 2,00 \quad (87)$$

$$U(\text{ART})_{25\text{mL}} = 2,80\% \sim 3\% \quad (88)$$

Para avaliar esses dados, calcularam-se os valores de ART para amostra de mel com a equação (14), utilizando balança semi-analítica e as buretas de 10mL e 25mL, agora acompanhados de suas respectivas incertezas expandidas, como segue:

$$\text{ART} = \frac{d_a \cdot T \cdot 100}{m_a \cdot V_a} \quad (14)$$

Substituindo os valores obtém-se os valores de ART para amostra de mel utilizando as buretas de 10mL de 25mL obtidos nas equações (90) e (92), respectivamente.

$$\text{ART}_{10\text{mL}} = \frac{250,00 \cdot 0,0500 \cdot 100}{1,503 \cdot 9,98} \quad (89)$$

$$\mathbf{ART}_{10\text{mL}} = \mathbf{83,3\%} \quad (90)$$

$$\mathbf{ART}_{25\text{mL}} = \frac{250,00 \cdot 0,0521 \cdot 100}{1,503 \cdot 10,17} \quad (91)$$

$$\mathbf{ART}_{25\text{mL}} = \mathbf{85\%} \quad (92)$$