

4 Confiabilidade Metrológica na Determinação de Vitamina K

Toda atividade relacionada à medição necessita ser realizada com rigor metrológico de modo a garantir que os resultados obtidos na determinação de um fenômeno físico ou químico sejam confiáveis. Isso é importante não só do ponto de vista econômico, mas também social, que, dentre outros, abrange as medições com repercussão no setor da saúde (Costa Monteiro, 2007). Muitas das linhas de atuação em biometrologia, que é a aplicação da metrologia, ciência das medições, às biociências, possuem forte interseção com a metrologia química (Costa Monteiro, 2007).

Metrologia – Ciência da medição e suas aplicações.

Vocabulário Internacional de Metrologia, conceitos fundamentais e gerais e termos associados,
2012.

As medições analíticas, na maioria das vezes, envolvem um custo elevado e são utilizadas para a tomada de decisões importantes, logo dados analíticos pouco confiáveis podem levar a decisões desastrosas e prejuízos financeiros irreparáveis (EURACHEM, 1998).

A garantia da confiabilidade metrológica em medições químicas é um procedimento complexo se comparado às medições físicas, pois envolvem a determinação de substâncias em diferentes níveis de concentração, além do fato de que a maioria das medições químicas são realizadas indiretamente, através da medição de uma ou mais propriedades físicas, como por exemplo, a emissão ou absorção de luz ou ainda de uma grandeza elétrica, como potencial, resistência ou corrente (Alves & Moraes, 2012).

Dentro deste contexto destaca-se o desenvolvimento de métodos para a determinação de vitaminas, tanto em alimentos quanto em produtos farmacêuticos. As técnicas analíticas existentes envolvem uma série de etapas associadas à extração e quantificação das vitaminas, e estão sujeitas, assim como todo processo de medição, a erros decorrentes de vários fatores. Entre estes pode-se citar: equipamentos e vidrarias mal calibrados, deficiência de funcionamento, erros de operação, variações no ambiente do laboratório, limitação nos

instrumentos de medição, entre outros (CODEX ALIMENTARIUS, 2006). Logo, todos esses fatores devem ser levados em conta no desenvolvimento e determinação da incerteza de métodos analíticos.

No item 4.1 é apresentada a estrutura da metrologia, destacando-se as principais organizações que oferecem suporte à garantia da confiabilidade metrológica na determinação de vitamina K. No item 4.2 são apresentadas duas importantes ferramentas da metrologia para a garantia da confiabilidade metrológica em medições analíticas: validação e estimativa da incerteza de medição. Tais abordagens metrológicas são utilizadas na caracterização da confiabilidade do método desenvolvido no presente trabalho.

4.1. Estrutura da Metrologia

Com o foco principal de prover confiabilidade, credibilidade, universalidade e qualidade aos resultados das medições, a metrologia está dividida em três grupos: Metrologia Científica, Metrologia Industrial e Metrologia Legal. A Metrologia Científica tem por objetivos organizar, desenvolver e conservar os padrões das unidades de medidas; a Metrologia Industrial assegura o correto funcionamento de instrumentos de medição utilizados na indústria; e a Metrologia Legal trata das unidades de medida, métodos de medição e instrumentos de medição relacionados a requisitos legais, tendo o objetivo de assegurar uma garantia pública do ponto de vista da segurança e da exatidão das medições em setores comerciais, da saúde, segurança e meio ambiente (OIML, 2012; Inmetro, 2011b).

Nos subitens 4.1.1, 4.1.2 e 4.1.3 são apresentadas as principais organizações que contribuem para a construção de uma infra-estrutura metrológica de suporte às medições químicas, tanto em nível internacional e regional, como em nível nacional, cada qual com suas atribuições. Muitas vezes estas organizações atuam em conjunto no estabelecimento de guias e normas que garantam a validade dos resultados analíticos, sendo que aqueles mais diretamente relacionados ao tema do presente trabalho são destacados na descrição de cada organismo.

4.1.1. Contexto Internacional

4.1.1.1. BIPM

O BIPM (*Bureau International des Poids et Mesures*) foi criado em 1875 pela Conferência do Metro. É uma organização intergovernamental submetida à autoridade da Conferência Geral de Pesos e Medidas (CGPM - *General Conference on Weights and Measures*) e à fiscalização exclusiva do Comitê Internacional de Pesos e Medidas (CIPM - *International Committee for Weights and Measures*). Tem por missão assegurar um sistema de medidas único, universal, sendo encarregado de (BIPM, 2011a; IPEM, 2011):

- estabelecer as unidades e os padrões internacionais das principais grandezas físicas e de conservar os protótipos internacionais;
- assegurar a coordenação das técnicas de medições correspondentes;
- efetuar a comparação dos padrões nacionais e internacionais;
- efetuar e coordenar as determinações relativas às constantes físicas que intervêm naquelas unidades.

A CGPM é formada por representantes de todos os estados membros da Convenção do Metro e reúne-se de quatro em quatro anos, com a seguinte finalidade (BIPM, 2011a; IPEM, 2011):

- assegurar a propagação do Sistema Internacional de Unidades;
- sancionar os resultados das novas determinações metrológicas fundamentais e diversas resoluções científicas de cunho internacional;
- adotar as decisões importantes concernentes à organização e ao desenvolvimento do Bureau Internacional de Pesos e Medidas.

O CIPM estabelece uma série de Comitês Consultivos, os quais reúnem especialistas de todo o mundo em campos específicos como consultores nos domínios científico e técnico. Ao todo são 10 comitês:

- CCEM: Comitê Consultivo para Eletricidade e Magnetismo;
- CCAUV: Comitê Consultivo para Acústica, Ultrassom e Vibração;
- CCL: Comitê Consultivo para Comprimento;
- CCM: Comitê Consultivo para as Massas e as Grandezas Aparentes;
- CCPR: Comitê Consultivo para Fotometria e Radiometria;
- CCQM: Comitê Consultivo para a Quantidade de Matéria;
- CCRI: Comitê Consultivo para Radiações Ionizantes;
- CCT: Comitê Consultivo para Termometria;

- CCTF: Comitê Consultivo para Tempo e Frequência;
- CCU: Comitê Consultivo para as Unidades de Medida.

O Comitê Consultivo para a Quantidade de Matéria (CCQM), diretamente associado à metrologia química, foi criado em 1993 e tem como atividades o estabelecimento de métodos primários para a medição da quantidade de matéria, estabelecimento de equivalência internacional entre os laboratórios nacionais e aconselhamento à CIPM sobre assuntos relacionados com a metrologia em química. O CCQM possui sete grupos de trabalho (BIPM, 2011b):

- CCQM Grupo de Trabalho para Comparações-chave e Qualidade CMC (KCWG);
- CCQM Grupo de Trabalho para Análise de Gás (GAWG);
- CCQM Grupo de Trabalho sobre Análise Eletroquímica (EAWG);
- CCQM Grupo de Trabalho sobre Análise Inorgânica (IAWG);
- CCQM Grupo de Trabalho para Análise Orgânica (OAWG);
- CCQM Grupo de Trabalho sobre Bioanálises (BAWG);
- CCQM Grupo de Trabalho para Análise de Superfície (SAWG).

Existem ainda os *Joint Committees* que são comissões mistas do BIPM com outras organizações internacionais criadas para tarefas específicas de interesse comum. Atualmente são quatro (BIPM, 2011b):

- JCGM: Comitê Conjunto para Guias em Metrologia;
- JCRB: Comissão Mista das Organizações Regionais de Metrologia e do BIPM;
- JCTLM: Comitê Misto para Rastreabilidade em Medicina Laboratorial;
- DCMAS Rede: Rede de Metrologia, Acreditação e Normalização para Países em Desenvolvimento.

O JCGM possui dois grupos de trabalho que atuam no sentido de elaborar e promover o uso do Guia para a Expressão da Incerteza de Medição (ISO GUM) (JCGM 100:2008) e o Vocabulário Internacional de Termos Básicos e Gerais em Metrologia (VIM) (JCGM 200:2012), documentos amplamente utilizados para elaboração do presente trabalho.

O JCTLM também possui dois grupos de trabalho o JCTLM-WG1 e o JCTLM-WG2 que têm como função estabelecer listas de materiais de referência certificados de ordem mais elevada, procedimentos de medição/métodos de referência e serviços de medição dos laboratórios de referência (BIPM, 2011b).

Material de Referência Certificado – Material de referência acompanhado de uma documentação emitida por uma entidade reconhecida, a qual fornece um ou mais valores de propriedades especificadas com as incertezas e as rastreabilidades associadas, utilizando procedimentos válidos.

Na área de metrologia química devido à diversidade de produtos e complexidade das matrizes o uso de materiais de referência certificados se torna de fundamental importância de modo a garantir a confiabilidade e comparabilidade das medições por meio da rastreabilidade metrológica.

Rastreabilidade Metrológica – Propriedade de um resultado de medição pela qual tal resultado pode ser relacionado a uma referência através de uma cadeia ininterrupta e documentada de calibrações, cada uma contribuindo para a incerteza de medição.

Vocabulário Internacional de Metrologia, conceitos fundamentais e gerais e termos associados, 2012.

Existem ainda as Organizações Regionais de Metrologia (RMO), as quais atuam no sentido de promover a cooperação internacional, melhorar a capacidade metrológica regional através da partilha de conhecimentos e troca de serviços técnicos entre os laboratórios membros, estabelecer a confiabilidade mútua na validade dos certificados de calibração e medição dos seus Institutos Nacionais de Metrologia, entre outras funções. Essas organizações estão organizadas em seis grandes blocos principais (BIPM, 2011c):

1. Asia Pacific Metrology Programme (APMP): bloco regional constituído pelos países da região do Pacífico e da Ásia;
2. Euro-Asian Cooperation of National Metrology Programme (COOMET): bloco regional dos países da Europa-Ásia;
3. European Association of National Metrology Institutes (EUROMET): bloco regional dos países da Europa;
4. Middle East and Northern África Regional Metrology Cooperation (MENAMET): bloco regional dos países da Ásia;
5. Southern African Development Community Cooperation in Measurement Traceability (SADCMET): bloco regional dos países da África Meridional;
6. Inter-American Metrology System (SIM): bloco regional dos países das Américas.

Na área de química analítica, os materiais de referência certificados existentes para analitos como as vitaminas se limitam às vitaminas B2, B6, C e E, produzidos somente por dois Institutos Nacionais de Metrologia, ambos pertencentes ao SIM: o CENAM - Centro Nacional de Metrologia do México (Vitamina E) e o NIST - *National Institute of Standards and Technology* nos Estados Unidos (Vitaminas B2, B6, C e E) (BIPM, 2011d).

O Brasil participa ativamente do SIM, através do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro), em atividades como programas de

comparações-chave, dentro do Arranjo de Reconhecimento Mútuo (MRA) do Comitê Internacional de Pesos e Medidas (CIPM/BIPM) (CONMETRO, 2011).

4.1.1.2. OIML

A Organização Internacional de Metrologia Legal (OIML - *Organisation internationale de métrologie légale*) é uma organização intergovernamental cujos membros incluem Estados-Membros, os países que, como o Brasil, participam ativamente das atividades técnicas; e membros correspondentes, os países que aderem à OIML como observadores. Criada em 1955 com o objetivo de promover a harmonização global de procedimentos de metrologia legal, a OIML desenvolveu uma estrutura mundial técnica que oferece aos seus membros as diretrizes metrológicas para a elaboração dos requisitos nacionais e regionais sobre o fabrico e utilização de instrumentos de medição para aplicações de metrologia legal (OIML, 2011).

A OIML possui 18 comitês técnicos (TC). O TC-17 se refere a instrumentos para medições físico-químicas e possui vários subcomitês. Este comitê, no entanto, não publicou nenhum documento que se refira a procedimentos para medição e garantia da confiabilidade metrológica do equipamento de eletroforese capilar, o qual constitui o instrumento de medição utilizado neste trabalho. Por outro lado, o TC 16, comitê sobre instrumentos para a medição de poluentes, possui documentos utilizando tanto o HPLC (TC16/SC3 R112) (OIML, 2011a) como a Cromatografia Gasosa (TC16/SC3 R82) na determinação de pesticidas e outras substâncias tóxicas (OIML, 2011b).

4.1.1.3. ILAC

A ILAC (*International Laboratory Accreditation Cooperation*) é uma cooperação internacional de organismos de acreditação de laboratórios e de inspeção criada há 35 anos, cujo objetivo é criar uma estrutura internacional para apoiar o comércio internacional (ILAC, 2011).

O objetivo fundamental do acordo de reconhecimento mútuo da ILAC é a remoção de barreiras técnicas, com o amplo uso e aceitação pela indústria e pelos órgãos reguladores, dos resultados de laboratórios e organismos de inspeção acreditados (ILAC, 2011).

A ILAC possui uma série de publicações que fazem parte dos critérios para avaliações do ILAC. Entre estas publicações pode-se citar (ILAC, 2011):

- ILAC G17:2002 Introduce o conceito de incerteza de medição em testes em associação com a exigência de aplicação da norma ISO/IEC 17025.
- ILAC P10:2002 Rastreabilidade dos Resultados de Medição: fornece uma política de rastreabilidade dos resultados de medição que se destina a ser implementado pelos membros da ILAC.
- ILAC P14:12/2010 Política de incerteza na calibração: estabelece os requisitos e diretrizes para a estimativa e declaração de incerteza na calibração e medição.

4.1.1.4. WHO

A Organização Mundial da Saúde (OMS - *World Health Organization*) é uma agência criada em 1948, subordinada a Organização das Nações Unidas (ONU) com objetivo principal de desenvolver e melhorar o nível de saúde de todo ser humano de qualquer parte do planeta. É responsável pelo estabelecimento de normas e orientações, articulação de políticas baseadas em evidência, prestação de apoio técnico aos países, acompanhamento e avaliação de tendências em saúde (WHO, 2007).

A OMS tem uma série de publicações na área de alimentos entre as quais se encontra o Requerimento de vitaminas e minerais na alimentação humana (2^o ed., 2004), o qual especifica a ingestão diária recomendada de vitaminas e minerais, bem como suas funções, metabolismo e transporte no organismo humano (WHO, 2007).

A OMS também possui comitês especializados, como exemplo pode-se citar o destinado a estabelecer especificações para preparações farmacêuticas, este atua no desenvolvimento de normas, guias e diretrizes para promover a garantia da qualidade e controle de qualidade na área de medicamentos (WHO, 2007).

A OMS em conjunto com a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (*Food and Agriculture Organization*, FAO) desenvolveu, em 1962, o Codex Alimentarius, um fórum internacional de normalização sobre alimentos. As normas criadas englobam uma série de regras, gerais e específicas, que têm como finalidade proteger a saúde da população, assegurando práticas justas no comércio regional e internacional de alimentos (Inmetro, 2011c).

Quadro 1: Publicações do Codex Alimentarius

Ano	Publicação
1979	CAC/GL 10 <i>Advisory lists of nutrient compounds for use in foods for special dietary uses intended for infants and young children</i>
2004	CAC/GL 54 <i>Guidelines on measurement uncertainty</i>
2005	CAC/GL 55 <i>Guidelines for vitamin and mineral food supplements.</i>
2006	CAC/GL 59 <i>Guidelines on estimation of uncertainty of results</i>

A Organização Pan-Americana da Saúde é um organismo internacional de saúde pública, dedicada a melhorar as condições de saúde dos países das Américas. Atua como escritório regional da Organização Mundial da Saúde para as Américas. A OPAS/OMS também faz parte dos sistemas da Organização dos Estados Americanos (OEA) e da Organização das Nações Unidas (ONU) (OPAS, 2011).

4.1.1.5. IUPAC

A União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC) é uma organização internacional, não governamental, formada em 1919, composta por representantes das sociedades nacionais de química dos países membros. É reconhecida como a autoridade mundial em nomenclatura química, terminologia e métodos padronizados para medição e pesos atômicos (IUPAC, 2011a).

A IUPAC possui uma série de comitês e comissões que atuam em diversas áreas relacionadas com a química. A seguir apresenta-se alguns documentos relacionados ao tema do presente trabalho (IUPAC, 2011b).

- IUPAC Recomendações 2003: *Terminology for analytical capillary electromigration techniques.*
- IUPAC Relatório Técnico 2002: *Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis.*

4.1.1.6. IFCC

A Federação Internacional de Química Clínica e Medicina Laboratorial (IFCC - *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*) é uma organização mundial de química clínica e medicina laboratorial. Tem várias funções, entre as quais a definição de normas globais em colaboração com outras organizações internacionais, apoiar seus membros por meio de auxílio científico e educacional e organizar congressos, conferências e reuniões com a participação de especialistas em medicina laboratorial, de modo a apresentar pesquisas originais e melhores práticas (IFCC, 2011).

A IFCC possui diversos comitês e grupos de trabalho. Entre os quais pode-se citar o comitê para a Rastreabilidade em Medicina Laboratorial e o comitê para Nomenclatura, Propriedades e Unidades em colaboração com a União Internacional da Química Pura e Aplicada (IUPAC). Participa junto com outras organizações na elaboração do GUM e VIM (IFCC, 2011).

4.1.1.7. CITAC

A CITAC - Cooperação Internacional sobre Rastreabilidade em Química Analítica (*Cooperation on International Traceability in Analytical Chemistry*), criada em 1993, tem o objetivo de melhorar a rastreabilidade dos resultados das medições químicas em todo o mundo, além de garantir que as medições analíticas realizadas em diferentes países e/ou diferentes momentos sejam comparáveis. Atua em conjunto com outras organizações como o EURACHEM, na publicação de guias e procedimentos (CITAC, 2011).

4.1.1.8. ISO e IEC

A *International Organization for Standardization* (ISO) é uma entidade internacional de normalização, organizada por comitês técnicos, os *Technical Committees* - TC. Formada pelos institutos nacionais de normalização de 162 países, possui uma secretaria central que coordena o sistema. Forma uma ponte entre os setores público e privados, já que muitos dos seus institutos membros fazem parte da estrutura governamental de seus países, ou são controlados por seu governo e outros membros têm suas raízes exclusivamente no setor privado,

tendo sido criada por parcerias nacionais das associações da indústria (ISO, 2011).

Entre os comitês técnicos da ISO relacionados ao tema do presente trabalho, pode-se citar:

- ISO/TC34 para Produtos Alimentícios: Normalização no campo da alimentação humana e animal, em particular de amostragem, terminologia, métodos de ensaio e análise, especificações do produto e requisitos para embalagem, armazenamento e transporte.
- └ SC 5: ISO 17129:2006 (IDF 206: 2006) *Milk powder -- Determination of soy and pea proteins using capillary electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-CE) - Screening method.*
- ISO/TC 47 Química: abrange a indústria química em geral, inclui produtos químicos básicos e que não foram abrangidos por qualquer das outras comissões técnicas.
- ISO/TC 48 Equipamentos para laboratório: normalização na área de equipamentos para laboratórios envolvidos na química, trabalho físico e biológico.
- ISO/TC 146 Gestão da Qualidade e Garantia da Qualidade: tem como objetivos melhorar a compatibilidade das normas do sistema de gestão, melhorar processos internos e assegurar a relevância dos seus produtos para o mercado.
- ISO/TC 212 Testes de laboratório clínico e em sistemas de ensaio de diagnóstico in vitro: atua na normalização e orientação no campo da medicina laboratorial e em sistemas de ensaio de diagnóstico in vitro. A atuação do subcomitê inclui gestão da qualidade, procedimentos pré e pós-analíticos, desempenho analítico, segurança do laboratório, sistemas de referência e garantia de qualidade.
- └ ISO 17593:2007 *Clinical laboratory testing and in vitro medical devices -- Requirements for in vitro monitoring systems for self-testing of oral anticoagulant therapy.*
- ISO/TC 69 Uso de testes estatísticos: Padronização na aplicação de métodos estatísticos, incluindo a obtenção (planejamento e projeto), análise, apresentação e interpretação dos dados.
- └ ISO 21748:2010. *Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation.*
- └ ISO 5725-1:1994. *Accuracy (trueness and precision) of Measurement Methods and Results - Part 1: General principles and definitions.*

└ ISO 5725-2:1994(1998). *Accuracy (trueness and precision) of Measurement Methods and Results - Part 2: Basic method for the Determination of Repeatability and Reproducibility of a Standard Measurement Method.*

└ ISO 5725-3:1994(2001). *Accuracy (trueness and precision) of Measurement Methods and Results - Part 3: Intermediate Measures of Precision of a Standard Measurement Method.*

└ ISO 5725-4:1994. *Accuracy (trueness and precision) of Measurement Methods and Results - Part 4: Basic Methods for the Determination of the Trueness of a Standard Measurement method.*

└ ISO 5725-5:1998. *Accuracy (trueness and precision) of Measurement Methods and Results -- Part 5: Alternative methods for the determination of the precision of a standard measurement method.*

└ ISO 5725-6:1994(2001). *Accuracy (trueness and precision) of Measurement Methods and Results - Part 6: Use in Practice of Accuracy Values.*

A *International Electrotechnical Commission (IEC)*, por sua vez, é uma organização internacional, fundada em 1906, que atua na elaboração e publicação de normas internacionais relacionadas a tecnologias elétricas, eletrônicas e afins. Atua em conjunto com a ISO de modo a garantir a uniformidade e complementação das normas internacionais (IEC, 2011).

A norma ISO/IEC 17025 - Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração - é uma publicação conjunta da ISO e IEC, que estabelece os critérios para laboratórios que desejam demonstrar sua competência técnica, que possuem um sistema da qualidade efetivo e que são capazes de produzir resultados tecnicamente válidos.

4.1.2.

Contexto Regional

4.1.2.1.

Comunidade Européia

A Comunidade Européia (CE), que resultou da fusão da Comunidade Econômica Européia (CEE), Comunidade Européia do Carvão e do Aço (CECA) e da Comunidade Européia de Energia Atômica (Euratom), dentre outras atribuições elabora regulamentos que, vigentes nos países europeus, harmonizam as legislações nacionais (Wehmer & Frota, 2012).

Com relação à vitamina K pode-se destacar:

- Regulamento (CE) n° 1170 de 2009 da Comissão das Comunidades Europeias, que estabelece a lista de vitaminas, minerais e respectivas formas em que podem ser adicionados aos alimentos, incluindo suplementos vitamínicos.
- Regulamento (CE) n° 953 de 2009, que trata das substâncias que podem ser adicionadas, para fins nutricionais específicos, aos gêneros alimentícios destinados a uma alimentação especial.

Segundo os regulamentos destacados, a forma de vitamina K que pode ser adicionada a alimentos ou estar presente em suplementos vitamínicos é a filoquinona e menaquinona (essencialmente sob a forma de menaquinona-7 e, em menor grau, menaquinona-6). No entanto, observa-se que a forma predominante de vitamina K presente em suplementos vitamínicos e alimentos enriquecidos é a filoquinona (Jornal Oficial da União Europeia, 2009).

Como já mencionado nos Capítulos 1 e 2, a Diretiva 2009/6/EC da Comunidade Europeia incorporou a vitamina K à lista de substâncias que não devem estar presentes na composição de produtos cosméticos devido a relatos de casos de dermatite de contato alérgico no local de aplicação da vitamina (European Commission, 2009).

4.1.2.2. EURACHEM

A Eurachem é uma rede de organizações da Europa criada em 1989 que têm como objetivo estabelecer um sistema para a rastreabilidade internacional das medições químicas e a promoção de práticas de boa qualidade na Europa (EURACHEM, 2011).

As atividades da Eurachem são realizadas por grupos de trabalho, os quais produzem orientações técnicas. Atualmente existem seis grupos de trabalho:

- Educação e Formação;
- Incerteza de medição e rastreabilidade;
- Testes de proficiência;
- EA/Eurolab/Eurachem (EEE) teste de proficiência;
- Análise Qualitativa;
- Incerteza da amostragem.

Os grupos de trabalho desenvolvem, em colaboração com outras organizações, guias sobre questões de qualidade e acreditação na medição

analítica (EURACHEM, 2011). A Eurachem participa também do Comitê Técnico da EURAMET de Metrologia em Química. Dentre os guias publicados, pode-se citar alguns como no Quadro 2.

Quadro 2: Publicações EURACHEM.

Ano	Publicação
1998	EURACHEM Guide <i>The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and related Topics</i>
2000	EURACHEM / CITAC Guide CG 4 <i>Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement</i>
2003	EURACHEM / CITAC Guide <i>Traceability in Chemical Measurement</i>
2011	EURACHEM <i>Terminology in Analytical Measurement</i>

4.1.3. Contexto Nacional

4.1.3.1 Inmetro

O Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro) foi criado em 1973 e atua como Secretaria Executiva do Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (CONMETRO), órgão normativo do Sistema Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (SINMETRO) (Inmetro, 2011c).

O Inmetro tem como missão prover confiança à sociedade brasileira nas medições e nos produtos, através da metrologia e da avaliação da conformidade, promovendo a harmonização das relações de consumo, a inovação e a competitividade do País (Inmetro, 2011c).

Dentre as competências e atribuições do Inmetro pode-se destacar (Inmetro, 2011c):

- Execução de políticas nacionais de metrologia e da qualidade;
- Verificação da observância das normas técnicas e legais, no que se refere às unidades de medida, métodos de medição, medidas materializadas, instrumentos de medição e produtos pré-medidos;
- Manter e conservar os padrões das unidades de medida;
- Fortalecer a participação do País nas atividades internacionais relacionadas com metrologia e qualidade, além de promover o intercâmbio com entidades e organismos estrangeiros e internacionais.

A Divisão de Metrologia Química do Inmetro foi criada em junho de 2000, em função do reconhecimento da importância desta área para a competitividade dos produtos e serviços brasileiros. A mesma atua com os seguintes laboratórios:

- Núcleo de Laboratório de Eletroquímica – Label;
- Laboratório de Análise Orgânica – Labor;
- Setor de Laboratório de Análise Inorgânica – Labin;
- Laboratório de Análise de Gases - Labag;
- Setor de Laboratório de Motores e Combustíveis – Lamoc.

Entre as principais competências da Divisão de Metrologia Química pode-se citar:

- Implantação de métodos primários e técnicas de alto valor metrológico para medições das diversas espécies químicas;
- Desenvolvimento, produção e certificação de materiais de referência para medição das citadas espécies;
- Prestação de serviços de calibração e ensaios em áreas que não houver laboratórios capacitados;
- Participação em comitês técnicos nacionais e internacionais.

Em 2002 o Inmetro publicou e desde então vem atualizando um documento de caráter orientativo sobre a validação de métodos analíticos (DOQ-CGCRE-008) com objetivo de auxiliar os laboratórios na tarefa de demonstrar que um método analítico, nas condições em que é praticado, tem as características necessárias para a obtenção de resultados com a qualidade exigida (Quadro 3).

Quadro 3: Evolução das revisões do documento orientativo publicado pelo Inmetro sobre a validação de métodos analíticos (DOQ-CGCRE-008).

DOQ-CGCRE-008 Revisão:00 Outubro 2002	Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos
DOQ-CGCRE-008 Revisão 01 Março 2003	Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos
DOQ-CGCRE-008 Revisão 02 Junho 2007	Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos
DOQ-CGCRE-008 Revisão 03 Fevereiro 2010	Orientação sobre validação de métodos analíticos
DOQ-CGCRE-008 Revisão 04 Julho 2011	Orientação sobre validação de métodos analíticos

O Inmetro atua também na coordenação do Comitê do Codex Alimentarius do Brasil (CCAB), o qual tem como principal atividade a participação e a defesa dos interesses nacionais nos comitês internacionais do Codex Alimentarius. Tem ainda, a responsabilidade de observar as normas Codex como referência para a elaboração e atualização da legislação e regulamentação nacional de alimentos. Participam do CCAB representantes de 14 instituições entre elas, órgãos do governo, de indústrias de alimentos e de defesa do consumidor (Anvisa, 2011a).

4.1.3.2. Anvisa

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) foi criada em 1999, com objetivo de promover a proteção da saúde da população por intermédio do controle sanitário da produção e da comercialização de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária, inclusive dos ambientes, dos processos, dos insumos e das tecnologias a eles relacionados (Anvisa, 2011b).

Na área de alimentos, a Anvisa tem como função coordenar, supervisionar e controlar as atividades de registro, informações, inspeção, controle de riscos e estabelecimento de documentos regulatórios de modo a garantir as ações de vigilância sanitária de alimentos, bebidas, águas envasadas, seus insumos, suas embalagens, aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia, limites de contaminantes e resíduos de medicamentos veterinários (Anvisa, 2011b).

Na área de medicamentos, a Anvisa é responsável pelo registro destes, autorização de funcionamento dos laboratórios farmacêuticos e demais

empresas da cadeia farmacêutica, e pela regulação de ensaios clínicos e de preços, por meio da Câmara de Regulação do Mercado de Medicamentos (CMED). Juntamente com os estados e municípios realiza a inspeção de fabricantes e o controle de qualidade dos medicamentos, através da vigilância pós-comercialização, das ações de farmacovigilância e da regulação da promoção de medicamentos.

Na área de cosméticos a Anvisa fiscaliza e estabelece normas para as empresas fabricantes, verificando o processo de produção, as técnicas e os métodos empregados até o consumo final. No Quadro 4 se encontra listada uma seleção de publicações relacionadas à vigilância sanitária na área de alimentos, medicamentos, cosméticos e de laboratório. Alguns dos documentos citados foram publicados em 1998 pelo Ministério da Saúde, antes da criação da Anvisa.

Quadro 4: Algumas publicações relacionadas à vigilância sanitária na área de alimentos, medicamentos, cosméticos e de laboratório.

Ano	Publicação
1998	Portaria SVS/MS nº 32: Regulamento Técnico para Suplementos Vitamínicos e ou de Minerais
1998	Portaria SVS/MS nº 40: Regulamento que estabelece normas para Níveis de Dosagens Diárias de Vitaminas e Minerais em Medicamentos
2003	Resolução RDC nº 210: Regulamento técnico das boas práticas para a fabricação de medicamento
2003	RDC nº 360: Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados
2003	Resolução RE nº 899: Guia para a Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos
2005	RDC nº 269: Regulamento Técnico sobre ingestão diária recomendada (IDR) para proteína, vitaminas e minerais
2005	Resolução - RDC nº 302: Dispõe sobre Regulamento Técnico para funcionamento de Laboratórios Clínicos
2010	Parecer Técnico nº 1: Proibição do uso de vitamina K em cosméticos

A portaria nº 32 de 13 de janeiro de 1998, fixou a identidade e as características mínimas de qualidade a que devem obedecer os suplementos vitamínicos e ou minerais. Estes devem conter um mínimo de 25% e no máximo até 100% da Ingestão Diária Recomendada (IDR) de vitaminas, na porção indicada pelo fabricante, não podendo substituir os alimentos, nem serem considerados como dieta exclusiva.

Na área de validação de métodos analíticos, a mesma tornou-se uma das exigências das Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos por meio da Resolução RDC nº 210 de 2003. No mesmo ano a Anvisa publicou a Resolução

nº 899 de 29 de maio de 2003, um Guia para a Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos contendo as características a serem consideradas durante a validação de procedimentos analíticos.

Com base em estudos realizados e na inclusão da vitamina K à lista de substâncias que não devem estar presentes na composição de produtos cosméticos pela Comunidade Européia (*Commission Directive 2009/6/EC, of 4 february 2009*), a Anvisa proibiu o uso de vitamina K em todas as suas formas em produtos cosméticos, por meio do Parecer Técnico nº 1 da Câmara Técnica de Cosméticos (CATEC), publicado em 4 de janeiro de 2010.

4.1.3.3. ABNT

A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) foi fundada em 1940, sendo responsável pela normalização técnica no país, e assim fornecer a base necessária ao desenvolvimento tecnológico brasileiro. É membro fundador da ISO (*International Organization for Standardization*), da COPANT (Comissão Panamericana de Normas Técnicas) e da AMN (Associação Mercosul de Normalização). A ABNT é a representante oficial no Brasil das seguintes entidades internacionais: ISO (*International Organization for Standardization*), IEC (*International Electrotechnical Commission*); e das entidades de normalização regional COPANT e a AMN (ABNT, 2011a).

Na ABNT o comitê responsável pela normalização na área Química é o CB-10, denominado Comitê Brasileiro de Química. Atua na normalização no campo da química compreendendo produtos químicos orgânicos, produtos e preparados químicos diversos, no que concerne a terminologia, requisitos, métodos de ensaio e generalidades (ABNT, 2011a).

O comitê responsável pela normalização no campo de gestão da qualidade, compreendendo sistemas da qualidade, garantia da qualidade e tecnologias de suporte é o CB-25, este estabelece diretrizes para seleção e aplicação das normas da qualidade, elabora guias e normas relativas a práticas de ensaio, inspeção e certificação de produtos, processos e serviços e para avaliação de sistemas de gestão, laboratório de ensaio, organismos de inspeção, certificação e credenciamento, e sua operação e aceitação. Excluindo-se a normalização de produtos e serviços. Dentro deste contexto pode-se citar a norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 que estabelece os requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração, indicando a validação de

métodos e a estimativa da incerteza de medição dentre os requisitos técnicos importantes na qualidade assegurada dos laboratórios de ensaio, bem como a documentação do trabalho de validação (ABNT, 2011a).

4.2.

Validação de Método Analítico e Incerteza de Medição

A análise dos documentos regulatórios e guias para a garantia da confiabilidade metrológica em medições analíticas deixa evidente a importância da validação dos métodos e o estabelecimento da incerteza de medição. Tais ferramentas da metrologia são descritas a seguir nos itens 4.2.1 e 4.2.2.

De acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 tanto o procedimento de validação deve ser realizado, quanto a incerteza associada a cada resultado analítico deve ser estimada. Da mesma forma, em laboratórios de análise de alimentos, para fins do Codex Alimentarius, é necessário que os métodos de análise sejam colaborativamente testados e validados, antes de serem utilizados em procedimentos de rotina (CODEX ALIMENTARIUS, 2004).

4.2.1.

Validação de método analítico

De acordo com o Vocabulário Internacional de Metrologia a Validação pode ser definida como uma verificação na qual os requisitos especificados são adequados para um uso pretendido (JCGM 200:2012). A avaliação dos parâmetros de validação possibilita a determinação das características de desempenho de um método analítico (Inmetro, 2011a).

Os métodos que devem ser validados são: métodos não normalizados; métodos criados/desenvolvidos pelo próprio laboratório; métodos normalizados usados fora dos escopos para os quais foram concebidos; métodos normalizados que sofreram ampliações e modificações (Inmetro, 2011d). Tanto a Anvisa quanto o Inmetro publicaram guias para a validação de métodos analíticos (Resolução Anvisa RE nº 899, de 29/05/2003, e o documento Inmetro DOQ-CGCRE-008, de 07/2011). Há também procedimentos de validação que são estabelecidos por órgãos internacionais como a Organização Internacional para a Padronização (ISO 5725, 1994), União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC - *Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis*, 2002) e Conferência Internacional de Harmonização (ICH - Q2(R1) *Validation of analytical procedures: text and methodology*, 1994). Estes

documentos têm como objetivo auxiliar laboratórios na demonstração que um determinado método atende as características necessárias de modo a obter resultados com a qualidade requerida.

O Quadro 5 apresenta os parâmetros de validação exigidos pelos órgãos nacionais Inmetro e Anvisa (Inmetro, 2011a; Anvisa, 2003a). Breve descrição dos parâmetros é apresentada nos próximos itens (4.2.1.1 a 4.2.1.8).

Quadro 5: Parâmetros de validação indicados nos documentos da Anvisa (Resolução RE nº 899, de 29/05/2003) e do Inmetro (DOQ-CGCRE-008, de 07/2011).

Inmetro	Anvisa
Seletividade	Especificidade e Seletividade
Linearidade	Linearidade
Faixa de trabalho e faixa linear	Intervalo
Precisão	Precisão
Repetitividade	Repetitividade (precisão intra-corrída)
Precisão intermediária	Precisão intermediária (precisão inter-corrída)
Reprodutibilidade	Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial)
Limite de detecção	Limite de detecção (sensibilidade)
Limite de quantificação	Limite de quantificação
Tendência/Recuperação	Exatidão
Robustez	Robustez

4.2.1.1. Seletividade e Especificidade

A seletividade pode ser definida como a capacidade que o método possui de medir um determinado composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz também chamados interferentes (Anvisa, 2003). A presença de interferentes pode aumentar ou reduzir o sinal do analito a ser determinado, sendo a magnitude do efeito dependente também da concentração (Inmetro, 2011a).

A seletividade pode ser avaliada de diversas formas, através da análise da pureza do sinal, análise de amostra de referência, comparação dos resultados obtidos em diferentes condições de medição, comparação dos resultados obtidos por diferentes métodos de análise, análise da amostra sem a presença do analito de interesse, análise por método de adição de padrão e comparação

da inclinação da reta obtida com a inclinação da curva de padrões (Eurachem, 1998; Inmetro, 2011a).

4.2.1.2. Linearidade

A linearidade pode ser definida como a habilidade do método em estudo gerar resultados proporcionais a concentração do analito na amostra (Eurachem, 1998). Pode ser representada pela equação da reta (Equação 10):

$$y = a + bx \quad (10)$$

onde,

y = resposta medida (absorvância, altura ou área do pico, etc.);

x = concentração;

a = interseção com o eixo y, quando x = 0;

b = inclinação da curva analítica = sensibilidade.

A determinação da linearidade deve ser feita a partir da construção de uma curva analítica com no mínimo cinco níveis de concentração, sendo três o número mínimo de replicatas. O coeficiente de correlação linear (r) pode ser utilizado nesta avaliação, sendo o valor mínimo aceitável igual a 0,99 (Inmetro, 2011a; Anvisa, 2003a; ICH, 2005).

4.2.1.3. Faixa de trabalho e faixa linear

A faixa de trabalho pode ser definida como a faixa de concentrações do analito ou valores da propriedade na qual o método pode ser aplicado, cujo limite inferior é o valor do limite de quantificação e o limite superior depende das características do equipamento de medição. É derivado do estudo da linearidade e depende da aplicação pretendida do método (Inmetro, 2011a; Anvisa, 2003a).

Já a faixa linear, contida na faixa de trabalho, é a faixa na qual o método apresenta linearidade (Inmetro, 2011a).

A determinação da faixa de trabalho pode ser feita através de três etapas. Na primeira etapa analisa-se um branco de reagentes com adições de concentrações variadas do analito ou branco da amostra com adições de concentrações variadas do analito ou ainda amostras de referência em diferentes níveis de concentração. A partir dos resultados obtidos constrói-se um gráfico de concentração x resposta, identificando-se inicialmente a faixa linear e

os limites de detecção e quantificação. Na segunda etapa deve ser realizada análise do branco da amostra com adições variadas do analito na faixa linear, com objetivo de confirmar a linearidade. A terceira etapa consiste na determinação dos limites de detecção e quantificação através da análise da amostra com adições variadas do analito próximas ao limite de detecção (Inmetro, 2011a).

4.2.1.4. Limite de detecção

O limite de detecção (LOD) pode ser definido como sendo o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método, porém não necessariamente quantificado (Inmetro, 2011a; Anvisa, 2003a).

A determinação do limite de detecção é realizada por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável. É obtido a partir da análise do branco da amostra ou do branco da amostra adicionado da menor concentração aceitável do analito. O DOQ-CGCRE-008 do Inmetro recomenda a realização de no mínimo sete replicatas para a determinação do LOD. Assim, o LOD pode ser dado pela média dos valores do branco da amostra mais três vezes o desvio padrão dos resultados obtidos (Inmetro, 2011a; Anvisa, 2003a; Eurachem, 1998).

4.2.1.5. Limite de quantificação

De acordo com definição da Anvisa (2003a) o limite de quantificação (LOQ) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais especificadas. É normalmente o menor ponto na curva de calibração.

Assim como no limite de detecção a determinação do LOQ pode ser realizada através dos dados dos desvios padrões obtidos nas análises do branco da amostra ou do branco da amostra adicionado de concentrações variadas do analito próximas ao LOD. No entanto, enquanto que para o cálculo do LOD o fator de multiplicação é 3, para o cálculo de LOQ este fator deve ser alterado para 5, 6 ou 10 de acordo com a incerteza desejada (Inmetro, 2011a).

4.2.1.6. Tendência/Recuperação

Segundo o DOQ-CGCRE 008, exatidão de um método analítico é avaliada numericamente através da tendência, a qual pode ser avaliada utilizando-se os seguintes processos: uso de materiais de referência certificados (MRC), participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação (Inmetro, 2011a).

Sempre que possível, deve-se utilizar MRC na validação de um método de ensaio. Logo para avaliar a exatidão compara-se os resultados obtidos pelo laboratório da amostra padrão com os valores certificados do material de referência, fornecidos por laboratório acreditado (ABNT, 2000; Inmetro, 2011d, JCGM 200:2012).

A ABNT NBR ISO/IEC 17043:2011 faz distinção entre o uso de comparações interlaboratoriais, que podem ser utilizadas não só para ensaios de proficiência para a determinação do desempenho do laboratório, mas também para estabelecer a eficácia e a comparabilidade de novos métodos de ensaio ou de medição, acompanhar métodos estabelecidos e determinar as características de desempenho de um método (Silva & Alves 2006, ABNT, 2011b).

O percentual de recuperação do analito pode ser definido como a relação entre o resultado experimental obtido depois da análise de uma amostra fortificada com uma quantidade conhecida do analito, e o valor teórico desta quantidade fortificada. Segundo o DOC-CGCRE-008, para a avaliação da recuperação, pode-se utilizar amostras fortificadas com quantidades conhecidas do analito (*spike*) em três níveis de concentração: baixo, médio e alto, de acordo com a faixa de trabalho do método (Inmetro, 2011a).

4.2.1.6.1. Precisão

Segundo o VIM 2012, precisão de medição é definida como sendo o grau de concordância entre indicações ou valores medidos, obtidos por medições repetidas, no mesmo objeto ou em objetos similares, sob condições especificadas (JCGM 200:2012).

Pode ser expressa pelo desvio padrão ou coeficiente de variação, sendo considerada em três níveis: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade (Inmetro, 2011a; Eurachem, 1998).

4.2.1.6.1.1. Repetitividade

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições de um mesmo método, dentro de um curto período de tempo, efetuadas sob as mesmas condições de medição, as quais incluem: mesmo procedimento de medição, mesmo analista, mesmo instrumento utilizado sob as mesmas condições e mesmo local (Ribani *et al.*, 2004; Inmetro, 2011a).

4.2.1.6.1.2. Precisão intermediária

A precisão intermediária pode ser definida como a concordância entre os resultados obtidos em um mesmo laboratório, utilizando o mesmo método, a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões porém definindo-se exatamente as condições a variar como: dias diferentes, analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Representa a variabilidade dos resultados em um laboratório (Inmetro, 2011a; Ribani *et al.*, 2004).

4.2.1.6.1.3. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade representa o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas de medição (mudança de operador, local, equipamentos, etc.) (JCGM 200:2012). Não é um componente de validação de método executado por um único laboratório, sendo utilizada para verificação do desempenho dos métodos de um laboratório em relação aos dados de validação obtidos por meio de comparação interlaboratorial (Inmetro, 2011a).

4.2.1.6.1.4. Comparação da precisão entre métodos

A comparação da precisão entre métodos possibilita verificar o grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos dois métodos, e é realizada por meio de análises sobre a mesma amostra em separado, utilizando o método desenvolvido e o método de referência (Inmetro, 2011a; Ribani *et al.*, 2004).

4.2.1.6.2. Robustez

A robustez pode ser definida como a sensibilidade do método, ou seja, sua capacidade de não ser afetado por pequenas e deliberadas modificações em seus parâmetros analíticos. Tem como objetivo avaliar as potenciais fontes de variação do método (Eurachem, 1998, Inmetro, 2011a).

4.2.2. Incerteza de Medição

De acordo com o VIM (2012) o termo incerteza de medição é definido como o parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas. O conhecimento da incerteza é importante já que o mesmo implica em uma maior validade dos resultados de uma medição (Eurachem, 2002; JCGM 200:2012).

De acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 os laboratórios devem avaliar a incerteza de suas medições, além de divulgar a incerteza de medição em circunstâncias específicas, quando as mesmas forem relevantes para interpretação do resultado do ensaio.

O cálculo da incerteza pode ser feito a partir dos dados obtidos na validação do método analítico, já que estes englobam várias fontes de incerteza. Deste modo, é possível estimar a variação do resultado obtido em uma determinada faixa de trabalho (Souza *et al.*, 2007).

Observam-se na prática várias fontes que contribuem para a incerteza em uma medição, entre as quais: a definição incompleta de um mensurando, amostragem não representativa, homogeneidade da amostra, estabilidade da solução, pesagem, efeitos de matriz e interferências, equipamentos volumétricos erro de tendência pessoal na leitura de instrumentos analógicos, resolução finita do instrumento, entre outros (Inmetro, 2003; Eurachem, 2002).

A incerteza de um resultado de medição normalmente contém muitos componentes, os quais podem ser agrupados, de acordo com seu método de avaliação, em duas categorias: incertezas tipo A e incertezas tipo B (JCGM 200:2012; JCGM 100:2008; Mendes & Rosário, 2005).

As etapas necessárias para o cálculo da incerteza de medição segundo o ISO GUM são:

(i) Especificação do mensurando: definir a relação entre o mensurando e as variáveis utilizadas em sua determinação, através da equação:

$$y = f(X_1, X_2, \dots, X_n)$$

(ii) Identificação das fontes de incerteza: identificar todas as fontes de incerteza possíveis para cada variável utilizada. Para isso pode ser feita a utilização do diagrama de causa e efeito;

(iii) Definição das incertezas das grandezas de entrada (Incertezas Padrão) – definir os tipos de incertezas A e B, do seguinte modo:

- Incerteza tipo A: o método de avaliação consiste na análise estatística de uma série de observações e a incerteza pode ser caracterizada por desvios padrões experimentais (JCGM 200:2012; JCGM 100:2008). Logo, a dispersão em torno do valor médio pode ser expressa pela Equação 11 (Inmetro, 2003; Mendes & Rosário, 2005):

$$u_{x_i} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (11)$$

Sendo u_{x_i} a incerteza padrão da estimativa do valor médio, s o desvio padrão calculado e \sqrt{n} a raiz quadrada do número de replicatas (n). Como geralmente o número de replicatas é reduzido, utiliza-se o coeficiente *t-Student* que leva em conta o fato de a amostragem ser pequena e permite a estimação da incerteza tipo A, mesmo para baixos valores de n (Inmetro, 2003; Mendes & Rosário, 2005).

Assim para um determinado nível de confiança, a incerteza de medição tipo A (u_A) é dada pela Equação 12:

$$u_A = t \cdot \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (12)$$

- Incerteza tipo B: é obtida por outros meios que não a análise estatística de uma série de observações. Pode ser caracterizada por desvios padrões estimados por distribuições de probabilidades assumidas, baseadas na experiência ou são determinadas a partir de informações acessórias e externas ao processo de medição. Este conjunto de informações inclui: dados do fabricante, dados fornecidos em certificados de calibração e outros certificados, incertezas atribuídas a dados de referência extraídos de manuais etc. (Inmetro, 2003; Mendes & Rosário, 2005).

Pode-se citar como exemplo de incerteza tipo B a extraída de um certificado de calibração, dada pela Equação 13.

$$u_B = \frac{U_{(declarada)}}{k} \quad (13)$$

Onde u_B é a incerteza padrão do tipo B, $U_{declarada}$ é a incerteza expandida obtida a partir do certificado e k é o fator de abrangência, que depende do nível de confiança.

Tanto na incerteza tipo A quanto tipo B, a incerteza padrão é a incerteza de uma medição expressa como um desvio padrão, devendo-se expressar todas as componentes de incerteza correspondentes a um desvio padrão. No entanto na incerteza tipo B assumindo que cada grandeza de entrada (resultado) tem uma distribuição e um intervalo de confiança, a incerteza deve ser calculada com base nas distribuições de probabilidade (normal, retangular, triangular) correspondente a um nível de confiança declarado. A Tabela 4 apresenta os divisores para algumas distribuições de probabilidade (Mendes & Rosário, 2005).

Tabela 4: Divisores para algumas distribuições de probabilidade

Distribuição	Divisor
Normal (Certificado de calibração)	k (~2)
Retangular	$\sqrt{3}$
Triangular	$\sqrt{6}$

(iv) Cálculo da incerteza padrão combinada: expressar todas as incertezas quantificadas em termos de desvio padrão e combiná-las segundo as regras de operação de variâncias.

Os efeitos aleatórios de cada fonte de incerteza devem ser considerados para compor a chamada incerteza padrão combinada. Para que a estimativa da incerteza padrão combinada seja efetuada de forma correta, assume-se a independência entre essas fontes de modo a se usar a forma mais simples da lei da propagação da incerteza (soma quadrática das contribuições) como indicado na Equação 14.

$$u_c(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial y}{\partial x_i} \right)^2 u^2(x_i)} \quad (14)$$

onde: $u_c(y)$ é a incerteza padrão combinada; $\partial y / \partial x_i$ é o coeficiente de sensibilidade de cada fonte (coeficientes estes utilizados para transformar grandezas de entrada em incertezas, uniformizando as unidades das grandezas de entrada de modo a permitir que estas possam ser combinadas ao final do processo) e cada $u(x_i)$ é a incerteza padrão associada a cada uma das fontes.

(v) Avaliação dos graus de liberdade efetivos (v_{eff}): utilizando a distribuição “t-Student”.

Quando as incertezas padrão de várias fontes de incertezas são consideradas para estimar a incerteza padrão combinada, o número de graus de liberdade resultante da incerteza combinada deve ser estimado a partir de informações da cada fonte de incerteza. Logo o número de graus de liberdade efetivo é o número de graus de liberdade associado à incerteza padrão combinada. Este é obtido a partir da equação de Welch-Satterthwaite (Equação 15) (Mendes & Rosário, 2005):

$$v_{eff} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^N \frac{u_i^4(y)}{v_i}} \quad (15)$$

onde v_{eff} é o número de graus de liberdade efetivo associado à incerteza padrão combinada, u_c é a incerteza combinada, u_i é a incerteza padrão associada à i -ésima fonte de incerteza, v_i é o nº de graus de liberdade associado à i -ésima fonte de incerteza, N é o nº total de fontes de incertezas analisadas.

(vi) Determinação da incerteza expandida, a partir da multiplicação da incerteza padrão combinada $u_c(y)$ por um fator de abrangência k , conforme a Equação 16:

$$U = k_{v,p} u_c(y) \quad (16)$$

O fator de abrangência k deve ser sempre declarado. Quando se tem um número elevado de medições utiliza-se como regra geral $k=2$ para expressar a incerteza expandida, deste modo a incerteza expandida corresponde a uma probabilidade de abrangência de 95,45%, por se tratar de caráter amostral. O fator “ k ” se relaciona diretamente com o grau de probabilidade de acerto do cálculo da incerteza. O valor do fator de abrangência k deve levar em conta, além do nível de confiança desejado, o número de graus de liberdade efetivos associados ao caso para o intervalo $y-U$ a $y+U$. Em geral o valor de k se encontra entre 2 e 3, porém em aplicações especiais pode assumir outros valores. A Tabela 5 relaciona o fator de abrangência k a um nível de confiança, assumindo-se uma distribuição normal (Mendes & Rosário, 2005; JCGM 100:2008).

Tabela 5: Relação entre o nível de confiança e o fator de abrangência em uma distribuição normal.

Nível de confiança (%)	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

Então, o resultado de uma medição pode ser expresso conforme Equação 17:

$$Y = y \pm U \quad (17)$$

Este resultado pode ser interpretado como a melhor estimativa do valor atribuível ao mensurando Y é y , e que $y - U$ a $y + U$ é o intervalo com o qual se espera abranger uma extensa fração da distribuição de valores que podem ser razoavelmente atribuídos a Y (JCGM 100:2008). Este intervalo pode ser expresso como $y - U \leq Y \leq y + U$.