

Ensaio de Proficiência em Produtos Sujeitos ao Regime de Vigilância Sanitária (EP/INCQS)

REVISÃO 1

Ensaio de Proficiência para Determinação de Micotoxinas em Alimentos 6ª Rodada Aflatoxina em Milho

Rodada EP MIC 06/14



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



INCQS



**Ensaio de Proficiência para Determinação de Micotoxinas 6ª Rodada
Aflatoxinas em Milho**

RELATÓRIO FINAL – REVISÃO 1

ORGANIZAÇÃO E COORDENAÇÃO



Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS

Avenida Brasil, 4365 – Manguinhos

Rio de Janeiro - RJ – Brasil - Cx. Postal 926 - CEP: 21040-900

COMISSÃO ORGANIZADORA DA RODADA

- COMISSÃO DO PROGRAMA DE ENSAIO DE PROFICIÊNCIA

Armi Wanderley da Nóbrega – Coordenador Geral

Marcus Henrique Campino de la Cruz – Coordenador Técnico

Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso – Coordenadora da Qualidade

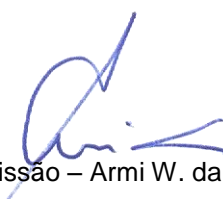
- COMITÊ TÉCNICO

André Victor Sartori

Bianca Medina

Maria Heloisa Paulino de Moraes

Rosana Pereira dos Santos


Autorizada a emissão – Armi W. da Nóbrega
(Coordenador Geral)

SUMÁRIO

1. Introdução.....	3
2. Objetivos.....	4
3. Produção dos Itens de Ensaio	4
3.1. Escolha da Matriz.....	4
3.2. Preparo dos Itens de Ensaio	4
3.3. Homogeneidade e Estabilidade dos Itens de Ensaio.....	4
3.4. Envio dos Itens de Ensaio.....	5
4. Análise dos Resultados.....	5
4.1. Resultados das Medições dos Laboratórios	5
4.2. Estabelecimento dos Valores Designados	5
4.3. Análise Estatística	5
4.3.1. Análise de Resíduos	6
4.3.2. Avaliação da Homogeneidade dos Itens de Ensaio.....	6
4.3.3. Desvio Padrão para Avaliação de Proficiência	6
4.3.4. Índice z.....	7
5. Resultados da Avaliação da Homogeneidade e Estabilidade dos Itens de Ensaio.....	7
5.1. Avaliação da Homogeneidade.....	7
5.2. Avaliação da Estabilidade	8
5.2.1. Estabilidade de Armazenamento.....	8
5.2.2. Estabilidade de Transporte.....	9
6. Atribuição dos Valores de Referência	10
7. Avaliação do Desempenho dos Laboratórios Participantes.....	10
7.1. Laboratórios Participantes.....	10
7.2. Resultados dos Laboratórios Participantes	11
7.3. Considerações Sobre as Metodologias de Análise.....	20
7.3.1. Método e Informações Sobre a Metodologia	20
7.3.2. Recuperação, Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	20
7.3.3. Incerteza	20
7.4. Cálculo do Índice z.....	21
8. Conclusões	37
9. Confidencialidade	38
10. Modificações em Relação a Versão Anterior.....	38
11. Referências Bibliográficas.....	38
12. Laboratórios Participantes.....	39
Anexo A – Metodologia para a Atribuição do Valor de Referência	40
Anexo B – Homogeneidade Segundo a Norma ISO 13528.....	41

1. Introdução

Ensaio de proficiência (EP) é o uso de comparações interlaboratoriais com o objetivo de avaliar a habilidade de um laboratório em realizar um determinado ensaio ou medição de modo competente e demonstrar a confiabilidade dos resultados gerados. Em um contexto geral, o ensaio de proficiência propicia aos laboratórios participantes: avaliação do desempenho e monitoração contínua; evidência de obtenção de resultados confiáveis; identificação de problemas relacionados com a sistemática de ensaios; possibilidade de tomada de ações corretivas e/ou preventivas; avaliação da eficiência de controles internos; determinação das características de desempenho e validação de métodos e tecnologias; padronização das atividades frente ao mercado e reconhecimento de resultados de ensaios, em nível nacional e internacional.

Com a crescente demanda por provas regulares e independentes de competência pelos organismos reguladores e clientes, o ensaio de proficiência é relevante para todos os laboratórios que testam a qualidade de produtos. Além do baixo número de provedores de ensaios de proficiência na área de alimentos, os custos cobrados para a participação nestes ensaios principalmente de provedores internacionais, são normalmente muito elevados, o que inviabiliza, em muitos casos, a participação de um laboratório em um número maior de ensaios.

O consumo de alimentos contaminados por micotoxinas tem sido correlacionado a várias patologias humanas, e as autoridades de saúde no mundo todo tem implementado ações para diminuir a ingestão dessas substâncias pela dieta.

Aflatoxinas são consideradas uma importante classe de micotoxinas. Devido à toxicidade, alto potencial de contaminação e consumo, a presença de aflatoxinas em milho tem sido regulamentada em diversos países. No Brasil, o limite aceitável para o somatório das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 em milho é 20 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Esse fato reflete a importância da utilização de metodologias analíticas confiáveis para determinação de aflatoxinas em milho para assegurar a qualidade das medições.

As investigações sobre a incidência de micotoxinas em alimentos são de suma importância para que esforços possam ser concentrados na prevenção e no controle da contaminação dos produtos susceptíveis a esse tipo de contaminação.

Assim, a realização de programas de ensaio de proficiência no Brasil é fundamental para o aumento da confiabilidade dos resultados das medições realizadas pelos laboratórios, trazendo maior confiabilidade aos resultados emitidos, facilitando o comércio internacional e prevenindo barreiras técnicas.

São apresentados neste relatório os resultados da avaliação de desempenho dos laboratórios participantes no Ensaio de Proficiência para Determinação de Micotoxinas em Alimentos, 6ª Rodada - Aflatoxinas em Milho, seguindo as diretrizes da [ISO/IEC 17043](#).

2. Objetivos

O objetivo deste Ensaio de Proficiência é fornecer aos laboratórios participantes uma ferramenta efetiva para verificar sua competência nos ensaios de rotina. Portanto:

- Os laboratórios participantes devem identificar e quantificar as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 nas amostras de milho utilizando metodologia analítica utilizada na rotina;
- Avaliar o desempenho de laboratórios para o ensaio proposto;
- Propiciar subsídios aos laboratórios para a identificação e solução de problemas.

3. Produção dos Itens de Ensaio

Os procedimentos de preparo dos itens de ensaio e as análises foram realizados no Departamento de Química / Setor de Resíduos e Contaminantes / Laboratório de Resíduos de Micotoxinas do INCQS/FIOCRUZ. A metodologia analítica empregada nos estudos de homogeneidade, estabilidade e atribuição do valor de referência está acreditada nos requisitos da norma [ABNT ISO/IEC 17025](#).

3.1. Escolha da Matriz

O milho é um produto consumido em larga escala pelos brasileiros, utilizado como matéria prima para rações de animais e de grande importância para a balança comercial do país. Todavia, a contaminação com aflatoxinas do milho e outros grãos produzidos, estocados e consumidos em países onde são frequentes elevados índices de temperatura e umidade, é por demais conhecida. Tais fatos motivaram a escolha do ensaio para a determinação de aflatoxinas em milho para a realização deste ensaio de proficiência.

3.2. Preparo dos Itens de Ensaio

Foram preparados dois lotes de milho moído, identificados como Lote A (com concentrações abaixo do limite de detecção da metodologia analítica empregada) e Lote B (com cada aflatoxina na faixa de 1 a 7 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ e somatório inferior a 20 $\mu\text{g.kg}^{-1}$).

3.3. Homogeneidade e Estabilidade dos Itens de Ensaio

Foram separados aleatoriamente dez itens de ensaio, de cada lote A e B, representativos do conjunto preparado para o teste de homogeneidade.

Foram realizados os estudos de estabilidade de curta e de longa duração: o de curta duração foi realizado no modelo isócrono nas temperaturas de 25 e 50°C; e o de longa em modelo misto (clássico e isócrono), na temperatura de armazenamento (4°C). Esta avaliação foi realizada, após o preparo das amostras, no período compreendido entre o envio dos itens de ensaio e o prazo final de recebimento dos resultados pelos laboratórios participantes.

Os testes estatísticos foram feitos segundo a norma [ISO 13528](#) e a [ISO GUIDE 35](#); os resultados obtidos nos testes estão apresentados nos itens [5.1](#) e [5.2](#) deste relatório.

3.4. Envio dos Itens de Ensaio

Para cada laboratório inscrito na *6ª Rodada do Ensaio de Proficiência para Determinação de Micotoxinas em Alimentos – Aflatoxinas em Milho* foram enviados quatro itens de ensaio, dois do lote A e dois do lote B, contendo, cada um, $25 \pm 2\text{g}$ de milho moído.

Os itens de ensaio foram enviados aos participantes em isopor contendo gelo seco, rotulados com as seguintes informações: nome do programa, item a ser ensaiado, código da amostra e rodada em questão.

No documento “*Instruções para Armazenamento e Preparo dos Itens de Ensaio*”, disponibilizado na página da internet do EP, os laboratórios encontravam toda a informação de como deveriam proceder com os itens de ensaio.

4. Análise dos Resultados

4.1. Resultados das Medições dos Laboratórios

Os laboratórios receberam quatro itens de ensaio contendo milho moído e foram orientados a proceder como uma análise de rotina. Além dos resultados analíticos, expressos em $\mu\text{g.kg}^{-1}$, os laboratórios participantes foram orientados a informar também a recuperação (%), o limite de detecção, o limite de quantificação e a incerteza, inerentes ao método empregado, através do “*Formulário de Registro de Resultados*”, e outras informações sobre as técnicas e os equipamentos utilizados nos ensaios.

4.2. Estabelecimento dos Valores Designados

Como não foi atingido o mínimo de 11 resultados válidos¹, reportados pelos laboratórios participantes, para cada aflatoxina, o valor designado não foi calculado a partir das técnicas de estatística robusta e sim fornecido pelo INCQS (valor de referência). O procedimento adotado no cálculo do valor de referência e de sua incerteza é descrito no [Anexo A](#).

4.3. Análise Estatística

As análises estatísticas utilizadas para a obtenção do desvio padrão utilizado na análise da proficiência, para a avaliação da homogeneidade e da estabilidade das amostras, bem como para a avaliação do desempenho dos laboratórios participantes estão descritas a seguir.

¹ Critério 5 do item 12 do protocolo da rodada.

4.3.1. Análise de Resíduos

A análise de resíduos foi empregada para avaliar a estabilidade dos itens de ensaio de milho em relação aos valores de referência da concentração das aflatoxinas avaliadas neste EP. Assim, foram estimadas as variâncias dos valores utilizados na regressão linear, observando-se se o valor de concentração apresentava alguma tendência através da ferramenta estatística de análise de variância (ANOVA). As aflatoxinas foram consideradas estáveis quando a inclinação da reta (ou a não linearidade) não foi significativa.

4.3.2. Avaliação da Homogeneidade dos Itens de Ensaio

A norma [ISO 13528](#) (item 4.4, anexo B) foi seguida na avaliação da homogeneidade dos itens de ensaio. Esta norma permite incluir o desvio padrão devido à heterogeneidade das amostras, no desvio padrão de avaliação de proficiência. Um resumo do procedimento estabelecido na norma ISO 13528 para avaliação da homogeneidade dos itens de ensaio é apresentado no [Anexo B](#).

4.3.3. Desvio Padrão para Avaliação de Proficiência

Nesta rodada de ensaio de proficiência o desvio padrão para avaliação de proficiência dos laboratórios participantes foi calculado como recomendado no item 6.4 da norma [ISO 13528](#), isto é, como proposto originalmente por *Horwitz*, ([Horwitz](#), 1980), onde a precisão interlaboratorial é avaliada em termos de um desvio padrão de reprodutibilidade (Equação 1).

$$\sigma_H = 0,02c^{0,8495} \quad (1)$$

onde: c é o nível de concentração expresso em fração mássica e σ_H é o desvio padrão de *Horwitz*.

Adotando-se as modificações propostas por *Thompson* ([Thompson](#), 2000) onde se leva em consideração os níveis de concentração do analito expressos em fração mássica, conforme as Equações 2, 3 e 4:

$$\sigma_H = 0,22c \quad , \text{ se } c < 1,2 \times 10^{-7} \quad (2)$$

$$\sigma_H = 0,02c^{0,8495} \quad , \text{ se } 1,2 \times 10^{-7} \leq c \leq 0,138 \quad (3)$$

$$\sigma_H = 0,01c^{0,5} \quad , \text{ se } c > 0,138 \quad (4)$$

onde : c é o nível de concentração expresso em fração mássica e σ_H é o desvio padrão de *Horwitz* modificado.

Assim, para este EP o **valor de referência de cada aflatoxina** foi utilizado no cálculo do desvio padrão para avaliação da proficiência.

4.3.4. Índice z

Para a qualificação dos resultados dos laboratórios, o índice z (z-score, medida da distância relativa do resultado da medição do laboratório em relação ao valor designado do ensaio de proficiência) foi calculado de acordo com a Equação 5.

$$z = \frac{x_i - x^*}{\sigma_H} \quad (5)$$

Onde x_i representa o valor do laboratório participante, x^* representa o valor de referência e σ_H o desvio padrão de Horwitz.

A interpretação do valor do **índice z** está descrita abaixo:

$|z| \leq 2$ - Resultado satisfatório

$2 < |z| < 3$ - Resultado questionável

$|z| \geq 3$ - Resultado insatisfatório

5. Resultados da Avaliação da Homogeneidade e Estabilidade dos Itens de Ensaio

5.1. Avaliação da Homogeneidade

Para o teste de homogeneidade foram separados, aleatoriamente, 10 itens de ensaio contendo, amostras representativas do milho preparado.

Para cada item de ensaio foram realizadas duas análises completas utilizando 6g de amostra. Os resultados obtidos para o Lote A estão demonstrados na [Tabela 1](#). Para o Lote B todas as amostras apresentaram resultado abaixo do limite de detecção da metodologia analítica utilizada.

Tabela 1: Resultados do teste de homogeneidade, em $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

Amostra	Aflatoxina B1		Aflatoxina B2		Aflatoxina G1		Aflatoxina G2		Total	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
1	1,96	2,13	4,23	4,22	2,05	2,05	3,87	3,98	12,11	12,38
2	1,97	2,00	4,05	4,23	2,11	2,09	3,71	3,84	11,84	12,17
3	1,76	2,04	3,94	4,23	1,94	2,07	4,06	4,28	11,70	12,63
4	1,85	1,85	4,05	3,96	1,96	2,00	3,74	3,88	11,61	11,69
5	1,92	1,90	4,08	4,00	1,96	1,95	3,94	4,20	11,90	12,05
6	1,76	1,98	4,06	4,21	1,84	2,02	4,52	3,86	12,18	12,07
7	1,96	2,09	4,06	4,22	1,85	1,97	4,77	3,86	12,64	12,14
8	1,89	2,06	4,32	4,26	2,08	2,14	4,82	3,92	13,11	12,38
9	1,94	2,04	4,08	4,25	2,04	2,02	4,50	3,77	12,55	12,08
10	2,08	2,07	4,19	4,30	2,19	2,18	4,71	3,87	13,17	12,42

A [Tabela 2](#) apresenta os resultados da análise estatística do estudo de homogeneidade para as Aflatoxinas.

Tabela 2: Sumário das análises estatísticas para o estudo de Homogeneidade, em $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

Aflatoxinas	Média	$\hat{\sigma}$ ⁽¹⁾	$0,3 \hat{\sigma}$	S_x	S_w	S_s	Resultado
B1	1,96	0,43	0,13	0,076	0,103	0,023	Homogêneo
B2	4,15	0,91	0,27	0,090	0,106	0,049	Homogêneo
G1	2,03	0,45	0,13	0,087	0,059	0,077	Homogêneo
G2	4,11	0,90	0,27	0,208	0,417	0,000	Homogêneo
Total	12,24	2,69	0,81	0,347	0,364	0,232	Homogêneo

(1) Desvio padrão de Horwitz (modificado por Thompson), correlacionado a concentração média das vinte amostras

Os itens de ensaio se apresentaram suficientemente homogêneos, apesar da variância analítica (S_w) para a aflatoxinas G2 ter apresentado valor muito mais alto que o desvio padrão das médias (S_x), indicando baixa repetitividade do método e fazendo com que o termo do desvio padrão entre as amostras fosse considerado zero.

Desta forma, consideraram-se os itens de ensaio suficientemente homogêneos para a finalidade deste EP em relação a todas as aflatoxinas presentes.

5.2. Avaliação da Estabilidade

5.2.1. Estabilidade de Armazenamento

A estabilidade das amostras armazenadas em geladeira (4°C), quanto a flutuações temporais na concentração das aflatoxinas, foi avaliada no decorrer do EP (Tabela 3). A avaliação foi realizada utilizando-se a análise de resíduos da regressão linear. Os itens de ensaio foram considerados suficientemente estáveis para a finalidade deste Ensaio de Proficiência (Tabela 4).

Tabela 3: Replicatas 1 e 2 do estudo de estabilidade de armazenamento, em $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

Dias	Aflatoxinas									
	B1		B2		G1		G2		Totais	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
0	2,26	2,24	4,87	4,75	2,03	2,34	4,97	4,79	14,14	14,11
25	2,16	2,11	4,70	4,72	2,33	2,27	4,63	4,65	13,81	13,75
50	2,28	2,26	4,73	4,94	2,26	2,43	4,67	4,81	13,94	14,44
72	2,17	2,31	4,84	4,87	2,38	2,46	4,81	4,79	14,20	14,43
99	2,08	2,13	4,59	4,52	2,07	2,07	4,68	4,55	13,42	13,27
126	2,05	2,08	4,58	4,51	2,18	1,88	4,65	4,41	13,46	12,88

Tabela 4: Análise de regressão para as aflatoxinas do milho, em $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{dias}^{-1}$.

Aflatoxinas	Coeficiente Angular	Erro padrão	Intervalo de confiança		Resultado
			Inferior	Superior	
B1	-0,00122	0,00070	-0,00315	0,00072	Estável
B2	-0,00206	0,00108	-0,00506	0,00093	Estável
G1	-0,00165	0,00145	-0,00568	0,00238	Estável
G2	-0,00206	0,00093	-0,00463	0,00052	Estável
Totais	-0,00697	0,00369	-0,01721	0,00327	Estável

5.2.2. Estabilidade de Transporte

A fim de avaliar a influencia da temperatura no transporte dos itens de ensaio, foi realizado um experimento onde 8 itens de ensaio foram colocados à temperatura de 25 e 50°C (4 em cada temperatura) simulando condições drásticas de transporte. O tempo que cada item de ensaio permaneceu a temperatura do estudo e os valores encontrados para as concentrações das aflatoxinas estão apresentados na Tabela 5 e 6. Os valores encontrados na análise de regressão são apresentados na Tabela 7 e 8.

Tabela 5: Replicatas 1 e 2 do estudo de estabilidade de transporte, em $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (25 °C).

Dias	Aflatoxinas									
	B1		B2		G1		G2		Totais	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
0	1,84	2,05	4,09	4,44	2,02	2,29	4,83	5,32	12,78	14,09
3	2,01	2,02	4,39	4,35	2,32	2,24	5,28	5,21	14,00	13,82
7	2,01	1,99	4,36	4,32	2,22	2,33	5,11	5,01	13,69	13,65
11	2,06	2,00	4,51	4,28	2,33	2,32	5,09	4,68	13,99	13,28
15	2,00	1,95	4,24	4,34	2,22	2,25	5,01	4,66	13,46	13,21

Tabela 6: Replicatas 1 e 2 do estudo de estabilidade de transporte, em $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (50 °C).

Dias	Aflatoxinas									
	B1		B2		G1		G2		Totais	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
0	1,84	2,05	4,09	4,44	2,02	2,29	4,83	5,32	12,78	14,09
3	1,86	1,94	4,08	4,10	2,04	2,06	4,55	4,55	12,53	12,65
7	1,84	1,74	4,01	3,84	1,82	1,93	4,34	4,06	12,02	11,57
11	1,68	1,67	3,73	3,70	1,78	1,83	3,98	3,86	11,17	11,06
15	1,60	1,51	3,60	3,53	1,72	1,70	3,64	3,54	10,56	10,29

Tabela 7: Análise de regressão para as aflatoxinas em milho, em $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{dias}^{-1}$ (25 °C).

Aflatoxinas	Coeficiente Angular	Erro padrão	Intervalo de confiança		Resultado
			Inferior	Superior	
B1	0,0017	0,0031	-0,0080	0,0115	Estável
B2	0,0016	0,0051	-0,0147	0,0179	Estável
G1	0,0050	0,0054	-0,0122	0,0222	Estável
G2	-0,0228	0,0086	-0,0503	0,0046	Estável
Totais	-0,0142	0,0198	-0,0772	0,0488	Estável

Tabela 8: Análise de regressão para as aflatoxinas em milho, em $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{dias}^{-1}$ (50 °C).

Aflatoxinas	Coeficiente Angular	Erro padrão	Intervalo de confiança		Resultado
			Inferior	Superior	
B1	-0,0266	0,0014	-0,0311	-0,0221	Instável
B2	-0,0466	0,0017	-0,0521	-0,0411	Instável
G1	-0,0297	0,0029	-0,0388	-0,0206	Instável
G2	-0,0939	0,0096	-0,1245	-0,0632	Instável
Totais	-0,1963	0,0112	-0,2319	-0,1606	Instável

Os resultados obtidos no tratamento estatístico dos dados gerados nos estudos de estabilidade de armazenamento e de transporte à 25 °C evidenciaram que o valor do intervalo de confiança para o coeficiente angular abrange o valor zero (0), para um nível de confiança de 95%. Conclui-se, portanto, que este é um valor possível ao coeficiente angular da curva que descreve a estabilidade e que os itens de ensaio mostraram-se suficientemente estáveis nas condições estabelecidas nestes estudos.

Contudo, o material não se mostrou estável à 50 °C. Portanto, para garantir a estabilidade das aflatoxinas durante o transporte, os itens de ensaio foram enviados sob refrigeração, ou seja, em temperatura muito inferior a 25 °C.

6. Atribuição dos Valores de Referência

Os valores de referência relativo às aflatoxinas empregadas neste ensaio de proficiência foi calculado segundo procedimento descrito no item 4.2 deste relatório; o desvio padrão para avaliação de proficiência foi obtido pelas equações modificadas baseadas no modelo de Horwitz, conforme o item 4.3.3. O valor de referência, a incerteza combinada (u_c), o fator de abrangência (k) e a incerteza expandida (U) e seu respectivo desvio padrão estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Valores de referência (VR), incertezas e desvios padrão, em $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

Aflatoxina	Valor de Referência	u_c (VR)	k	U (VR)	Desvio Padrão (σ_H)
B1	2,24	0,02	2,65	0,05	0,49
B2	4,73	0,06	2,87	0,06	1,04
G1	2,32	0,06	2,65	0,17	0,51
G2	4,76	0,06	2,65	0,17	1,05
Total	13,95	0,13	2,87	0,37	3,07

Como a incerteza combinada do valor de referência foi menor que $0,3\sigma_H$, esta pode ser negligenciada.

7. Avaliação do Desempenho dos Laboratórios Participantes

7.1. Laboratórios Participantes

Quatorze laboratórios se inscreveram na 6ª Rodada do Programa de Ensaio de Proficiência para a Determinação de Micotoxinas em Alimentos – Aflatoxinas em Milho, e treze (92,8) dos participantes enviaram os resultados.

Dos laboratórios participantes cinco (38,5 %) são acreditados na norma ISO/IEC 17025 na análise de aflatoxinas. A maioria dos participantes (dez 76,9%) utilizou metodologia analítica validada para a análise em questão.

7.2. Resultados dos Laboratórios Participantes

Dos itens de ensaio enviado aos laboratórios, os que pertenciam ao lote A não apresentaram resultados detectáveis de aflatoxinas² e foram considerados amostras “branco”.

Desta forma, os dados reportados pelos laboratórios participantes dos itens de ensaio do lote B foram tratados de acordo com os procedimentos descritos na [ISO/IEC 17043](#). As Tabelas [10](#), [11](#) e [12](#) apresentam os resultados dos laboratórios para a análise das aflatoxinas, a recuperação, o limite de detecção e o limite de quantificação, as técnicas de análise, bem como a massa de amostra utilizada pelos laboratórios participantes.

Os gráficos das dispersões dos resultados dos laboratórios participantes, para as Aflatoxinas deste EP, encontram-se nas Figuras de [1](#) - [5](#). Neste gráfico a linha central representa o valor de referência e as linhas pontilhadas em azul a incerteza expandida do valor de referência.

² Limites de detecção (aflatoxinas, em $\mu\text{g.kg}^{-1}$): B1= **0,31**; B2= **0,09**; G1= **0,63** e G2= **0,34**

Tabela 10: Método (S=Sim; N=Não), Massa de amostra (g), Solvente de Extração, Limpeza da Amostra, Técnica de Análise, Detector, Volume de Injeção (Vol. Injeção; µL), Composição da Fase Móvel, Fluxo (µL/min), Derivatização e Reagente de derivatização.

Laboratório	Método		Massa Amostra	Solvente Extração	Limpeza Amostra	Técnica de Análise	Detector	Vol. Injeção	Fase Móvel	Fluxo	Derivatização	Reagente
	Acreditado	Validado										
MIC 06/007	N	N	20	MeOH:H ₂ O	Filtração	ELISA	-	-	-	-	-	-
MIC 06/015	N	S	6	AcCN:HAc	-	UPLC	EM-EM	2	AcCN:H ₂ O	0,45	-	-
MIC 06/016	S	S	25	MeOH:H ₂ O	IA	FLUORÍMETRICO	-	-	-	-	-	-
MIC 06/020	S	S	25	MeOH:H ₂ O	IA	CLAE	F	50	MeOH:AcCN:H ₂ O	1	pós	KBr
MIC 06/034	N	N	10	AcCN:H ₂ O	-	CL	EM-EM	50	MeOH:H ₂ O	0,5	-	-
MIC 06/048	S	S	20	MeOH:H ₂ O	IA	CLAE	F	100	MeOH:AcCN:H ₂ O	1	pós	KBr
MIC 06/063	N	N	25	MeOH:HCCl ₃	(NH ₄) ₂ SO ₄ / Celite	CCD	-	-	Tol.:AcEt.:Ac.Form.	-	-	-
MIC 06/073	N	S	10	Acetona:H ₂ O	IA	CLAE	F	50	MeOH:AcCN:H ₂ O	1	pós	KBr
MIC 06/078	S	S	25	MeOH:H ₂ O	IA	CLAE	F	50	MeOH:AcCN:H ₂ O	1	pré	KBr
MIC 06/087	S	S	25	MeOH:H ₂ O	IA	CLAE	F	50	MeOH:AcCN:H ₂ O	1	pós	KBr
MIC 06/091	N	S	6	MeOH:H ₂ O	-	ELISA	-	-	-	-	-	-
MIC 06/092	S	S	5	MeOH	IA	CLAE	F	80	MeOH:AcCN	1	pós	Iodo
MIC 06/097	N	S	2	MeOH:H ₂ O	Filtração	CL	EM-EM	25	MeOH:H ₂ O	0,4	-	-

MeOH = Metanol; (NH₄)₂SO₄ = Sulfato de Amônio; KBr = Brometo de Potássio; AcCN = Acetonitrila; HAc = Ácido Acético; Tol. = Tolueno; AcEt = Acetato de Etila; Ac. Form = Ácido Fórmico; IA = Imunoafinidade; CL= Cromatografia Líquida; CLAE = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; UPLC = Cromatografia Líquida de Ultraeficiência, F = Fluorescência e EM = Espectrometria de Massas

Tabela 11: Resultados por análise (Resultado; $\mu\text{g.kg}^{-1}$) - O item de menor numeração de cada lote está apresentado primeiro.

Sumário dos Resultados

Laboratório	LOTE A										LOTE B									
											Item 1					Item 2				
	B1	B2	G1	G2	Total	B1	B2	G1	G2	Total	B1	B2	G1	G2	Total	B1	B2	G1	G2	Total
MIC 06/007	-	-	-	-	1,26	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-	18,54	-	-	-	-	23
MIC 06/015	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	-	2,1	5,5	2,1	3,7	13,4	2,4	5,8	2,4	3,9	14,5
MIC 06/016	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	8	-	-	-	-	9
MIC 06/020	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	1,9	3,5	1,7	3,8	10,9	1,9	3,4	1,7	3,8	10,7
MIC 06/034	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	-	1,97	3,31	1,09	4,81	11,18	1,91	3,39	1,37	5,04	11,71
MIC 06/048	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2,25	4,5	2,36	3,92	13,03	2,1	4,37	2,13	3,78	12,38
MIC 06/063	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	11,47	ND	9,71	21,18	ND	14,16	ND	9,7	23,86
MIC 06/073	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,55	3,39	1,11	2,09	-	2,23	4,64	2,36	5,46	-
MIC 06/078	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,78	3,49	1,71	0,8	7,78	1,73	3,68	1,74	0,96	8,11
MIC 06/087	< 1,5	< 0,5	< 1,5	< 0,5	< 4	< 1,5	< 0,5	< 1,5	< 0,5	< 4	2,15	4,88	2,27	4,17	13,47	2,18	4,72	2,23	4,03	13,16
MIC 06/091	-	-	-	-	< 1,0	-	-	-	-	< 1,0	-	-	-	-	7,6	-	-	-	-	6,7
MIC 06/092	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,9	1,89	0,94	0,86	4,59	1	2,19	0,89	0,94	5,02
MIC 06/097	ND	ND	ND	ND	0	ND	ND	ND	ND	0	<LQ	9,36	<LQ	6,49	15,85	ND	8,89	<LQ	<LQ	8,89

ND = Não Detectado; NQ = Não Quantificado.

Tabela 12: Parâmetros das análises: Limite de Detecção ($\mu\text{g.kg}^{-1}$), Limite de Quantificação ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) e Recuperação (%) - O item de menor numeração de cada lote está apresentado primeiro.

Parâmetros das Análises															
Laboratório	Limite de Detecção ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)					Limite de Quantificação ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)					Recuperação (%)				
	B1	B2	G1	G2	Total	B1	B2	G1	G2	Total	B1	B2	G1	G2	Total
MIC 06/007	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-	-
MIC 06/015	0,4	0,4	0,4	0,4	-	1	1	1	1	-	73,9	70,7	79,6	80,7	-
MIC 06/016	-	-	-	-	0	-	-	-	-	2	-	-	-	-	100
MIC 06/020	0,3	0,06	0,3	0,06	-	0,6	0,1	0,6	0,1	-	83	97	98	88	91
MIC 06/034	0,5	0,5	0,5	1,5	-	1	1,5	1	3	-	102	106	111	119	-
MIC 06/048	0,5	0,5	0,5	0,5	-	1	1	1	1	-	97,45	100,4	94,2	97,14	-
MIC 06/063	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MIC 06/073	0,06	0,06	0,06	0,06	-	0,16	0,18	0,18	0,23	-	94	93	78	58	-
MIC 06/078	0,12	0,17	0,17	0,21	-	1,23	1,6	1,26	1,32	-	104	100	95	97	-
MIC 06/087	0,04	0,01	0,04	0,01	0,1	< 1,5	< 0,5	< 1,5	< 0,5	4	86,1	80,8	86,6	88	85,37
MIC 06/091	-	-	-	-	1,0	-	-	-	-	1,0	-	-	-	-	-
MIC 06/092	0,1	0,03	0,1	0,03	-	0,16	0,05	0,16	0,05	-	80 -120	80 -120	80 -120	80 -120	-
MIC 06/097	1	1	1	1	-	3	3	3	3	-	100	100	100	100	-

Figura 1: Dispersão dos resultados da Aflatoxina B1 em milho

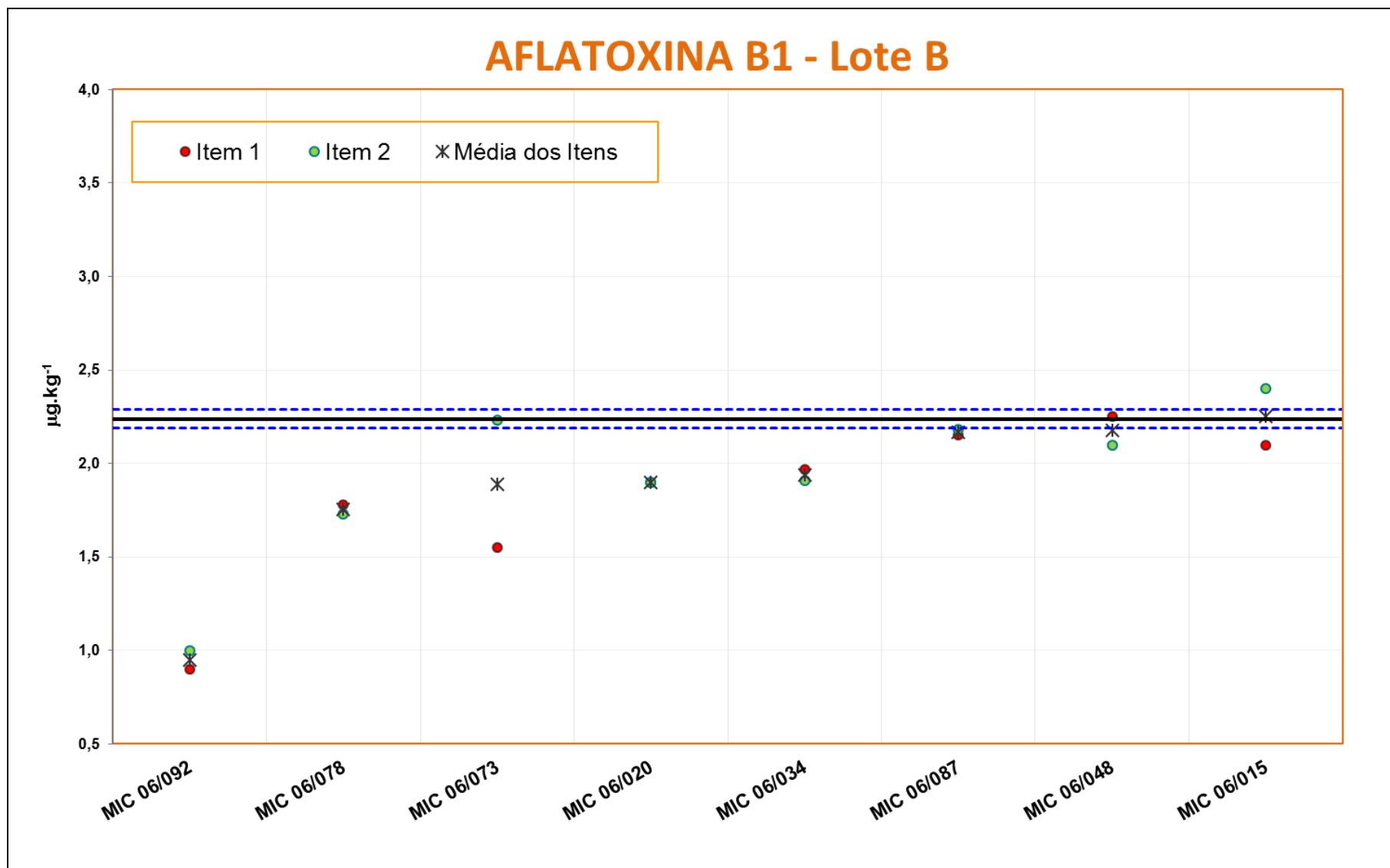


Figura 2: Dispersão dos resultados da Aflatoxina B2 em milho

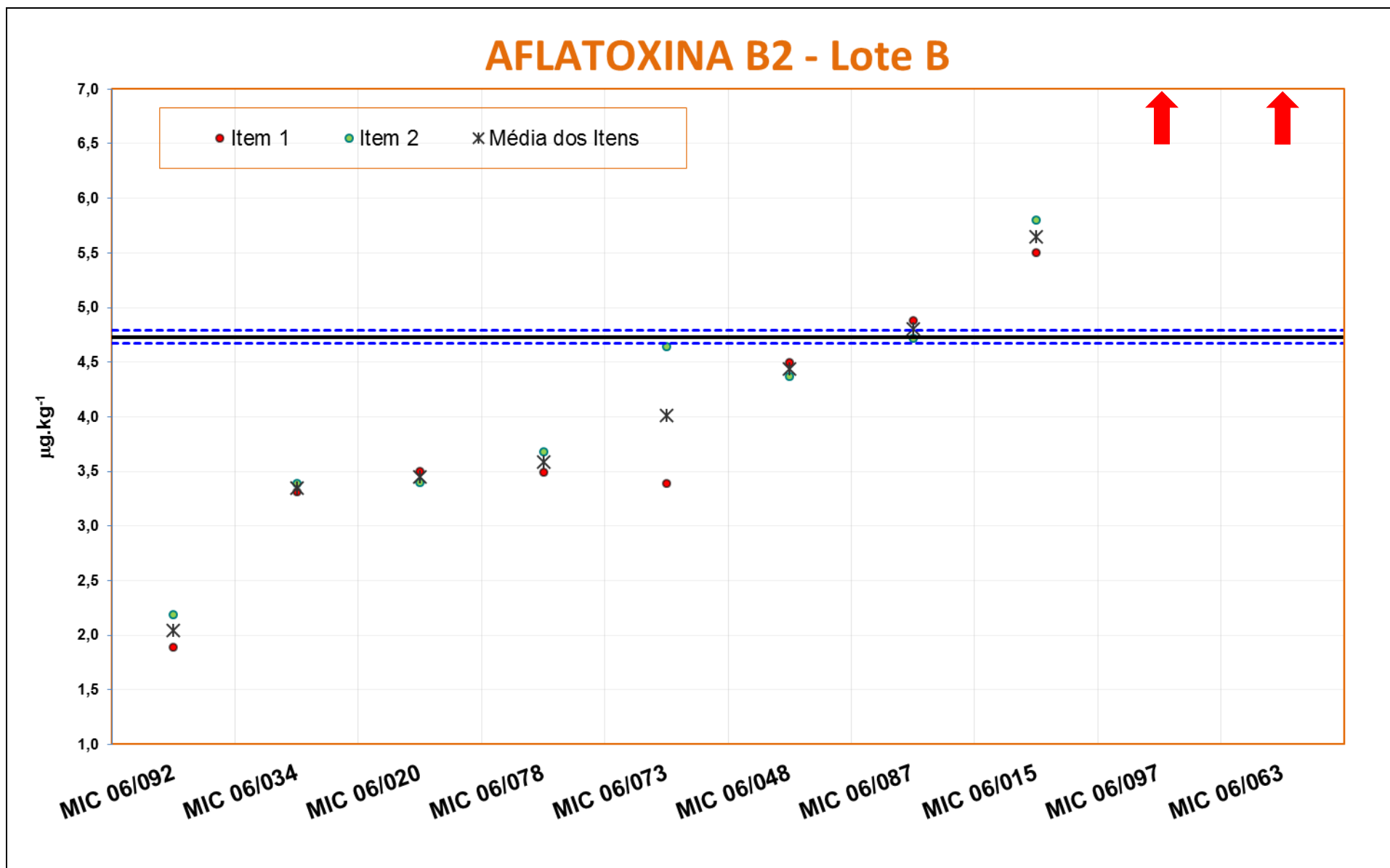


Figura 3: Dispersão dos resultados da Aflatoxina G1 em milho

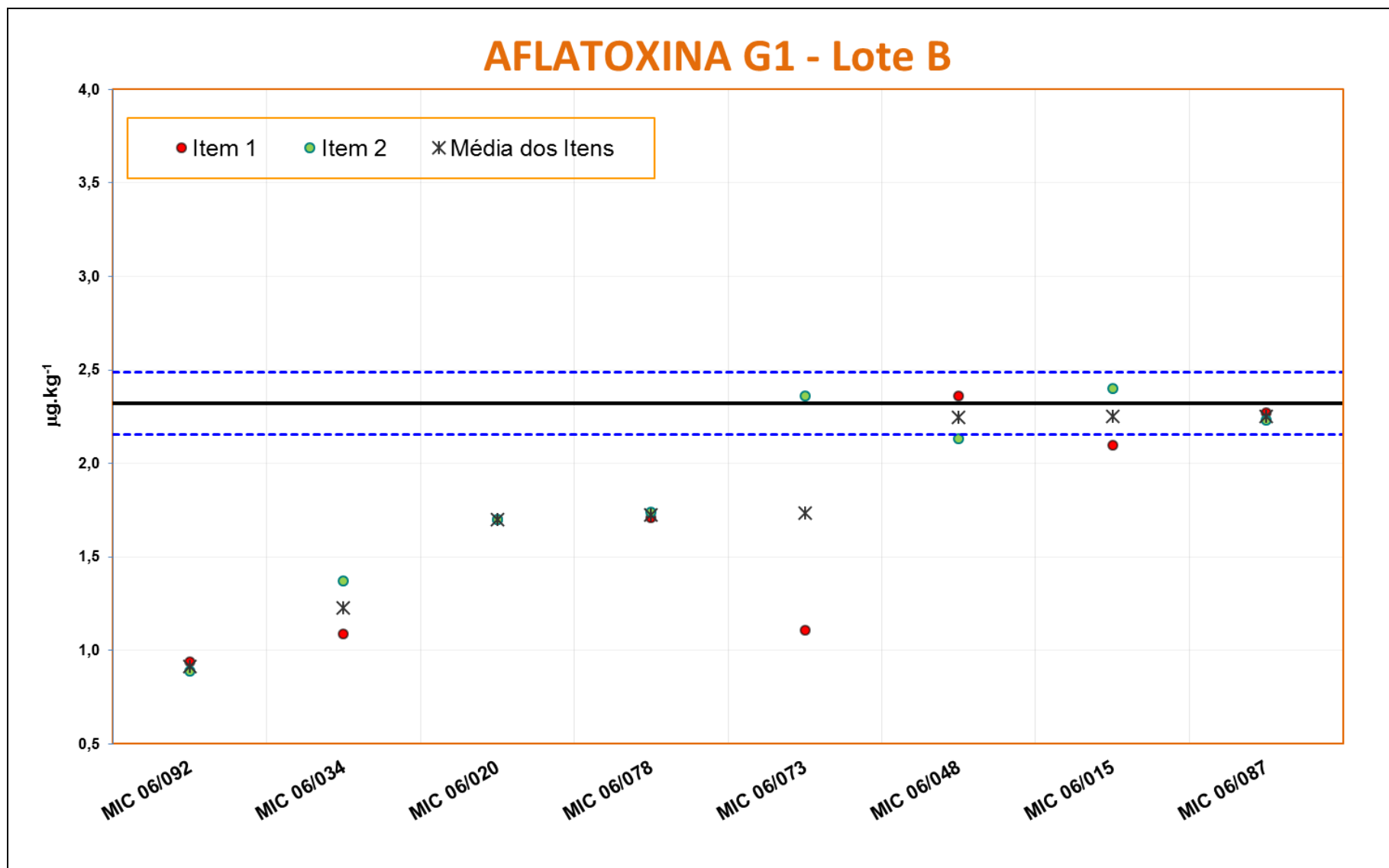


Figura 4: Dispersão dos resultados da Aflatoxina G2 em milho

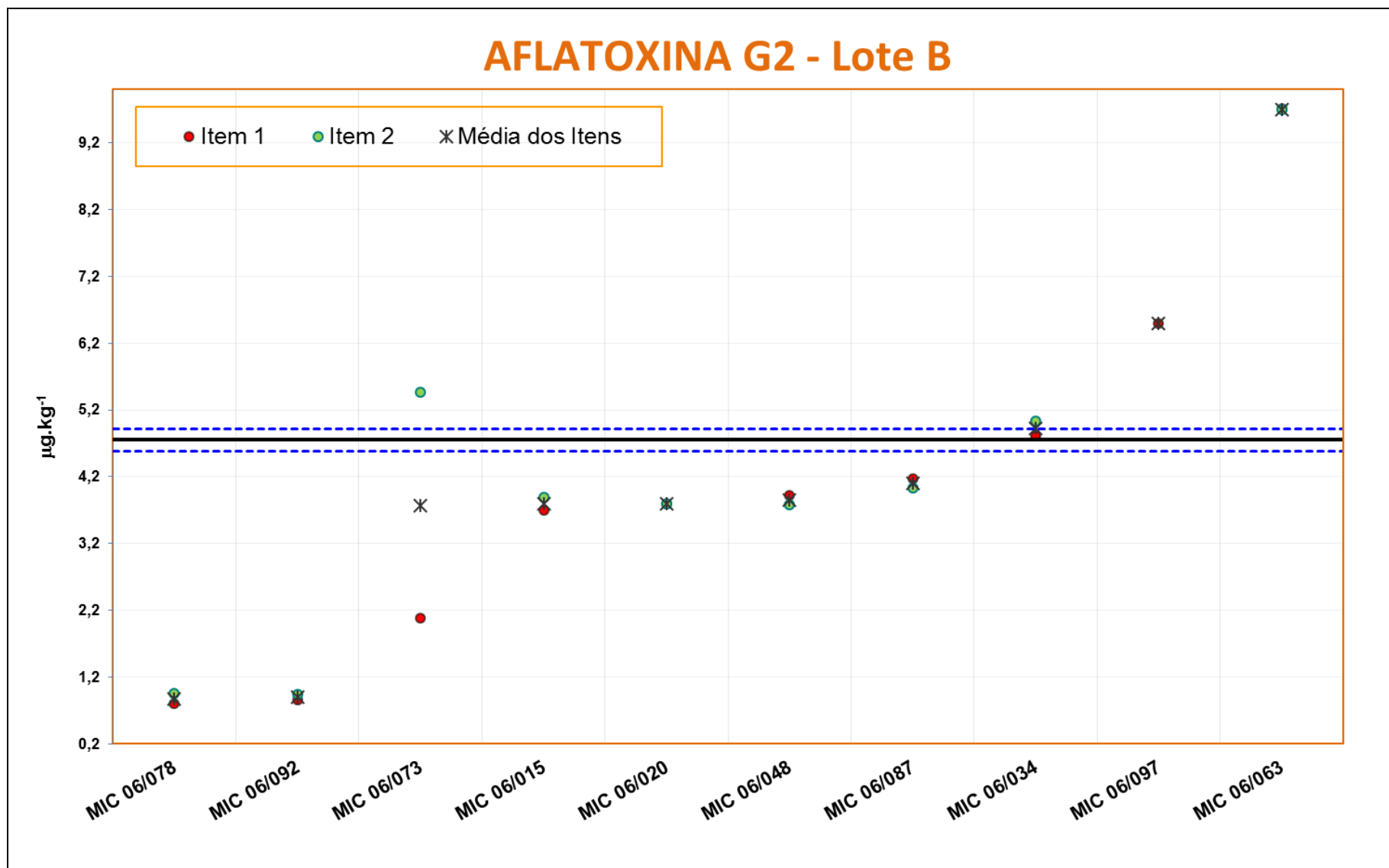
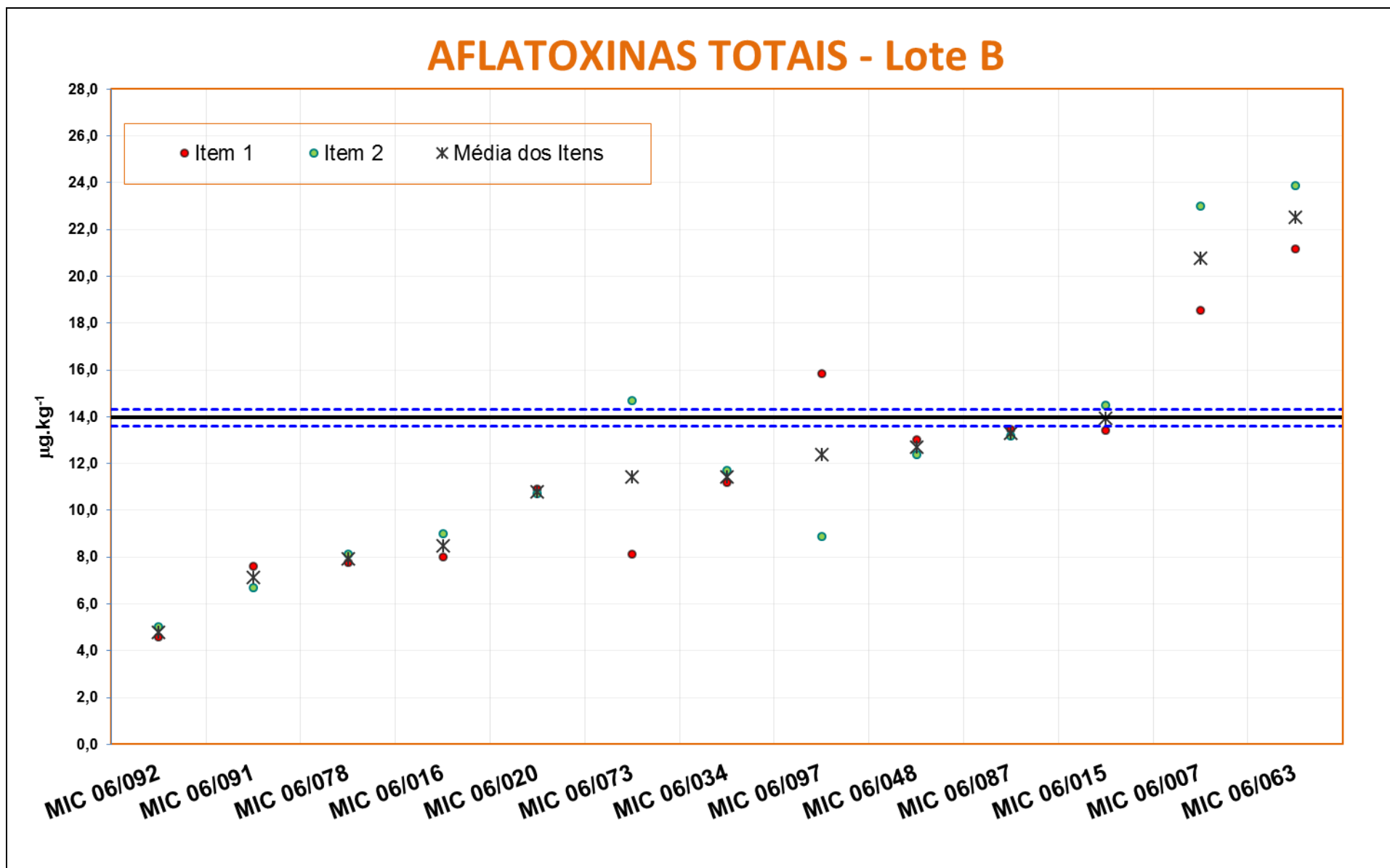


Figura 5: Dispersão dos resultados da Aflatoxinas totais em milho



7.3. Considerações Sobre as Metodologias de Análise

Nesta rodada de EP os laboratórios foram orientados a reportarem também alguns parâmetros relativos à validação do método empregado. Assim pela análise do sumário dos resultados (Tabelas 10 - 12), podemos considerar o seguinte:

7.3.1. Método e Informações Sobre a Metodologia

Dos treze laboratórios participantes, cinco (38,5 %) são acreditados para esta análise nos requisitos da norma ISO 17025 e outros cinco (38,5 %) tem a metodologia validada.

A cromatografia em fase líquida foi a técnica de separação e quantificação utilizada por nove (~70%) laboratórios, sendo o detector de fluorescência o mais utilizado, tendo três laboratórios utilizado a espectrometria de massas sequencial. A menor massa de amostra utilizada foi de 2 g e a maior 25g. Os volumes de injeção variaram de 2 à 100 µL. Um dos laboratórios (MIC 06/063) teve que adaptar a sua metodologia de rotina.

Excetuando-se o laboratório MIC 06/048, todos os que utilizaram a cromatografia como técnica de separação utilizaram coluna C18. Sete laboratórios participantes utilizaram coluna de imunoafinidade para a limpeza da amostra, dois a filtração, um celite e os outros dois não informaram.

7.3.2. Recuperação, Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Três laboratórios (MIC 06/007, MIC 06/063 e MIC 06/091) não informaram os valores de recuperação. O laboratório MIC 06/063 também não informou os limites de detecção e quantificação.

7.3.3. Incerteza

Oito laboratórios reportaram a incerteza dos seus resultados, dois laboratórios (MIC 06/015 e MIC 06/092) relataram incertezas bastante altas.

7.4. Cálculo do Índice z

A avaliação de desempenho dos laboratórios participantes, expressa através do índice z (Equação 5), está apresentada na Tabela 13.

Tabela 13: Valores do índice z obtidos pelos laboratórios participantes.

Código do Laboratório	Aflatoxinas									
	B1		B2		G1		G2		Total	
	Itens		Itens		Itens		Itens		Itens	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
MIC 06/007	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	1,5	2,9
MIC 06/015	-0,3	-0,3	0,7	1,0	-0,4	0,2	-1,0	-0,8	-0,2	0,2
MIC 06/016	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-1,9	-1,6
MIC 06/020	-0,7	-0,7	-1,2	-1,3	-1,2	-1,2	-0,9	-0,9	-1,0	-1,1
MIC 06/034	-0,5	-0,7	-1,4	-1,3	-2,4	-1,9	0,1	0,3	-0,9	-0,7
MIC 06/048	0,0	-0,3	-0,2	-0,3	0,1	-0,4	-0,8	-0,9	-0,3	-0,5
MIC 06/063	ND	ND	6,5	9,1	ND	ND	4,7	4,7	2,4	3,2
MIC 06/073	-1,4	0,0	-1,3	-0,1	-2,4	0,1	-2,5	0,7	-1,9	0,2
MIC 06/078	-0,9	-1,0	-1,2	-1,0	-1,2	-1,1	-3,8	-3,6	-2,0	-1,9
MIC 06/087	-0,2	-0,1	0,1	0,0	-0,1	-0,2	-0,6	-0,7	-0,2	-0,3
MIC 06/091	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-2,1	-2,4
MIC 06/092	-2,7	-2,5	-2,7	-2,4	-2,7	-2,8	-3,7	-3,6	-3,1	-2,9
MIC 06/097	<LQ	ND	4,4	4,0	<LQ	<LQ	1,7	<LQ	0,6	-1,6

NT = Não Testado; ND = Não detectado; LQ = Limite de Quantificação; Azul = resultado questionável, Vermelho = resultado insatisfatório.

As Figuras de 6 à 15 apresentam os resultados de índice z obtidos pelos laboratórios participantes para as aflatoxinas deste EP, nos dois itens de ensaio do lote B.

As Figuras de 16 à 20 apresentam gráficos de dispersão semelhantes ao de Youden, onde podem ser verificados os erros sistemáticos e/ou aleatórios contribuintes para os resultados do índice z. A área demarcada em pontilhado azul é a dos dois resultados satisfatórios, a área entre o azul e o pontilhado em amarelo a dos dois resultados questionáveis e a fora do pontilhado amarelo, a dos dois resultados insatisfatórios. Quanto mais próximo da linha vermelha diagonal, e afastado do centro, maiores os erros sistemáticos.

Figura 6: Gráfico de índice z dos laboratórios participantes para a aflatoxina B1, item 1.

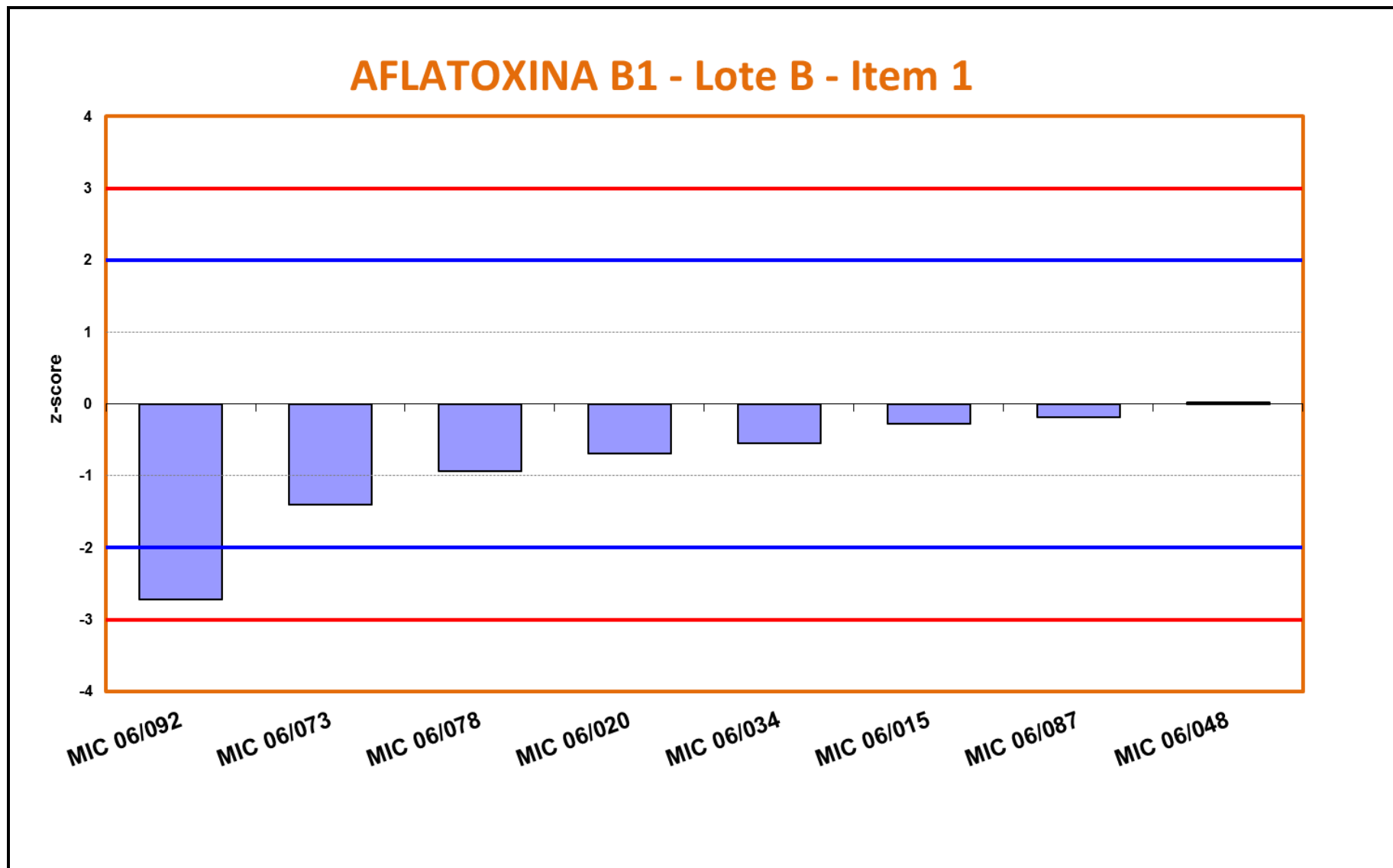


Figura 7: Gráfico de índice z dos laboratórios participantes para a aflatoxina B1, item 2.

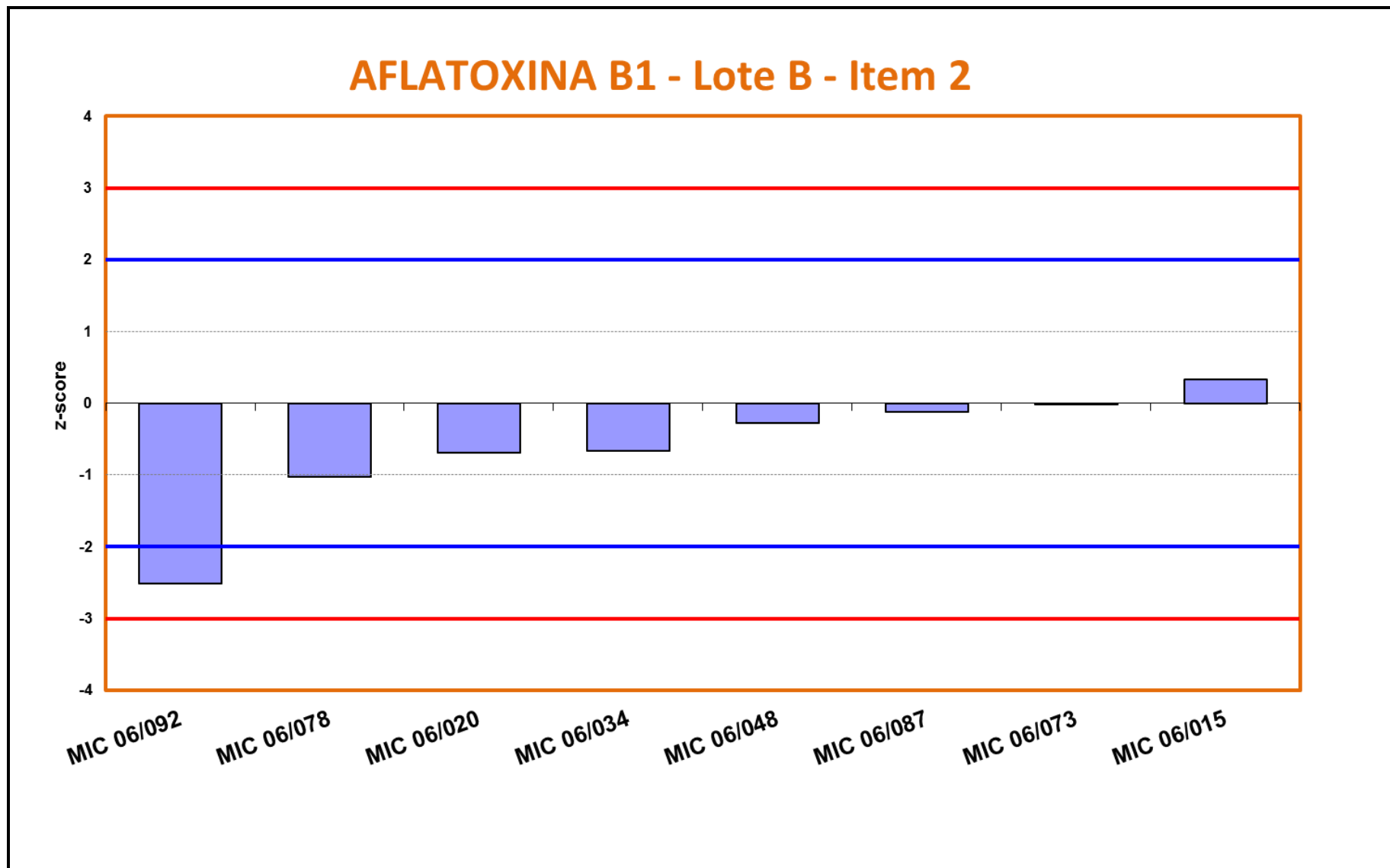


Figura 8: Gráfico de índice z dos laboratórios participantes para a aflatoxina B2, item 1.

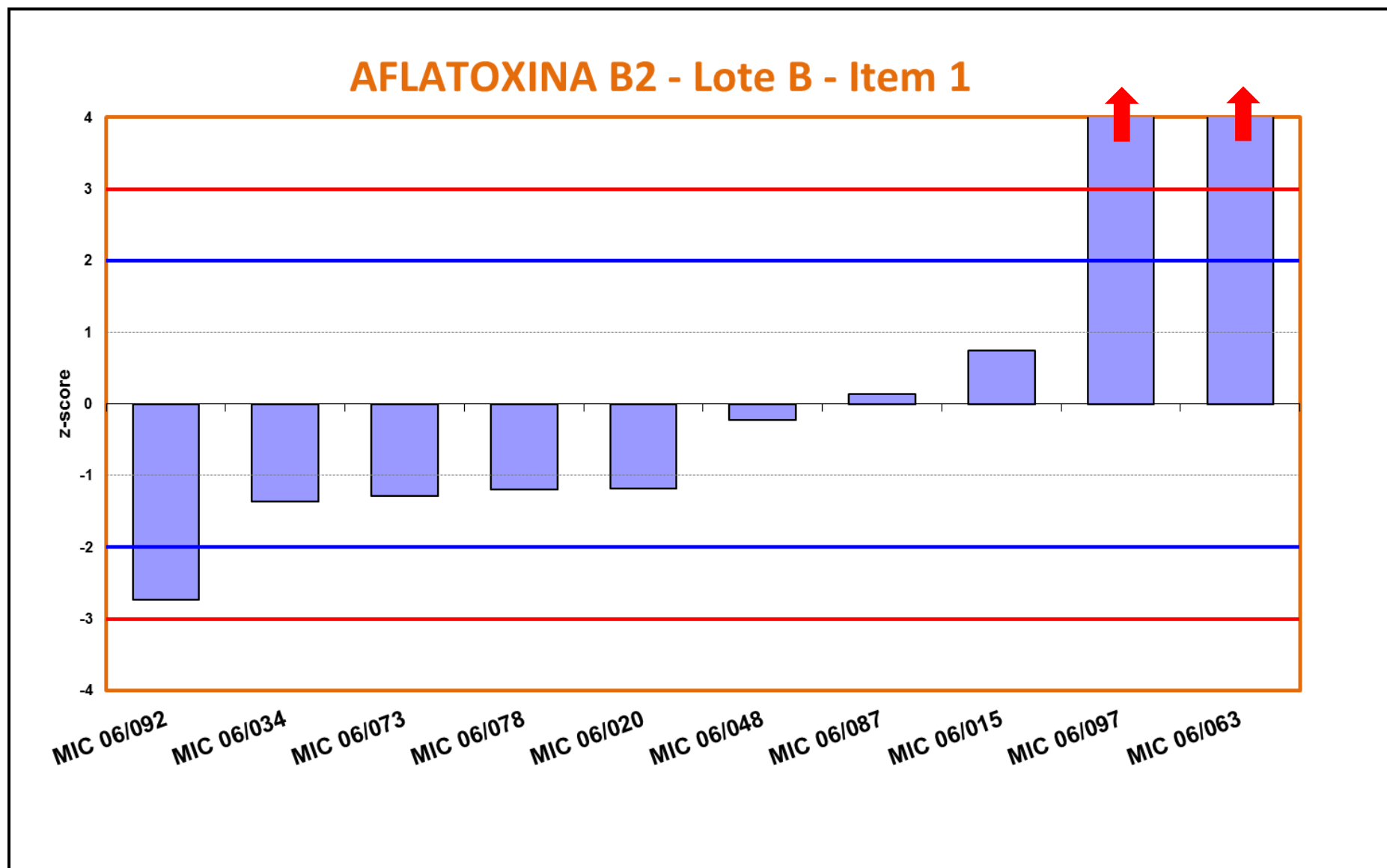


Figura 9: Gráfico de índice z dos laboratórios participantes para a aflatoxina B2, item 2.

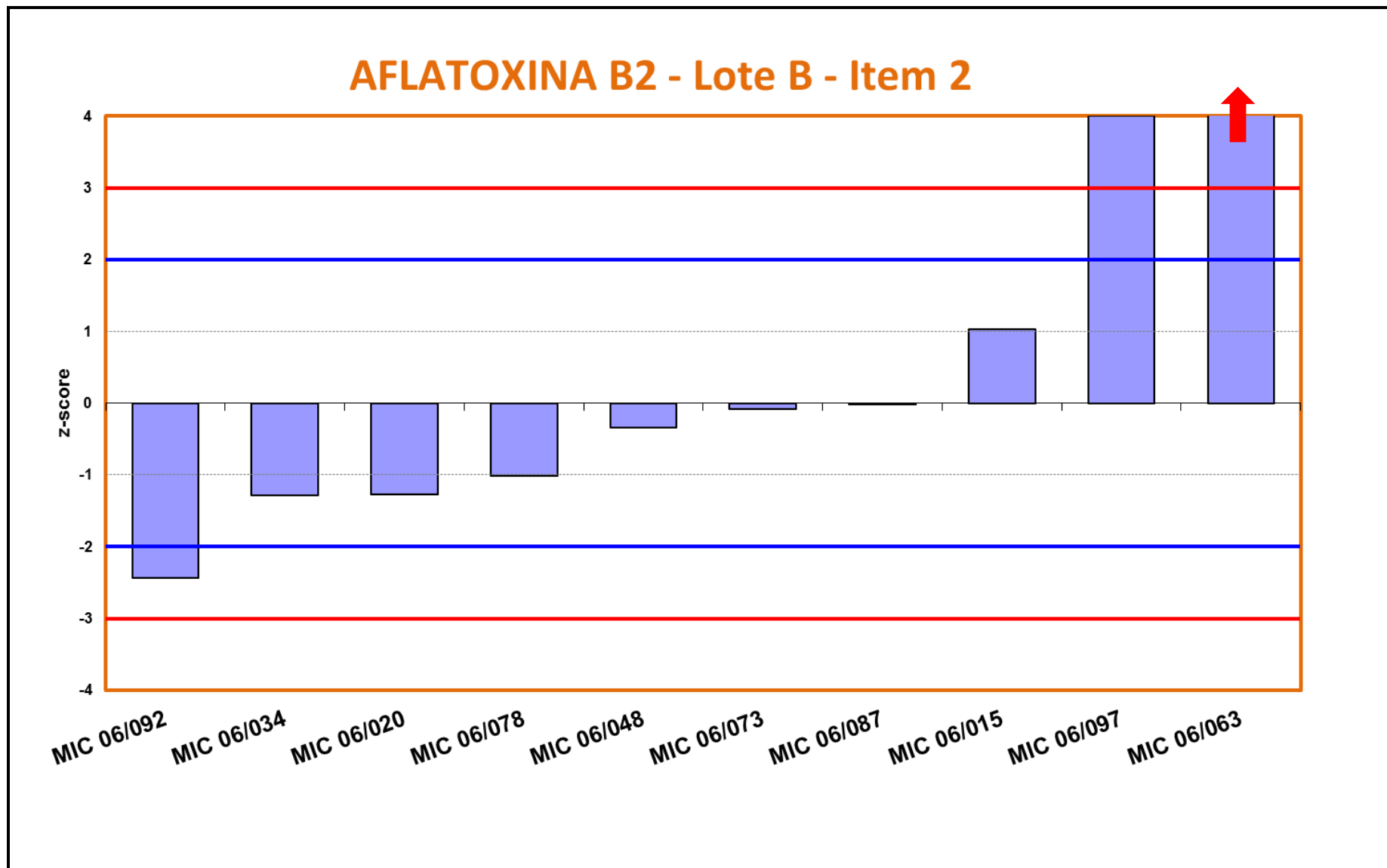


Figura 10: Gráfico de índice z dos laboratórios participantes para a aflatoxina G1, item 1.

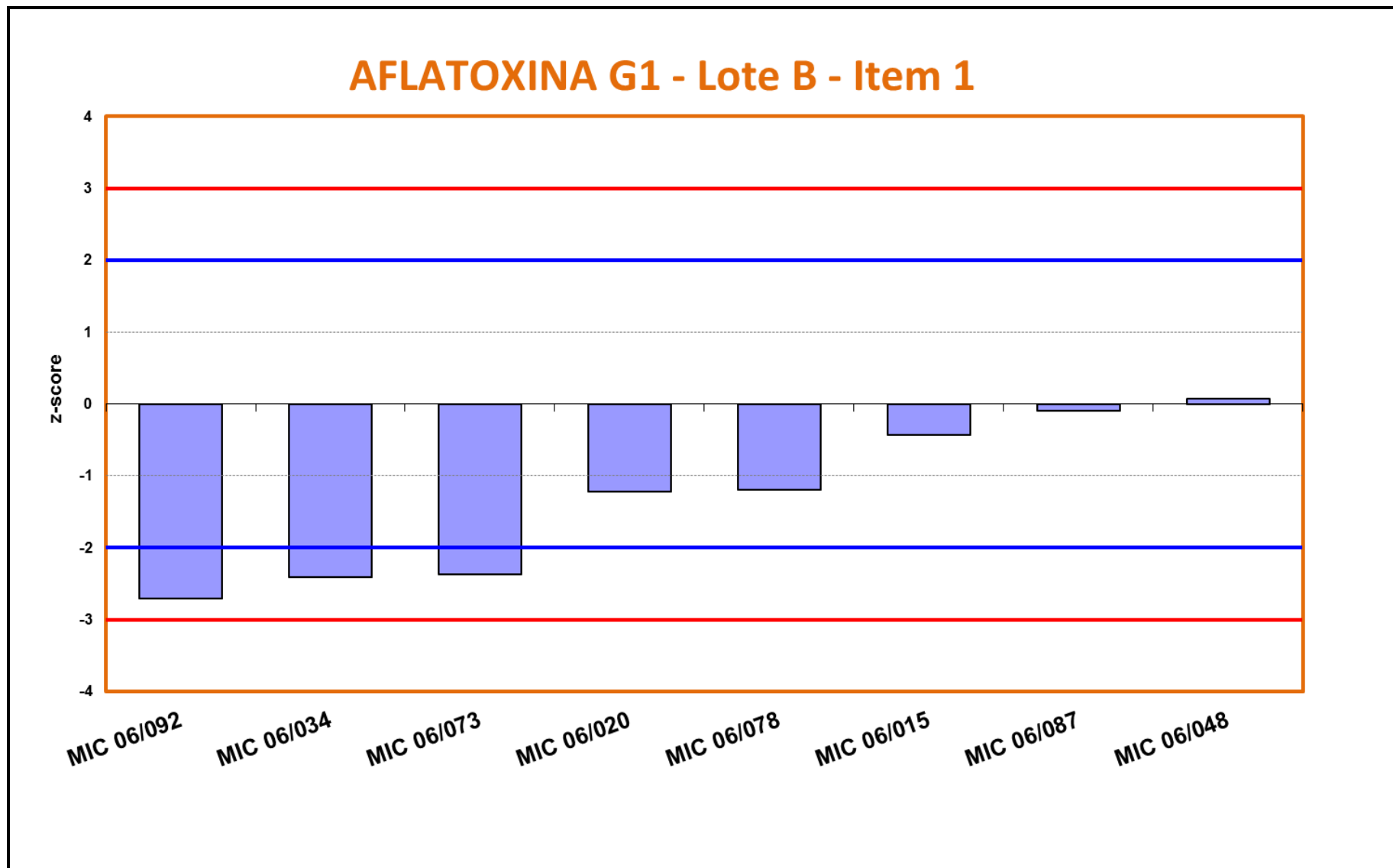


Figura 11: Gráfico de índice z dos laboratórios participantes para a aflatoxina G1, item 2.

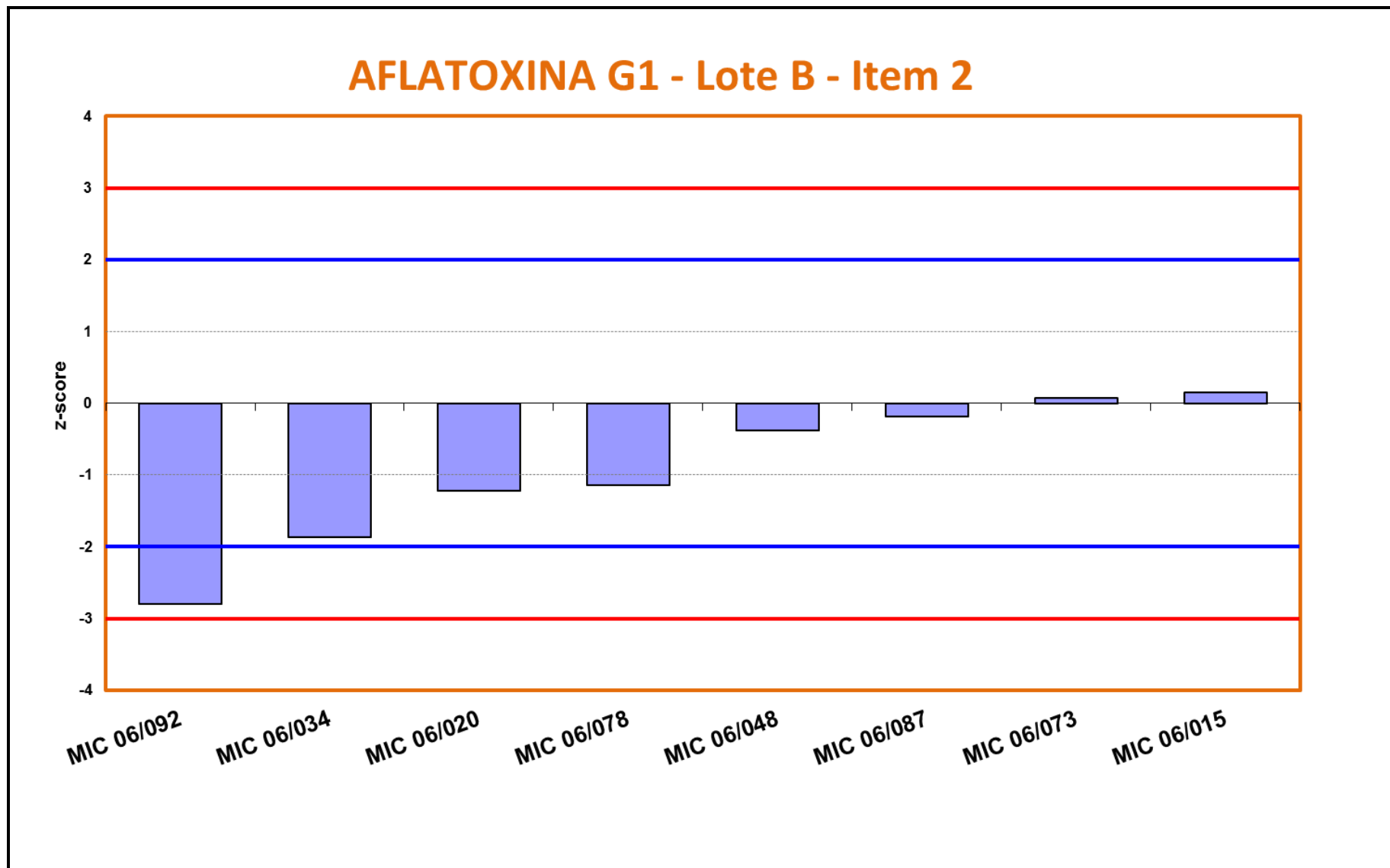


Figura 12: Gráfico de índice z dos laboratórios participantes para a aflatoxina G2, item 1.

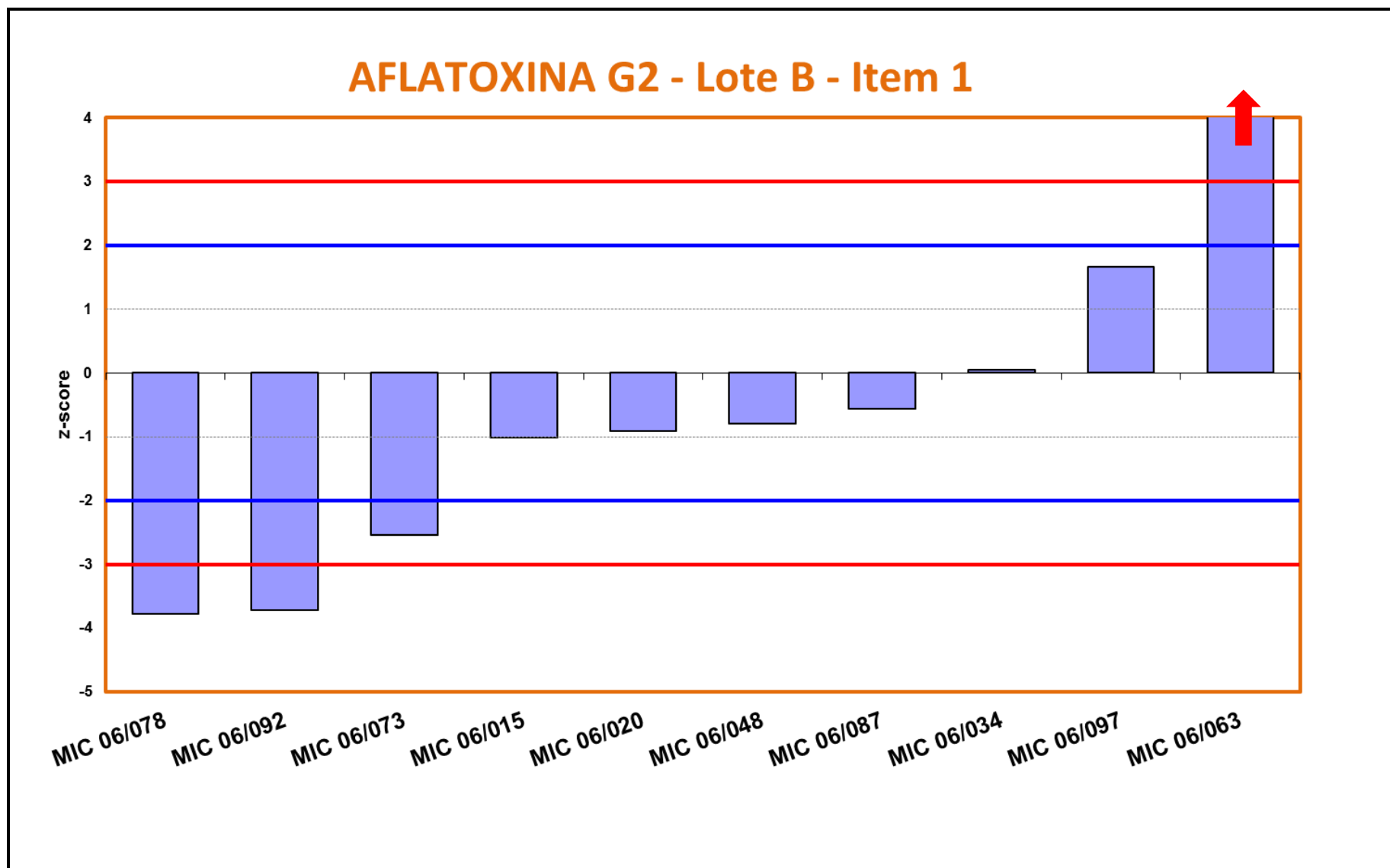


Figura 13: Gráfico de índice z dos laboratórios participantes para a aflatoxina G2, item 2.

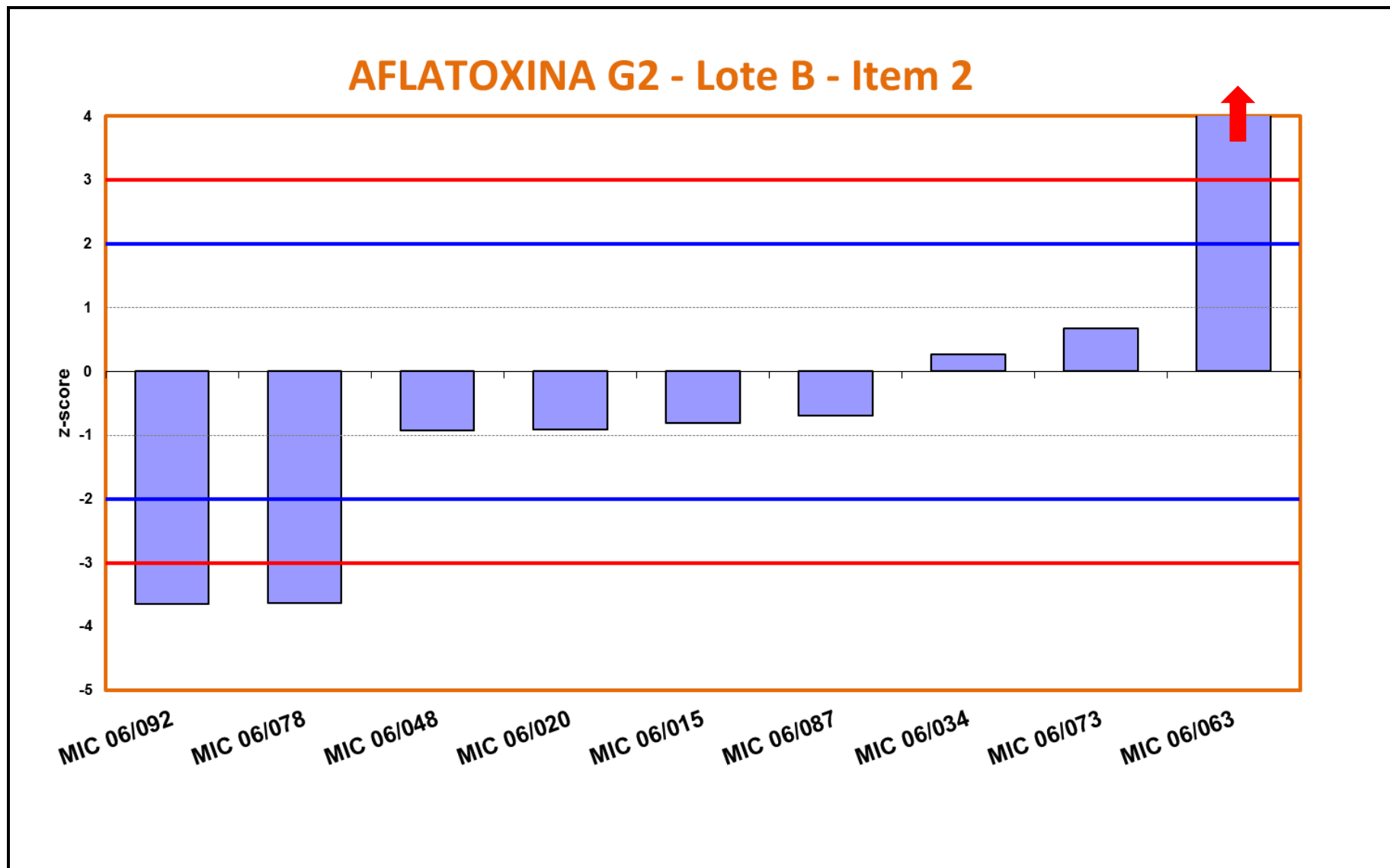


Figura 14: Gráfico de índice z dos laboratórios participantes para a aflatoxina total, item 1.

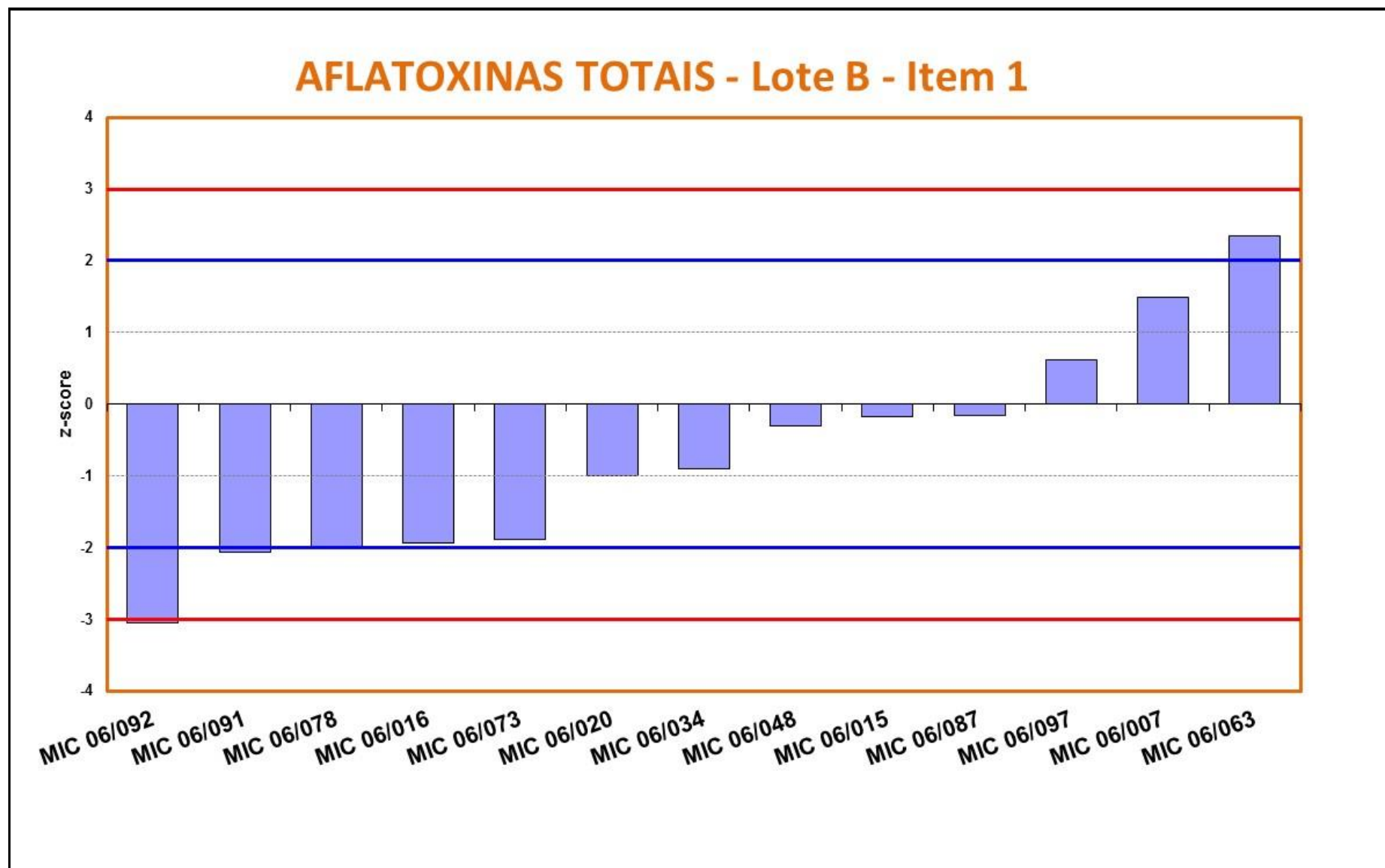


Figura 15: Gráfico de índice z dos laboratórios participantes para a aflatoxina total, item 2.

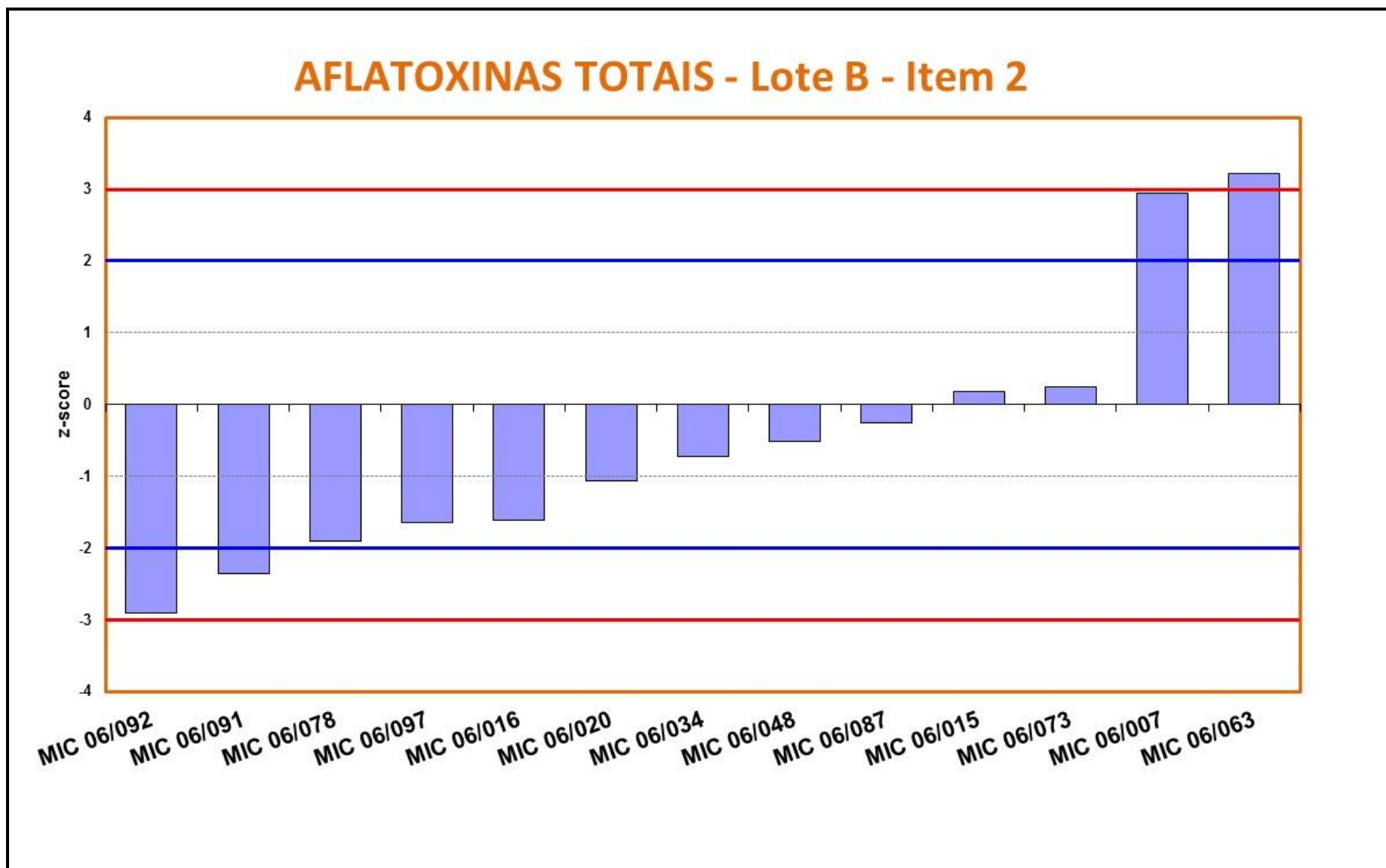


Figura 16: Gráfico semelhante ao de *Youden* dos laboratórios participantes para a aflatoxina B1.

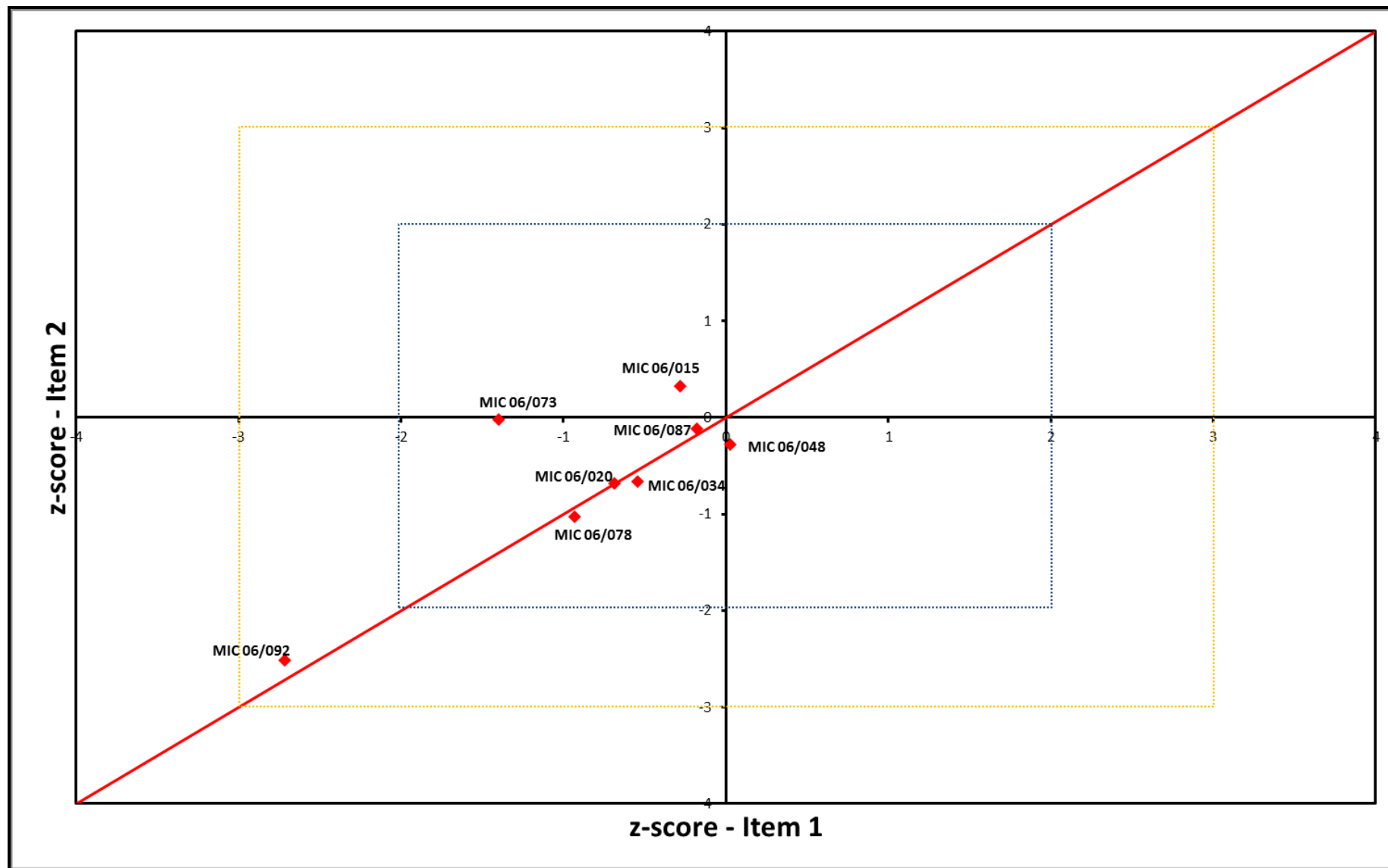


Figura 17: Gráfico semelhante ao de *Youden* dos laboratórios participantes para a aflatoxina B2.

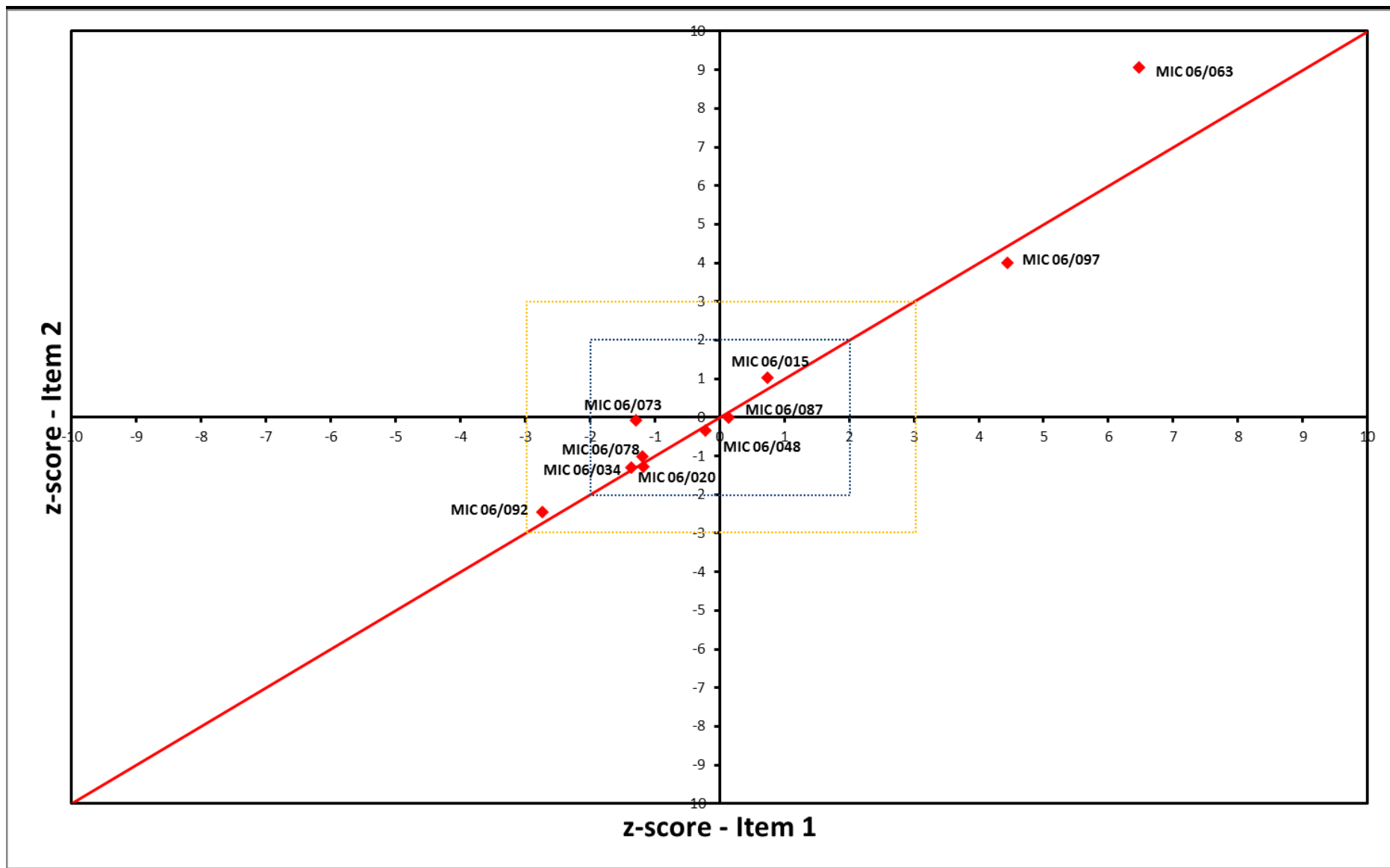


Figura 18: Gráfico semelhante ao de *Youden* dos laboratórios participantes para a aflatoxina G1.

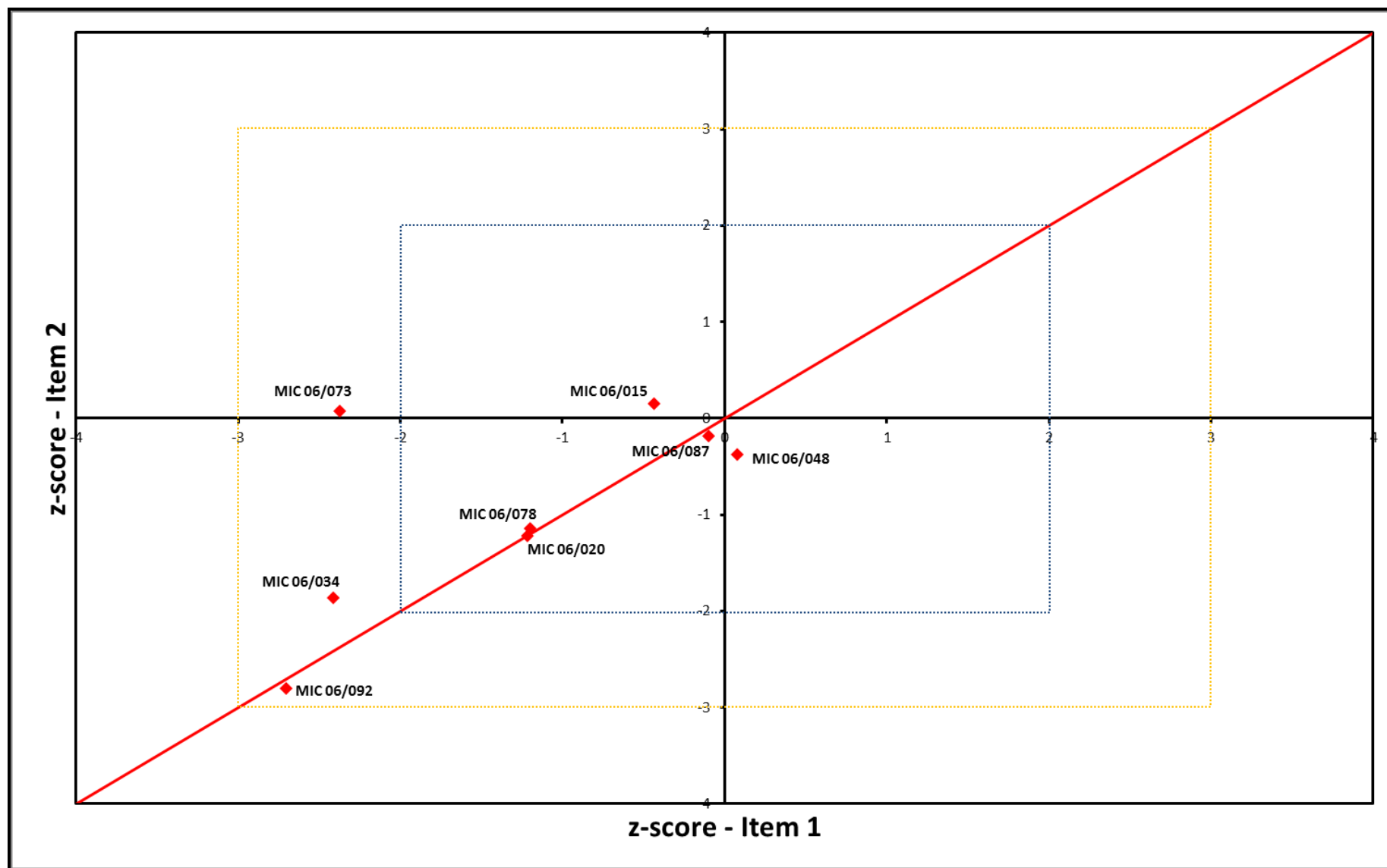


Figura 19: Gráfico semelhante ao de *Youden* dos laboratórios participantes para a aflatoxina G2.

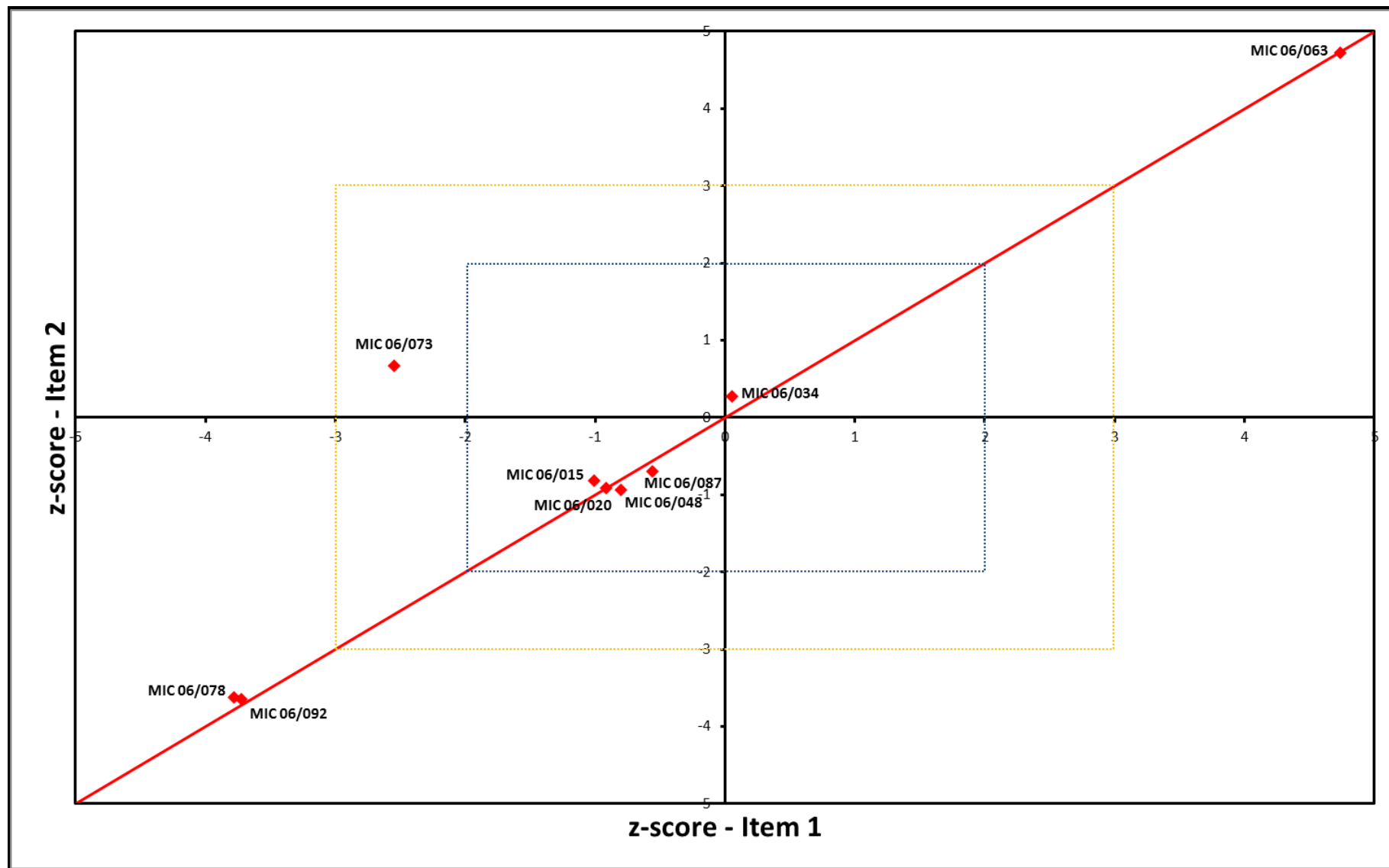
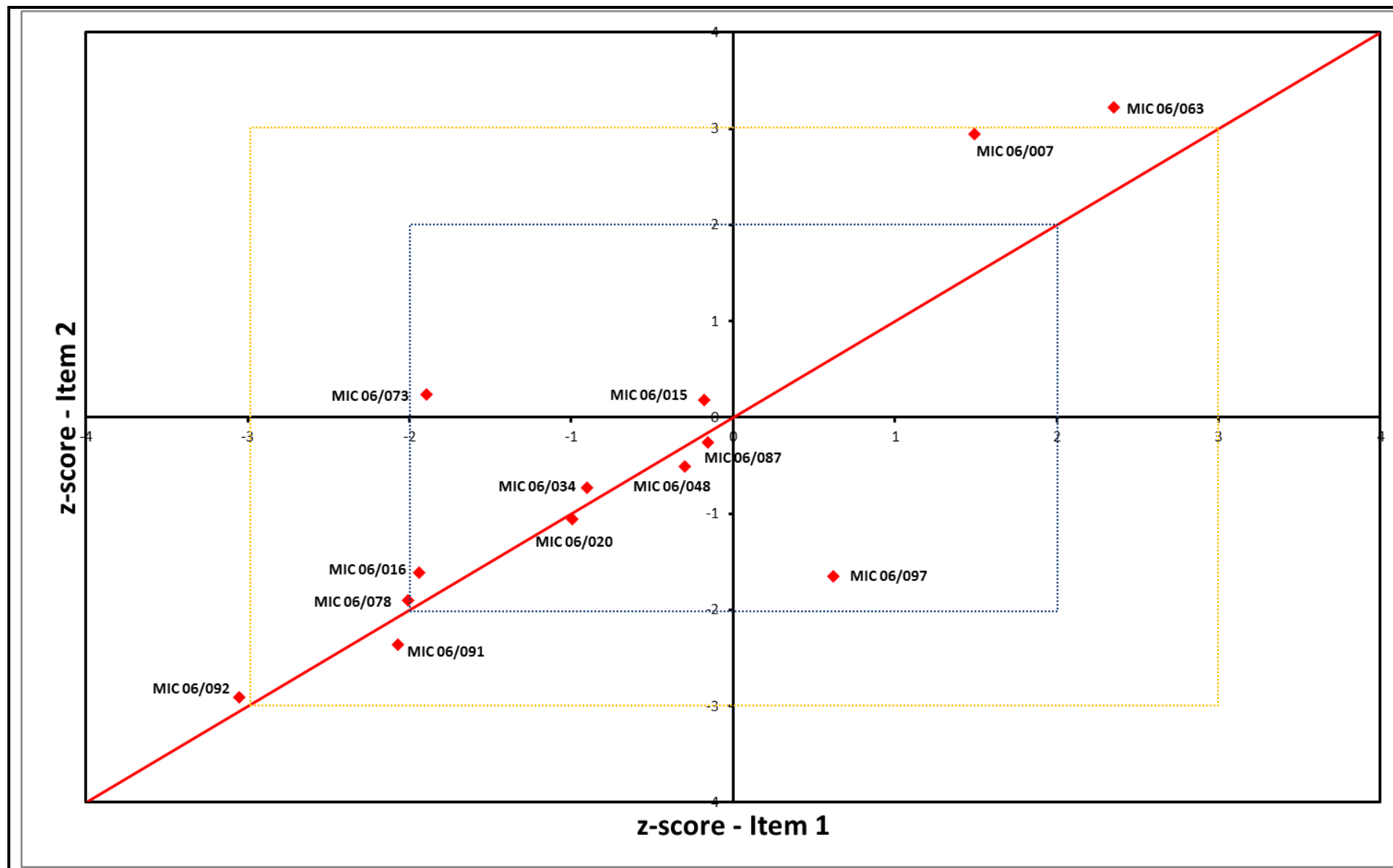


Figura 20: Gráfico semelhante ao de *Youden* dos laboratórios participantes para a aflatoxina total.



Para os itens de ensaio considerados “brancos”, excetuando-se o laboratório MIC 06/007 que informou os valores de 1,26 e 0,5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (aflatoxinas totais) e os laboratórios MIC 06/020, MIC 06/087 e MIC 06/091 (aflatoxinas B, G e total) que informaram valores de “não quantificado” e “menor que limite de quantificação”, nenhum outro laboratório participante reportou a identificação destas micotoxinas.

O laboratório MIC 06/063 não informou os limites de detecção e quantificação para as aflatoxinas do estudo. Com isto não foi possível uma avaliação satisfatória dos seus resultados para as micotoxinas B1 e G1.

Para o laboratório MIC 06/097, os resultados reportados como “não detectado” e “menor que limite de quantificação” onde o valor de referência (Tabela 9) da aflatoxinas estava acima destes limites, foram considerados insatisfatórios. Caso contrário, foram considerados satisfatórios.

Assim, de acordo com os resultados obtidos, oito dos treze laboratórios participantes obtiveram resultados questionáveis ou insatisfatórios para, pelo menos, um dos itens analisados. De um total de cento e seis resultados reportados, 73,6% foram considerados satisfatórios (setenta e oito resultados), 13,2% foram considerados questionáveis (quatorze resultados), e outros 13,2% insatisfatórios (quatorze resultados).

Lembramos que o [índice z](#) é apenas um indicativo do desempenho do laboratório, cabendo a cada laboratório participante fazer a sua interpretação e implementar as ações corretivas, caso necessário.

8. Conclusões

A análise criteriosa dos dados gerados neste EP sugere:

- Desempenho dos laboratórios: pode-se considerar como insatisfatório, uma vez que apenas cinco (38,5 %) dos laboratórios participantes obtiveram os resultados satisfatórios. Se levarmos em consideração os resultados dos laboratórios somente para o somatório das aflatoxinas, como exigido pela legislação, oito laboratórios (61,5 %) obtiveram resultados 100% satisfatórios;
- Preenchimento do formulário: a maioria dos laboratórios preencheu o mesmo conforme estabelecido, contudo, alguns campos importantes ainda foram deixados em branco prejudicando a avaliação dos resultados;
- Ações corretivas: Para os laboratórios que obtiveram resultados insatisfatórios ou questionáveis, ações corretivas devem ser adotadas para o aprimoramento das suas medições, particularmente quando resultados insatisfatórios foram também obtidos em rodada anterior a esse EP. Uma avaliação detalhada, desde o recebimento do material e seu armazenamento, até o preenchimento do Formulário para Registro dos Resultados, e a avaliação de todos os

passos da metodologia de análise, serão importantes para a identificação dos pontos críticos.

Finalmente, é importante ressaltar que o estabelecimento de ações corretivas e a contínua participação em ensaios de proficiência desta natureza são ferramentas de grande contribuição para o aprimoramento das medições realizadas pelos laboratórios.

9. Confidencialidade

Os resultados deste Ensaio de Proficiência são confidenciais, isto é, cada laboratório é identificado por código individual que é conhecido apenas por ele e pela Coordenação deste Ensaio de Proficiência. Os resultados poderão ser utilizados em trabalhos e publicações pelo INCQS respeitando-se a confidencialidade dos laboratórios.

10. Modificações em Relação a Versão Anterior

Foram corrigidos o valor designado e o desvio padrão de *Horwitz*, além dos parâmetros associados ao valor designado, das Aflatoxina B2 e da aflatoxina Total (Tabela 9). Em função disto, foram recalculados os valores de z-score e o desempenho dos laboratórios participantes para estas micotoxinas. As Figuras 2 e 5, 8, 9, 14, 15, 17 e 20 e a Tabela 13 foram modificadas.

11. Referências Bibliográficas

ABNT ISO GUIA 35 – Materiais de Referência – Princípios Gerais e Estatísticos para Certificação, **2012**.

ABNT NBR ISO/IEC 17025. Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração, **2005**.

ABNT NBR ISO/IEC 17043. “Avaliação de Conformidade — Requisitos Gerais para Ensaos de Proficiência.” Rio de Janeiro: ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas, **2011**.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 7 de 18 de fevereiro de **2011**. Diário Oficial da União, Brasília, 9 de março de 2011. Seção I. p. 66.

Horwitz, W; Kamps, L.R; Boyer, K.W; “*Quality Assurance in the Analysis of Foods for Trace Constituents*”; J. Assoc. off Anal. Chem.; 63(6); 1344-1354; **1980**.

Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Vocabulário Internacional de Metrologia: Conceitos Fundamentais e Gerais de Termos Associados (VIM 2012). Duque de Caxias, Rio de Janeiro, **2012**.

International Organization for Standardization – ISO 13528 – “*Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons*”. **2005**.

Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th Edition, *Sampling for Aflatoxins – Preparation for Sample Procedure. Natural Toxins*, 49.2.01, p2, **2005**.

Thompson, M. “Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing”. (DOI: [10.1039/b000282h](https://doi.org/10.1039/b000282h)) Analyst, 125, 385-386, 2000.

12. Laboratórios Participantes

A lista dos laboratórios que enviaram os resultados à coordenação do Programa é apresentada na [Tabela 14](#).

Tabela 14: Laboratórios participantes da 6ª Rodada do Ensaio de Proficiência para Determinação de Micotoxinas em Alimentos – Aflatoxina em Milho.

Instituição
Centro de Qualidade Analítica Ltda – CQA Laboratório de Cromatografia
Cooperativa Agrária Agroindustrial Laboratório de Micotoxinas
Eurofins do Brasil Análises de Alimentos Ltda
Fundação ABC para Assistência e Divulgação Técnica Agropecuária Laboratório de Estudos Ambientais e Resíduos
Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde - LACEN - RS
Fundação Ezequiel Dias Laboratório de Micotoxinas
Laboratório de Micotoxinas SGS do Brasil
Laboratório Nacional Agropecuário – LANAGRO/MG
NFS – Bioensaios – Prestação de Serviços de Análises e Certificação LTDA Química Orgânica – Resíduos e Contaminantes
Pró-Ambiente Análises Químicas e Toxicológicas LTDA Laboratório de Microbiologia
SFDK Laboratório de Análise de Produtos LTDA
TECAM Tecnologia Ambiental Setor de Microbiologia
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) Centro de Pesquisa e Análise de Resíduos e Contaminantes – CEPARC

- Total de participantes: 13 laboratórios
- O código de cada participante **não** está associado à ordem da lista de participantes.

Anexo A – Metodologia para a Atribuição do Valor de Referência

Processo:

Três itens de ensaio foram analisados em três dias distintos. Cada item de ensaio foi analisado em duplicata. O valor de referência de cada aflatoxina foi a média aritmética de todos os resultados.

Analítica:

O procedimento analítico é baseado em um método do *Official Methods of Analysis of AOAC International* (AOAC, 2005).

Para o tratamento da amostra, 6 g de milho foram extraídas com solução de MeOH à 70% (v/v). O extrato foi filtrado, diluído em água e uma alíquota foi eluída em coluna de imunoafinidade contendo anticorpos monoclonais específicos para as aflatoxinas alvo. A coluna foi lavada com água para retirada dos interferentes e em seguida as aflatoxinas carregadas com MeOH.

Os extratos foram analisados por técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência empregando derivatização pós-coluna com iodo. A separação cromatográfica ocorreu em uma coluna C18 (5µm, 250 x 4,6 mm) mantida à 25 °C. Os comprimentos de onda do detector de fluorescência foram fixados em Ex.: 360 nm / Em.: 420 nm. O volume de injeção utilizado foi 50µL. A razão de fluxo da fase móvel (água:acetonitrila:metanol (3:1:1 v/v/v)) foi de 1 mL/min e a solução derivatizante (solução de iodo 0,05% p/v) à 0,3 mL/min. A câmara de derivatização pós-coluna foi mantida à 70 °C.

Incerteza:

A incerteza do valor de referência foi calculada considerando como fonte de incerteza somente a dispersão dos resultados. O fator de abrangência foi calculado em função dos graus de liberdade, para uma confiança de 95%.

Anexo B – Homogeneidade Segundo a Norma ISO 13528

Primeiro, seleciona-se aleatoriamente um número g (onde $g \geq 10$) de amostras do lote de itens de ensaio preparado retiram-se duas porções de teste de cada item de ensaio e realizam-se as análises de todas as porções ($2g$) de forma aleatória, completando-se todas as séries de medição sob condições de repetitividade.

Calcula-se a média, $x_{t..}$, entre as duas porções de teste ($x_{t,1}$ e $x_{t,2}$), para cada amostra, e em seguida, calcula-se a média geral, \bar{X} , definida como a média das médias de cada amostra. A partir destes valores, calcula-se o desvio padrão das médias das amostras, s_x , conforme a Equação 1 e as diferenças entre as porções de teste, w_t , também para cada amostra, a partir da Equação 2.

$$s_x = \sqrt{\sum (x_{t..} - \bar{X})^2 / (g-1)} \quad (1)$$

$$w_t = |x_{t,1} - x_{t,2}| \quad (2)$$

A partir dos valores definidos acima, calcula-se o desvio padrão dentro das amostras s_w e o desvio padrão entre as amostras s_s , conforme as Equações 3 e 4, a seguir:

$$s_w = \sqrt{\sum w_t^2 / (2g)} \quad (3)$$

$$s_s = \sqrt{s_x^2 - (s_w^2 / 2)} \quad (4)$$

As amostras podem ser consideradas adequadamente homogêneas para este ensaio de proficiência, se for atendido o critério definido na Equação 5:

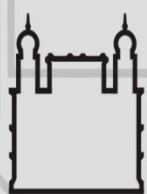
$$s_s \leq 0,3\hat{s} \quad (5)$$

onde, \hat{s} é o desvio padrão alvo, obtido através da equação de *Horwitz* (4.3.3), da concentração média da micotoxina no estudo de homogeneidade.

Caso este critério não seja alcançado, a norma ISO 13528 permite ainda a inclusão da variação existente entre as amostras, no desvio padrão para avaliação de proficiência, conforme a Equação 6:

$$\sigma = \sqrt{\sigma_1^2 + s_s^2} \quad (6)$$

Esta inclusão permite que possíveis variações na homogeneidade entre os itens de ensaio com relação aos valores de concentração, não influenciem diretamente na avaliação de desempenho do laboratório participante do EP. Contudo, inicialmente deve ser verificada a possibilidade de melhorias no processo de preparo das amostras.



FIOCRUZ



INCQS

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz
INCQS - Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde

Av. Brasil 4365 • Manguinhos • CEP 21040 900

Rio de Janeiro • RJ • Brasil

www.incqs.fiocruz.br