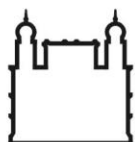


Ensaio de Proficiência em Produtos Sujeitos ao Regime de Vigilância Sanitária (EP/INCQS)

Ensaio de Proficiência para Determinação de Micotoxinas em Alimentos 7ª Rodada Ocratoxina A em Café Torrado

Rodada EP MIC 07/14



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz





**Ensaio de Proficiência para Determinação de Micotoxinas 7ª Rodada
Ocratoxina A em Café Torrado**

RELATÓRIO FINAL

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
Débora Alves Ferreira da Silva
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	5
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.....	6
5. Resultados da Avaliação da Homogeneidade e Estabilidade dos Itens de Ensaio.....	7
5.1. Avaliação da Homogeneidade.....	7
5.2. Avaliação da Estabilidade	7
5.2.1. Estabilidade de Armazenamento.....	7
6. Atribuição dos Valores de Referência	8
7. Avaliação do Desempenho dos Laboratórios Participantes.....	9
7.1. Laboratórios Participantes.....	9
7.2. Resultados dos Laboratórios Participantes	9
7.3. Considerações Sobre as Metodologias de Análise.....	12
7.3.1. Método e Informações Sobre a Metodologia	12
7.3.2. Recuperação, Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	12
7.4. Cálculo do Índice z.....	12
8. Conclusões	17
9. Confidencialidade	17
10. Referências Bibliográficas.....	18
11. Laboratórios Participantes.....	18
Anexo A – Metodologia para a Atribuição do Valor de Referência	19
Anexo B – Homogeneidade Segundo a Norma ISO 13528.....	20

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.

A Ocratoxina A (OTA) é um metabólito secundário produzido, principalmente, por *Aspergillus Ochraceus* e *Penicillium Verrucosum*. A OTA possui potencial carcinogênico, nefrotóxico, e com propriedades imunossupressoras ao homem e aos animais, tendo sido classificada pela agência internacional de pesquisa em câncer (IARC) como grupo 2B, possível carcinógeno humano (IARC 1993). Os níveis de contaminação dessa substância em alimentos são regulamentados em diversos países, incluindo o Brasil (BRASIL, 2011).

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, 7ª Rodada – Ocratoxina A em Café Torrado, 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 a Ocratoxina A em café torrado 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 segue os requisitos da norma [ABNT ISO/IEC 17025](#).

3.1. Escolha da Matriz

O café é um produto de grande importância na balança comercial do país e consumido em larga escala pelos brasileiros, o que torna a escolha relevante no que se refere à vigilância sanitária. Portanto, a sua inocuidade é de suma importância para que estes não venham a causar prejuízos às exportações e riscos à saúde do consumidor.

3.2. Preparo dos Itens de Ensaio

O material foi preparado através da homogeneização de café torrado naturalmente contaminado. A concentração de Ocratoxina A nos itens de ensaio preparados encontra-se próximo à $10 \mu\text{g kg}^{-1}$.

3.3. Homogeneidade e Estabilidade dos Itens de Ensaio

Foram separados aleatoriamente dez itens de ensaio representativos do conjunto preparado para o teste de homogeneidade.

Foi realizado somente o estudo de estabilidade de longa duração, no modelo misto, com as 4 primeiras análises seguindo-se o modelo isócrono e as duas últimas análises de acordo com o modelo clássico, 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 7ª Rodada do Ensaio de Proficiência para Determinação de Micotoxinas em Alimentos – Ocratoxina A em Café Torrado foram enviados dois itens de ensaio, contendo, cada um, 50 ± 2 g de café torrado.

Os itens de ensaio foram enviados aos participantes via SEDEX®, rotulados com as seguintes informações: logo do provedor, 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 todas as informações de como deveriam proceder com os itens de ensaio.

4. Análise dos Resultados

4.1. Resultados das Medições dos Laboratórios

Os laboratórios receberam dois itens de ensaio contendo café torrado e foram orientados a proceder como em análises 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*”, bem como outras informações relevantes sobre técnicas e equipamentos utilizados nos ensaios.

4.2. Estabelecimento dos Valores Designados

Como não foi atingido o mínimo de 11 resultados válidos¹, reportados pelos laboratórios participantes, 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 dos itens de ensaio, bem como para a avaliação do desempenho dos laboratórios participantes estão descritas a seguir.

4.3.1. Análise de Resíduos

A análise de resíduos foi empregada para avaliar a estabilidade dos itens de ensaio de café torrado em relação ao valor de referência da concentração da ocratoxina avaliada 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

¹ Critério 5 do item 12 do protocolo da rodada.

ferramenta estatística de análise de variância (ANOVA). A ocratoxina foi considerada estável 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 do 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:

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

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

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

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 da Ocratoxina A** 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 café torrado preparado.

Para cada item de ensaio foram realizadas duas análises completas utilizando 5g de amostra. Os resultados obtidos estão demonstrados na [Tabela 1](#).

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

Amostra	Ocratoxina A	
	1	2
1	8,44	8,48
2	9,32	8,82
3	7,97	8,65
4	8,43	7,29
5	8,53	7,68
6	6,11	7,79
7	7,91	8,53
8	11,09	8,10
9	8,09	7,97
10	8,43	8,55

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

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

	Média	$\hat{\sigma}$ ⁽¹⁾	$0,3 \hat{\sigma}$	S_x	S_w	S_s	Resultado
Ocratoxina A	8,31	1,83	0,55	0,704	0,863	0,351	Suficientemente Homogêneo

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

Desta forma, consideraram-se os itens de ensaio suficientemente homogêneos para a finalidade deste EP em relação a concentração de ocratoxina presente.

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 da ocratoxina, 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: Resultados do estudo de estabilidade de armazenamento, em $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

Dias	Ocratoxina A	
	Replicata 1	Replicata 2
0	7,65	7,35
25	6,78	7,63
50	8,84	6,93
74	8,33	6,73
100	7,54	7,97
126	8,36	8,50

Tabela 4: Análise de regressão para a ocratoxina em café torrado, em $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ dias}^{-1}$.

	Coeficiente Angular	Erro padrão	Intervalo de confiança		Resultado
			Inferior	Superior	
Ocratoxina A	0,00681	0,00289	-0,00122	0,01485	Estável

Os resultados obtidos no tratamento estatístico dos dados gerados nos estudos de estabilidade de armazenamento, e estudos prévios de estabilidade de transporte² à 25 e 50 °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 os itens de ensaio mostraram-se suficientemente estáveis nas condições estabelecidas nestes estudos.

6. Atribuição dos Valores de Referência

O valor de referência relativo à ocratoxina empregada 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 5.

Tabela 5: Valores de referência (VR), incertezas e desvios padrão, em $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

Ocratoxina	Valor de Referência	u_c (VR)	k	U (VR)	Desvio Padrão (σ_H)
A	8,54	0,14	2,65	0,37	1,88

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

² Para maiores esclarecimentos, consultar o relatório do EP de micotoxinas em alimentos, 4ª rodada, MIC 04/12, 2012.

7. Avaliação do Desempenho dos Laboratórios Participantes

7.1. Laboratórios Participantes

Seis laboratórios se inscreveram na *7ª Rodada do Programa de Ensaio de Proficiência para a Determinação de Micotoxinas em Alimentos – Ocratoxina A em Café torrado*, e cinco (83,3) dos participantes enviaram os resultados.

Dos laboratórios participantes, somente um (20,0 %) é acreditado na norma ISO/IEC 17025 na análise de ocratoxina em café. A maioria dos participantes (quatro, 80,0%) utilizou metodologia analítica completamente validada para a análise em questão.

7.2. Resultados dos Laboratórios Participantes

Os dados reportados pelos laboratórios participantes dos itens de ensaio foram tratados de acordo com os procedimentos descritos na [ISO/IEC 17043](#). As Tabelas 6 e 7 apresentam os resultados dos laboratórios para a análise da ocratoxina, 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 a ocratoxina deste EP, encontra-se na Figuras 1. Neste gráfico a linha central representa o valor de referência e as linhas pontilhadas em azul a incerteza expandida do valor de referência.

Tabela 6: 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) e Composição da Fase Móvel, Fluxo ($\mu\text{L min}^{-1}$).

Laboratório	Método		Massa Amostra	Solvente Extração	Limpeza Amostra	Técnica de Análise	Detector	Vol. Injeção	Fase Móvel	Fluxo
	Acreditado	Validado								
MIC 07/041	S	S	5	MeOH + NaHCO_3	IA	CLAE	F	200	C18	-
MIC 07/056	N	Em processo	22	MeOH	IA	CLAE	F	75	C18	1
MIC 07/084	N	S	5	MeOH + H_2O	IA	ELISA	-	-	-	-
MIC 07/096	N	S	25	MeOH + NaHCO_3	IA	CLAE	F	20	C18	0,8
MIC 07/134	N	S	10	MeOH + NaHCO_3	IA	CLAE	F	50	C18	0,8

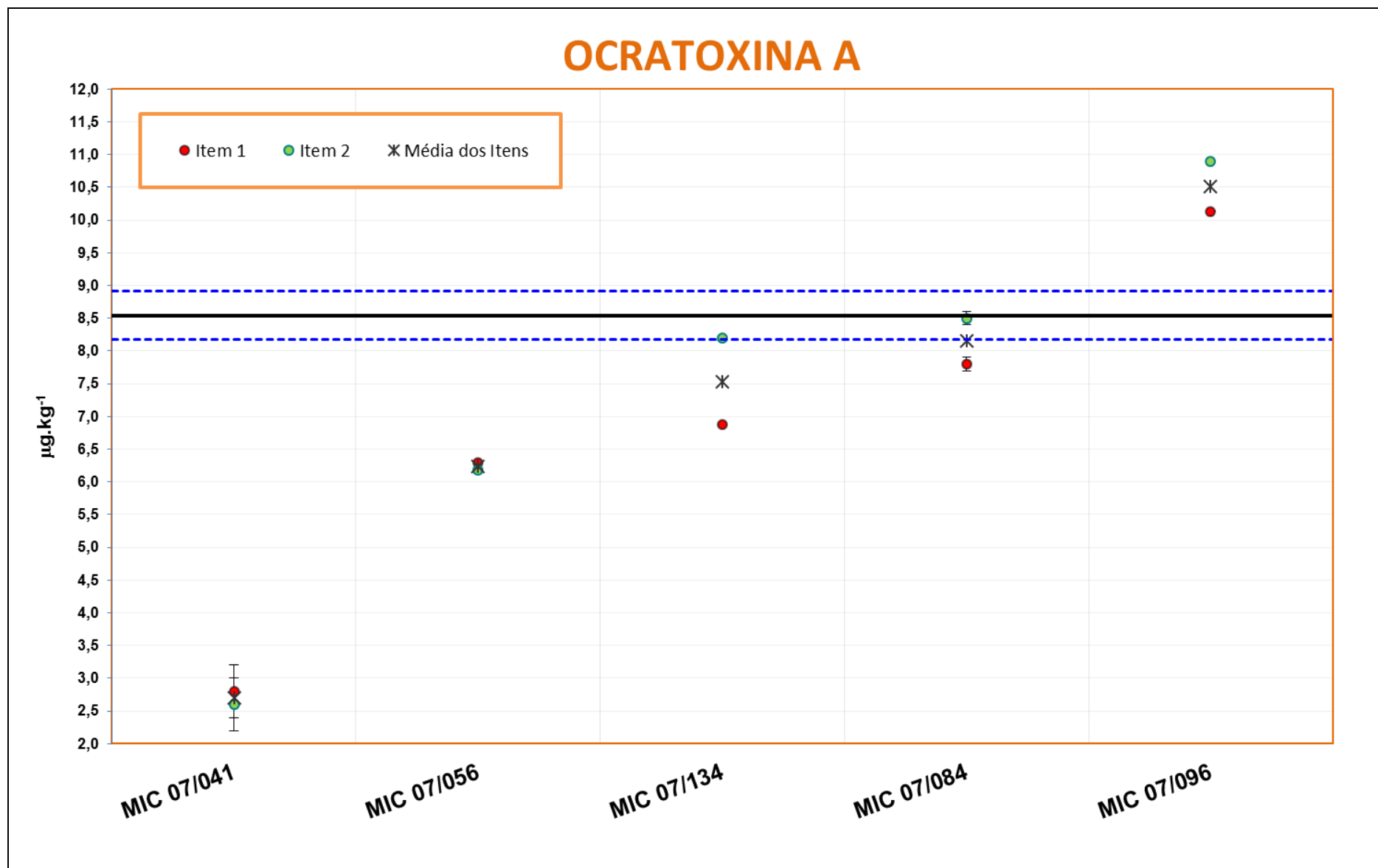
MeOH = Metanol; NaHCO_3 = Bicarbonato de sódio; IA = Imunoafinidade; CLAE = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e F = Fluorescência

Tabela 7: Resultados por análise (Resultado e Incerteza expandida (U); $\mu\text{g kg}^{-1}$) e Parâmetros: Limite de Detecção ($\mu\text{g kg}^{-1}$), Limite de Quantificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$) e Recuperação (%).

Laboratórios	OCRATOXINA A							
	Resultados					Parâmetros de validação		
	Item Nº	[Ocrat A]	Item Nº	[Ocrat A]	U	Limite de Detecção	Limite de Quantificação	Recuperação
MIC 07/041	16	2,8	17	2,6	0,42;0,39	0,3	1	80-120
MIC 07/056	06	6,3	12	6,18	-	-	1	93
MIC 07/084	09	7,8	14	8,5	0,1	1,9	2	-
MIC 07/096	03	10,13	17	10,89	-	0,1	0,2	84,28
MIC 07/134	11	6,87	15	8,2	-	0,25	0,8	-

Nº = número; [Ocrat A] = concentração de ocratoxina A

Figura 1: Dispersão dos resultados da Ocratoxina A em café torrado



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 6 e 7), podemos considerar o seguinte:

7.3.1. Método e Informações Sobre a Metodologia

Dos cinco laboratórios participantes, somente um (20,0 %) é acreditado para esta análise nos requisitos da norma ISO 17025 e outros quatro (80,0 %) tem a metodologia completamente validada.

A cromatografia em fase líquida de alta eficiência foi a técnica de separação e quantificação utilizada por quatro (80%) laboratórios, todos utilizaram o detector de fluorescência, um dos laboratório utilizou uma metodologia imunoenzimática.

A menor massa de amostra utilizada foi de 5g e a maior 25g. Os volumes de injeção variaram de 20 à 200 µL.

Todos os que utilizaram a cromatografia como técnica de separação utilizaram coluna C18 e os cinco laboratórios participantes utilizaram coluna de imunoafinidade para a limpeza da amostra.

7.3.2. Recuperação, Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Dois laboratórios (MIC 07/084 e MIC 07/134) não informaram os valores de recuperação. O laboratório MIC 07/056 também não informou os limites de detecção, porém informou que a metodologia ainda está em processo de validação.

7.4. Cálculo do Índice z

A avaliação de desempenho dos laboratórios participantes, expressa através do índice z (Equação 5), está apresentada na Tabela 8.

Tabela 8: Valores do índice z obtidos pelos laboratórios participantes.

Código do Laboratório	Ocratoxina A			
	Item Nº	Índice z	Item Nº	Índice z
MIC 07/041	16	-3,1	17	-3,2
MIC 07/056	06	-1,2	12	-1,3
MIC 07/084	09	-0,4	14	0,0
MIC 07/096	03	0,8	17	1,2
MIC 07/134	11	-0,9	15	-0,2

Nº = número do item de ensaio; Vermelho = resultado insatisfatório.

As Figuras de 2 e 3 apresentam os resultados de índice z obtidos pelos laboratórios participantes para a ocratoxina A nos dois itens de ensaio deste EP.

A Figura 4 apresenta o gráfico de dispersão semelhante 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 2: Gráfico de índice z dos laboratórios participantes para a Ocratoxina A, item 1.

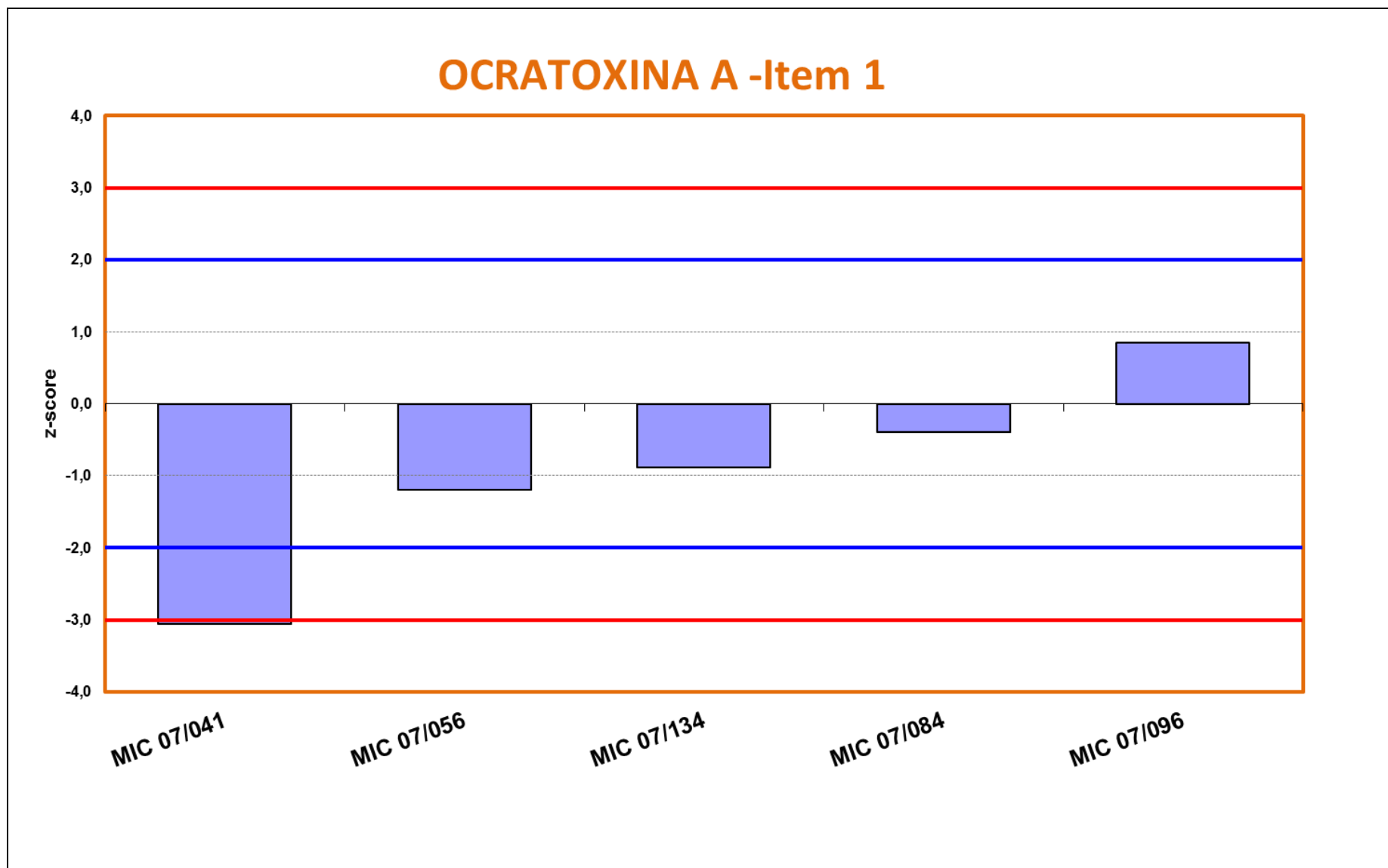


Figura 3: Gráfico de índice z dos laboratórios participantes para a Ocratoxina A, item 2.

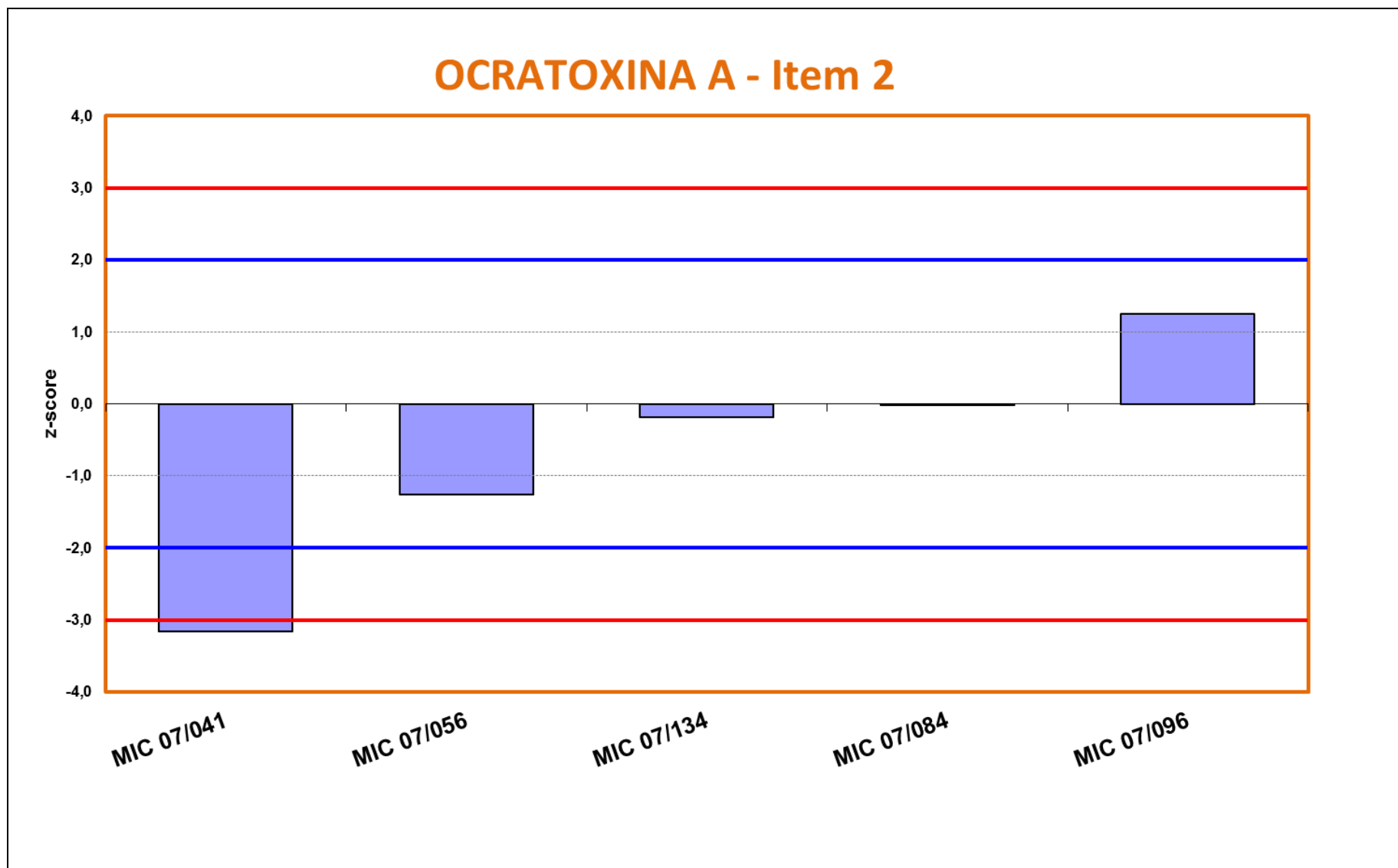
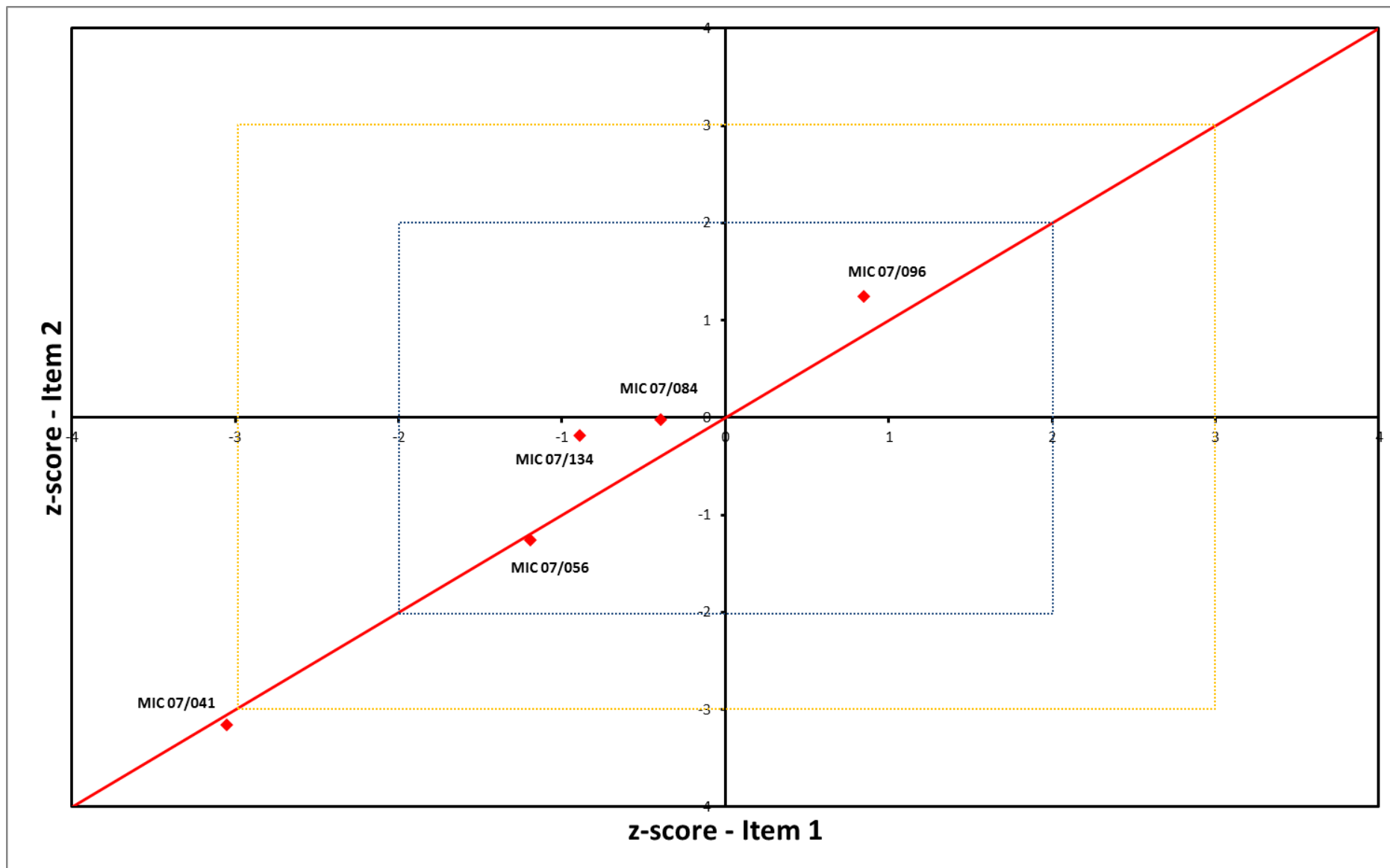


Figura 4: Gráfico semelhante ao de *Youden* dos laboratórios participantes para a Ocratoxina A.



Assim, de acordo com os resultados obtidos, quatro dos cinco laboratórios participantes obtiveram resultados satisfatórios para os dois itens analisados. De um total de dez resultados reportados, 80,0% foram considerados satisfatórios (oito resultados) e outros 20,0% insatisfatórios (dois 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 satisfatório, uma vez que apenas um (20,0 %) dos laboratórios participantes obteve resultados insatisfatórios;
- 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. 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 Ensaio 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**.

IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 56. *Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins*. IARC Press, Lyon, **1993**.

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**.

Pittet, A.; Tornare, D.; Huggett, A; Vianni, R.. “Liquid Chromatographic Determination of Ochratoxin A in Pure and adulterated soluble coffee using an immunoaffinity column cleanup procedure”. J. Agric. Food Chem; vol. 44, Nº11, **1996**.

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**.

11. Laboratórios Participantes

A lista dos laboratórios que enviaram os resultados à coordenação do Programa é apresentada na [Tabela 9](#).

Tabela 9: Laboratórios participantes da 7ª Rodada do Ensaio de Proficiência para Determinação de Micotoxinas em Alimentos – Ocratoxina A em Café Torrado.

Instituição
SFDK Laboratório de Análise de Produtos LTDA
Fundação Ezequiel Dias – FUNED Laboratório de Micotoxinas
Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL Unidade Laboratorial de Referência de Microbiologia
TECAM Tecnologia Ambiental Laboratório de Microbiologia – Micotoxinas
Centro de Qualidade Analítica Cromatografia

- Total de participantes: 5 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 da ocratoxina A foi a média aritmética de todos os resultados.

Analítica:

O procedimento analítico é baseado no método de Pittet, A. e colaboradores (1996) com modificações nas condições cromatográficas.

Para o tratamento da amostra, $5 \pm 0,1\text{g}$ de café torrado foram extraídas com solução de MeOH: bicarbonato de sódio 3% (1:1 v/v). O extrato foi filtrado, uma alíquota diluída em água e filtrada em papel de filtro de microfibras. Uma alíquota do filtrado foi eluída em coluna de imunoafinidade contendo anticorpos monoclonais específicos para a ocratoxina A. A coluna foi lavada com água para retirada dos interferentes e em seguida a ocratoxina foi carregada da coluna com MeOH.

Os extratos das amostras foram analisados por técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência. A separação cromatográfica ocorreu em uma coluna C18 (5 μm , 250 x 4,6 mm) mantida à 40 °C. Os comprimentos de onda do detector de fluorescência foram fixados em Ex.: 336 nm / Em.: 468 nm. O volume de injeção igual a 20 μL . A razão de fluxo da fase móvel (acetonitrila : ácido acético 2% (1:1 v/v/v)) foi de 1 mL/min.

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:

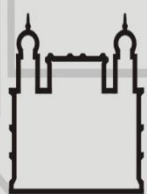
$$s_s \leq 0,3\hat{s} \quad (5)$$

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