

Relatório Final do Ensaio de
Proficiência para Determinação
de Micotoxinas em Alimentos
1ª Rodada – Matriz Amendoim

ENSAIO DE PROFICIÊNCIA PARA DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS EM ALIMENTOS – 1ª RODADA – MATRIZ AMENDOIM

RELATÓRIO FINAL – Nº 002/10

ORGANIZAÇÕES PROMOTORAS DO ENSAIO DE PROFICIÊNCIA



Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - Inmetro
Diretoria de Metrologia Científica e Industrial - Dimci
Endereço: Av. Nossa Senhora das Graças, 50 – Xerém – Duque de Caxias
RJ – Brasil – CEP: 25250-020
E-mail para contato: pep-dimci@inmetro.gov.br



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

COMITÊ DE ORGANIZAÇÃO

Armi Wanderley da Nóbrega (INCQS/Fiocruz)
Damares da Silva Santos (Inmetro/Dimci/Dicep)
Marcus Henrique Campino de la Cruz (INCQS/Fiocruz)
Maria Helena Wohlers M. Cardoso (INCQS/Fiocruz)
Paulo Roberto da Fonseca Santos (Inmetro/Dimci/Dicep)

COMITÊ TÉCNICO

André Victor Sartori (INCQS/Fiocruz)
Eliane Cristina Pires do Rego (Inmetro/Dimci/Dquim)
Fernando Gustavo Marques Violante (Inmetro/Dimci/Dquim)
Joyce Costa Andrade (Inmetro/Dimci/Dicep)
Maria Heloisa Paulino de Moraes (INCQS/Fiocruz)
Pauline Silva de Oliveira (INCQS/Fiocruz)
Raquel Duarte da Costa Cunha Bandeira (Inmetro/Dimci/Dquim)
Rosana Pereira dos Santos (INCQS/Fiocruz)
Thais Matsue Uekane (Inmetro/Dimci/Dquim)
Valnei Smarçaro da Cunha (Inmetro/Dimci/Dquim)

ÍNDICE

1. Introdução.....	3
2. Objetivos.....	4
3. Preparo e Envio dos Itens de Ensaio	4
3.1. Preparo do Amendoim.....	4
3.2. Homogeneidade e Estabilidade dos Itens de Ensaio	4
3.3. Envio dos Itens de Ensaio	5
3.4. Instruções de Uso do Material para o Ensaio de Proficiência	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	6
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.....	7
4.3.4. Índice z	8
4.3.5. Análise Robusta.....	9
5. Resultados da Avaliação da Homogeneidade e Estabilidade.....	10
5.1. Avaliação da Homogeneidade	10
5.2. Avaliação da Estabilidade.....	11
6. Atribuição dos Valores Designados.....	14
7. Avaliação do Desempenho dos Laboratórios Participantes.....	14
7.1. Laboratórios Participantes	14
7.2. Resultados dos Laboratórios Participantes.....	14
7.3. Cálculo do Índice z	22
8. Conclusões	29
9. Referências Bibliográficas.....	30
10. Laboratórios participantes.....	31

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. Embora o número de provedores de ensaios de proficiência na área de alimentos seja grande, principalmente de provedores internacionais, os custos cobrados para a participação nestes ensaios são, normalmente, muito elevados, o que inviabiliza, em muitos casos, a participação de um laboratório em um número maior de ensaios.

Micotoxinas são um grupo de substâncias formadas como metabólitos secundários de fungos, destacando-se a classe das chamadas aflatoxinas devido ao potencial tóxico e de contaminação de alimentos. Uma avaliação dos níveis residuais destas substâncias em produtos agrícolas é extremamente importante, pois pode ser um indicativo de que às boas práticas agrícolas não estejam sendo seguidas.

Uma variedade de micotoxinas pode ser encontrada na maioria dos alimentos, em concentrações muito baixas (da ordem de $\mu\text{g}/\text{kg}$), portanto, a identificação e a quantificação destas substâncias nas diversas matrizes torna-se extremamente complexa. Não obstante, é crescente a exigência no mercado internacional quanto a níveis de resíduos de contaminantes em alimentos, cada vez mais reduzidos. No Brasil, os níveis de contaminação das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 são regulamentados em alimentos, incluindo amendoim.

Este relatório apresenta os resultados da avaliação de desempenho dos laboratórios participantes da segunda rodada do Ensaio de Proficiência promovido em parceria pela Diretoria de Metrologia Científica e Industrial (Dimci) do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Inmetro) e pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), para a determinação de micotoxinas em alimentos.

2. Objetivos

O objetivo deste EP é fornecer aos laboratórios participantes uma ferramenta efetiva para verificar sua competência nos ensaios de identificação de micotoxinas em alimento, utilizando suas metodologias de rotina. Este EP também contribui para:

- monitorar o desempenho contínuo dos laboratórios de análise de resíduos de micotoxinas em alimentos;
- identificar problemas na metodologia aplicada pelo laboratório participante e iniciar ações corretivas;
- aumentar a confiança nos resultados das medições dos laboratórios participantes;
- apoiar os laboratórios na solicitação da acreditação ou sua manutenção segundo a NBR ISO/IEC 17025.

3. Preparo e Envio dos Itens de Ensaio

Os procedimentos de amostragem, preparo dos itens de ensaio e análise foram realizados no Laboratório de Resíduos de Micotoxinas do INCQS/FIOCRUZ.

3.1. Preparo do Amendoim

A amostra foi preparada pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Saúde (INCQS) a partir de um lote de amendoim adquirido no comércio da cidade do Rio de Janeiro em 2008. O amendoim sem pele, 2,0 kg, utilizado no preparo do material, foi moído por 20 min em moinho GEIGER com a mesma quantidade de água, a qual foi fortificada com as aflatoxinas. A lama preparada (*slurry*) foi então seca em estufa, triturada e a farinha resultante passada por peneira com 1,68 mm de poro. O material foi novamente seco em estufa, homogeneizado e dividido em alíquotas de 50 ± 5 g que foram envasados a vácuo em saches, formando cada sache um item de ensaio. Estes foram armazenados em freezer (-15 °C), até o momento de serem enviados aos laboratórios participantes.

3.2. Homogeneidade e Estabilidade dos Itens de Ensaio

Foram separados aleatoriamente cinco itens de ensaio representativos do conjunto preparado para o teste de homogeneidade. A amostra de amendoim de cada item de ensaio foi dividida em duas partes, que foram analisadas de forma independente.

Para o estudo de estabilidade, os itens de ensaio contendo o amendoim, reservados para este estudo, foram avaliados em cinco períodos diferentes, compreendidos entre o preparo do item de ensaio pelo laboratório e o período final de entrega dos resultados.

Os testes estatísticos foram feitos segundo a ISO GUIDE 35 e a norma ISO 13528, e os resultados obtidos nos testes estão apresentados nos itens 5.1 e 5.2 deste relatório.

3.3. Envio dos Itens de Ensaio

Para cada laboratório inscrito na 1ª Rodada do Ensaio de Proficiência para Determinação de Micotoxinas em Alimentos foi enviado um item de ensaio contendo cerca de 50 g de amendoim. Estes foram enviados por via aérea em uma caixa de isopor com gelo seco e devidamente lacrada.

3.4. Instruções de Uso do Material para o Ensaio de Proficiência

As instruções de uso do material relativo ao ensaio de proficiência foram enviadas junto com os itens de ensaio, aos laboratórios inscritos na Rodada.

4. Análise dos Resultados

4.1. Resultados das medições dos laboratórios

Os laboratórios receberam um item de ensaio contendo amostra de amendoim e foram orientados a proceder conforme a rotina do laboratório. Além dos resultados analíticos, expressos em $\mu\text{g}/\text{kg}$, os laboratórios participantes informaram também a recuperação (%), o limite de detecção e o limite de quantificação, inerentes ao método empregado.

Os laboratórios foram orientados também a prestarem algumas informações relevantes, através do Formulário de Envio de Resultados, sobre as técnicas e os equipamentos utilizados nos ensaios.

4.2. Estabelecimento dos valores designados

As técnicas de estatística robusta são utilizadas para minimizar a influência que resultados extremos podem ter sobre estimativas de média e desvio-padrão. Sendo assim, a Coordenação deste Ensaio de Proficiência adotou como valor designado para as medidas de Aflatoxinas B1, B2, G1, G2 e total aqueles oriundos do cálculo da estatística robusta apresentado no item 5.6 da Norma ISO 13528, que é uma norma específica de métodos estatísticos para uso em EP por comparações interlaboratoriais. Seguindo os critérios desta norma, os valores designados foram obtidos pela média robusta dos resultados emitidos **por todos os laboratórios participantes que reportaram valores acima dos limites de quantificação¹, que trabalharam com o mínimo de 25g, e pelo INCQS**, conforme os procedimentos estatísticos descritos no item 4.3.5 deste relatório.

¹ Os laboratórios foram orientados a reportarem os seus resultados corrigidos pela recuperação. Portanto, os laboratórios que de alguma forma declararam ou mencionaram que não corrigiram seus resultados pela recuperação, não foram considerados no cálculo dos valores designados.

4.3. Análise Estatística

Neste tópico estão descritas as análises estatísticas utilizadas para a obtenção dos valores designados, para a avaliação da homogeneidade e da estabilidade das amostras, assim como para a avaliação do desempenho dos laboratórios participantes.

4.3.1. Análise de Resíduos

A análise de resíduos foi empregada para avaliar a estabilidade das amostras de amendoim em relação aos valores de referência das concentrações das micotoxinas utilizados neste EP. A análise de resíduos consiste em estimar a variância dos valores utilizados na regressão linear e observar se os valores de concentração apresentam alguma tendência, através da ferramenta estatística de análise de variância (ANOVA). Caso a inclinação da reta ou a não-linearidade não forem significativas, a amostra é considerada estável.

4.3.2. Avaliação da Homogeneidade dos Itens de Ensaio

A Norma ISO 13528:2005 no item 4.4, anexo B, fornece procedimentos para avaliar se as amostras do EP estão adequadamente homogêneas e estáveis para o propósito do ensaio. Esta norma oferece ainda a possibilidade de incluir o desvio padrão devido à heterogeneidade das amostras, no desvio padrão de avaliação de proficiência. O procedimento abordado pela norma ISO 13528 para avaliação da homogeneidade dos itens de ensaio encontra-se resumidamente descrito a seguir:

Primeiramente, deve-se selecionar aleatoriamente um número g de amostras do lote de itens de ensaio preparado, onde $g \geq 10$, retirar duas porções de teste de cada item de ensaio e realizar a análise de todas as porções ($2g$) de forma aleatória, completando todas as séries de medição sob condições de repetitividade. **Este número pode ser menor se dados adequados estão disponíveis por análises de homogeneidades prévias em amostras similares preparadas pelo mesmo procedimento.**

Calcular a média, $x_{t..}$, entre as duas porções de teste ($x_{t,1}$ e $x_{t,2}$), para cada amostra, e em seguida, calcular a média geral, \bar{x} , definida como a média das médias de cada amostra. A partir destes valores, calcular o desvio padrão das médias das amostras, s_x , conforme a Equação 1. Definir 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, calcular 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:

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

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

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

$$s_s \leq 0,3s^* \quad (5)$$

Onde, s^* é o desvio padrão para avaliação de proficiência, que neste EP foi obtido através da equação de Horwitz (4.3.3), para cada micotoxina estudada.

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.

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 por um modelo geral, conforme item 6.4 da norma ISO 13528:2005. O modelo adotado nesta avaliação para o cálculo do desvio padrão está fundamentado no modelo de Horwitz, (Horwitz 1980) (Equação 7), que expressa a precisão interlaboratorial em termos de um desvio padrão de reprodutibilidade.

$$\sigma_H = 0,02c^{0,8495} \quad (7)$$

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

Estudos colaborativos conduzidos recentemente mostraram que em rodadas em que a concentração do analito está abaixo de 100 ppb, o desvio padrão de reprodutibilidade encontra-se sistematicamente abaixo do previsto pela equação de Horwitz. Com base nestes estudos, Thompson (Thompson, 2000) sugeriu uma modificação da equação de Horwitz levando em consideração os níveis de concentração do analito expressos em fração mássica, conforme as Equações 8, 9 e 10:

$$\sigma = 0,22c \quad , \quad \text{se } c < 1,2 \times 10^{-7} \quad (8)$$

$$\sigma = 0,02c^{0,8495} \quad , \quad \text{se } 1,2 \times 10^{-7} \leq c \leq 0,138 \quad (9)$$

$$\sigma = 0,01c^{0,5} \quad , \quad \text{se } c > 0,138 \quad (10)$$

Onde : c é o nível de concentração expresso em fração mássica e σ é o desvio padrão de Horwitz modificado.

4.3.4. Índice z

Para a qualificação dos resultados dos laboratórios, o índice z (z-score) foi calculado representando uma medida da distância relativa do resultado da medição do laboratório em relação ao valor designado do ensaio de proficiência. O índice z foi calculado conforme apresenta a Equação 11.

$$z = \frac{y_i - y_{ref}}{\sigma} \quad (11)$$

Onde: y_i representa o valor do laboratório participante, y_{ref} representa o valor designado e σ , o desvio padrão de Horwitz modificado.

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

4.3.5. Análise Robusta

A Norma ISO 13528 é um documento complementar à ISO GUIA 43 e fornece os métodos estatísticos a serem empregados nos ensaios de proficiência. Este documento descreve a análise robusta envolvendo o emprego da estimativa do algoritmo A para o cálculo do valor designado e do desvio padrão. Neste EP, somente o valor designado foi calculado através da análise robusta, sendo o desvio padrão estimado através das equações derivadas do modelo geral de Horwitz (item 4.3.4).

Inicialmente, todos os valores objetos da análise (valores dos laboratórios participantes e do INCQS) foram colocados em ordem crescente. A seguir, foram calculados os valores da mediana de x_i (x^*) e do desvio padrão (s^*), conforme as Equações 12 e 13.

$$x^* = \text{mediana de } x_i \quad (12)$$

$$s^* = 1,483 \times \text{med} |x_i - x^*| \quad (13)$$

Onde: *med* é a mediana; x_i valor de concentração reportado pelo laboratório.

Em seguida, foi calculado o valor de F_i , segundo a Equação 14, e a partir da estimativa de F_i , calculou-se o novo valor inferior (concentração inferior), e o novo valor superior (concentração superior), através das Equações 15 e 16.

$$F_i = 1,5s^* \quad (14)$$

$$\text{Novo Valor Superior} = x^* + F_i \quad (15)$$

$$\text{Novo Valor Inferior} = x^* - F_i \quad (16)$$

Os novos valores, superior e inferior, foram comparados a cada um dos resultados individuais dos laboratórios participantes, e os que estavam acima do valor superior ou abaixo do valor inferior foram descartados, ou seja, foram considerados valores dispersos ou discrepantes e substituídos pelos novos valores superiores e inferiores. Este procedimento compreende a um ciclo ou **Ciclo 0**.

Iniciou-se um novo ciclo, a partir do cálculo da média robusta $(x^*)^2$ e do desvio padrão (s) dos novos valores encontrados, e a seguir calculou-se o novo desvio padrão robusto $(s^*)^3$. O novo valor de s^* foi calculado pela Equação 17:

$$S^*=1,134 s \quad (17)$$

Em seguida, calculou-se novamente o valor de F_i , os novos valores superiores e inferiores, conforme descrito, respectivamente, nas Equações 15, 16 e 17, sendo os valores discrepantes substituídos pelos novos limites. Este procedimento corresponde a outro ciclo ou **Ciclo 1**.

O ciclo é reiniciado até o momento em que os valores da nova média robusta (x^*) e do novo desvio padrão robusto (s^*) convergirem, ou seja, até que não haja nos ciclos, diferença entre eles. Neste momento o ciclo é finalizado e os novos valores de x^* e s^* , que são os valores da média robusta (valor designado do EP) e do desvio padrão robusto.

5. Resultados da Avaliação da Homogeneidade e Estabilidade

5.1. Avaliação da Homogeneidade

Apesar dos esforços para assegurar a homogeneidade do item de ensaio preparado para um EP e outros estudos interlaboratoriais, estes materiais possuem geralmente um determinado grau de heterogeneidade. Quando este material é dividido em amostras e distribuído aos laboratórios, estas apresentam uma pequena variação na composição entre elas. Este estudo tem como objetivo determinar, através do procedimento descrito no item 4.3.2 deste relatório, se a variação na composição entre as amostras distribuídas é suficientemente pequena para o objetivo do Ensaio de Proficiência.

Para o teste de homogeneidade foram separados, aleatoriamente, 5 itens de ensaio⁴ contendo cada um aproximadamente 50 g de amostra, representativas dos itens de ensaio preparados. Para cada item de ensaio foram realizadas duas análises completas produzindo, para cada analito, dois resultados (A e B), conforme dispostos na Tabela 3.

² Na ISO 13528 quando se inicia o **Ciclo 1**, x^* passa a ser denominado como média robusta, uma vez que advém de um algoritmo robusto.

³ Na ISO 13528 quando se inicia o **Ciclo 1**, s^* passa a ser denominado como desvio padrão robusto, uma vez que advém de um algoritmo robusto.

⁴ Optou-se por 5 amostras pois a quantidade de itens de ensaio preparada era pequena. Com isto, abriu-se a possibilidade de mais laboratórios participarem deste EP. Estudos prévios, com outro lote preparado da mesma maneira, indicavam uma homogeneidade adequada.

Tabela 3: Dados gerados no teste de homogeneidade

Identificação da Amostra	AFLATOXINA									
	B1 (µg/kg)		B2 (µg/kg)		G1(µg/kg)		G2(µg/kg)		Total (µg/kg)	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1	2,67	2,44	0,98	0,93	2,10	2,29	0,77	0,83	6,51	6,49
2	2,53	2,62	0,97	0,99	2,38	2,46	0,80	0,80	6,69	6,88
3	2,48	2,31	0,94	0,91	2,22	2,11	0,71	0,72	6,36	6,06
4	2,36	2,49	0,92	0,96	2,26	2,37	0,85	0,76	6,40	6,58
5	2,29	2,38	0,92	0,92	2,14	2,38	0,74	0,81	6,09	6,49

Os resultados obtidos, para os valores de desvio padrão entre as amostras (s_s) e para o valor do limite $0,3*s^*$, para as Aflatoxinas do estudo, estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Resultado dos testes de homogeneidade

Aflatoxina	s_s	$0,3*s^*$	Resultado
B1	0,073	0,162	Homogeneidade Suficiente
B2	0,018	0,062	Homogeneidade Suficiente
G1	0,068	0,150	Homogeneidade Suficiente
G2	0,022	0,051	Homogeneidade Suficiente
Total	0,183	0,426	Homogeneidade Suficiente

Conforme observado na Tabela 4, todos os valores de desvio padrão entre as amostras (s_s), para as micotoxinas deste estudo foram menor do que o limite $0,3*s^*$, equivalente a aproximadamente um terço do desvio padrão para avaliação de proficiência. Assim, de acordo com estes resultados, os itens de ensaio foram considerados suficientemente homogêneos com relação aos valores de concentração das **Aflatoxinas**.

5.2. Avaliação da Estabilidade

Para assegurar que as amostras utilizadas no ensaio de proficiência estavam estáveis no período do ensaio, foi realizado um estudo de estabilidade. Este estudo visa identificar se há uma reprodutibilidade nas determinações da micotoxina ao longo do tempo. A avaliação foi realizada utilizando-se a análise de resíduos da regressão linear.

Os dados obtidos pelo INCQS/Fiocruz para o estudo de estabilidade da amostra encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5: Dados obtidos para o estudo de estabilidade

Data da análise	AFLATOXINAS									
	B1		B2		G1		G2		Total	
	µg/kg	Média	µg/kg	Média	µg/kg	Média	µg/kg	Média	µg/kg	Média
30/09/2009	2,47	2,46	0,95	0,94	2,22	2,27	0,78	0,78	6,41	6,45
	2,45		0,94		2,32		0,78		6,50	
10/02/2010	2,36	2,47	1,02	1,03	2,40	2,40	0,74	0,69	6,52	6,60
	2,58		1,05		2,40		0,64		6,68	
15/03/2010	2,38	2,42	1,01	1,00	2,36	2,28	0,91	0,91	6,66	6,61
	2,46		0,99		2,20		0,90		6,55	
24/05/2010	2,22	2,19	1,00	0,98	2,01	2,03	0,74	0,74	5,97	5,94
	2,16		0,97		2,05		0,74		5,92	
01/06/2010	2,40	2,32	0,95	0,91	2,30	2,26	0,88	0,82	6,53	6,32
	2,24		0,87		2,22		0,77		6,10	

As Tabelas de 6 a 10 apresentam os resultados obtidos na estimativa da variância dos valores utilizados na regressão linear segundo a ISO GUIDE 35.

Tabela 6: Análise de regressão para o Aflatoxina B1

ANOVA – AFLATOXINA B1				
	<i>GI</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>
Regressão	1	0,020655194	0,020655194	1,822563243
Resíduo	3	0,033999139	0,011333046	
Total	4	0,054654333		
	Coeficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P
Interseção	2,496533788	0,103081829	24,21895114	0,000154293
Variável X 1	-0,000425039	0,000314838	-1,350023423	0,269832573

Tabela 7: Análise de regressão para o Aflatoxina B2

ANOVA – AFLATOXINA B2				
	<i>GI</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>
Regressão	1	0,000122655	0,000122655	0,039807441
Resíduo	3	0,009243587	0,003081196	
Total	4	0,009366242		
	Coeficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P
Interseção	0,965276231	0,053748757	17,95904297	0,000376526
Variável X 1	3,27533E-05	0,000164162	0,199518023	0,854615393

Tabela 8: Análise de regressão para o Aflatoxina G1

ANOVA – AFLATOXINA G1				
	<i>GI</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>
Regressão	1	0,006403797	0,006403797	0,28709313
Resíduo	3	0,066916935	0,022305645	
Total	4	0,073320732		
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>
Interseção	2,317777994	0,144615943	16,02712634	0,000528263
Variável X 1	-0,000236664	0,000441694	-0,535810722	0,629267711

Tabela 9: Análise de regressão para o Aflatoxina G2

ANOVA – AFLATOXINA G2				
	<i>GI</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>
Regressão	1	0,000222118	0,000222118	0,025086011
Resíduo	3	0,026562818	0,008854273	
Total	4	0,026784937		
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>
Interseção	0,774807123	0,091114025	8,503708665	0,003415362
Variável X 1	4,40764E-05	0,000278285	0,158385641	0,884214106

Tabela 10: Análise de regressão para o Aflatoxina TOTAL

ANOVA – AFLATOXINA TOTAL				
	<i>GI</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>
Regressão	1	0,039110716	0,039110716	0,450292396
Resíduo	3	0,260568795	0,086856265	
Total	4	0,29967951		
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>
Interseção	6,554395135	0,285370685	22,96800438	0,000180778
Variável X 1	-0,000584873	0,000871594	-0,671038297	0,550240647

Os resultados obtidos do tratamento estatístico dos dados gerados mostraram que, o valor de P calculado foi maior do que 0,05 (nível de confiança de 95 %) em todas as Micotoxinas deste EP, podendo-se concluir que não houve diferença significativa entre os valores e, dessa forma, os itens de ensaio são considerados estáveis nas condições de estudo.

6. Atribuição dos Valores Designados

Os valores designados relativo às Aflatoxinas empregada neste ensaio de proficiência foram calculados segundo procedimento estatístico descrito no item 4.3.5, e os desvios padrões para avaliação de proficiência foram obtidos pela equação modificada baseadas no modelo de Horwitz, conforme o item 4.3.3. Os valores designados com seu respectivo desvio padrão estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Valores designados e desvios padrões

Micotoxina	Valor designado ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Desvio Padrão (σ) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Aflatoxina B1	1,901	0,418
Aflatoxina B2	0,855	0,188
Aflatoxina G1	2,064	0,454
Aflatoxina G2	0,658	0,145
TOTAL	5,619	1,236

7. Avaliação do Desempenho dos Laboratórios Participantes

7.1. Laboratórios Participantes

Dezoito laboratórios, limite máximo estipulado no Protocolo, se inscreveram na 1ª Rodada do Programa de Ensaio de Proficiência para a Determinação de Aflatoxinas em Amendoim e dezesseis (89 %) enviaram os resultados. Destes dez laboratórios, sete (44 %) eram acreditados para este escopo.

7.2. Resultados dos Laboratórios Participantes

Os dados reportados pelos laboratórios participantes do ensaio de proficiência foram tratados de acordo com os procedimentos descritos na ABNT ISO/IEC Guia 43-1. A Tabela 12 apresenta os resultados dos laboratórios para a análise da amostra fortificada, a recuperação e os limites de detecção e quantificação.

Tabela 12: Resultados por análise (Res; µg/kg), Recuperação (Rec; %), Limite de Detecção (LD; µg/kg) e Limite de Quantificação (LQ; µg/kg).

Código dos Laboratórios	Aflatoxinas																
	B1				B2				G1				G2				TOTAL
	Res.	Rec.	LD	LQ	Res.	Rec.	LD	LQ	Res.	Rec.	LD	LQ	Res.	Rec.	LD	LQ	Res.
11.1/02	0,25	-	-	-	0,12	-	-	-	0,12	-	-	-	0,10	-	-	-	0,59
11.1/06	6,46	-	0,5	1	2,64	-	0,5	1	5,11	-	0,5	1	ND	-	0,5	1	14,21
11.1/19	2,07	92,50	0,50	0,96	1,60	103,89	0,21	0,42	2,68	85,81	0,58	1,15	2,28	103,70	0,30	0,59	8,63
11.1/23	1,01	77,23	<1,00	1,00	0,5	78,00	<0,50	0,50	1,01	77,34	<1,00	1,00	0,49	77,00	<0,50	0,50	3,01
11.1/27 ⁽¹⁾	2,2	96	1,0	1,5	< 1,0	96	0,5	1,0	2,0	96	1,0	1,5	< 1,0	96	0,5	1,0	< 5,0
11.1/31 ⁽²⁾	1,34	75	0,03	0,06	0,54	78	0,01	0,02	1,16	77	0,01	0,02	0,48	83	0,01	0,01	3,54
11.1/35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,89
11.1/45 ⁽³⁾	2,25	101	0,30	0,40	0,90	99	0,28	0,33	2,66	81	0,33	0,44	0,55	71	0,29	0,36	6,36
11.1/49	1,74	89	0,2	1,5	0,69	93	0,06	0,5	1,46	90	0,2	1,5	0,58	88	0,06	0,5	4,47
11.1/52	1,64	90	0,7	2,1	0,79	85	0,5	1,5	4,70	89	0,6	1,8	1,43	86	0,5	1,5	8,56
11.1/58	ND	70 -110	-	2	ND	70 -110	-	2	ND	70 -110	-	2	ND	70 -110	-	2	-
11.1/63	2,7	-	0,5	1	1,1	-	0,5	1	3,5	-	0,5	1	< 1	-	0,5	1	7,3
11.1/66 ⁽⁴⁾	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,166
11.1/77 ⁽⁵⁾	2,68	73,7	0,1	0,2	1,04	80,3	0,1	0,2	3,45	60	0,1	0,2	1,11	64,2	0,1	0,2	8,28
11.1/84 ⁽⁶⁾	1,69	80	0,1	0,5	1,08	82	0,1	0,2	2,00	78	0,2	0,8	0,66	71	0,1	0,4	5,43
11.1/98	2,0	88	0,5	1,0	0,5	77	0,3	1,0	1,4	88	0,5	1,0	0,5	77	0,3	1,0	4,4
INCQS	2,32	70	0,63	1,05	0,91	77	0,18	0,31	2,26	85	0,69	1,15	0,82	71	0,38	0,65	6,32

ND = Não detectado

- (1) Para Aflatoxina Total => Rec.= 96; LD=3,0; LQ=5,0;
- (2) Para Aflatoxina Total => Rec.=77;
- (3) Para Aflatoxina Total => Rec.= 88; LD=0,28; LQ=0,33;
- (4) Para Aflatoxina Total => Rec.= 87-102; LD=3; LQ=4;
- (5) Para Aflatoxina Total => Rec.= 69,5; LD=0,1; LQ=0,2;
- (6) Para Aflatoxina Total => Rec.= 79;

Nesta rodada de EP os laboratórios foram orientados a reportarem também alguns parâmetros relativos à validação do método empregado.

Analisando a Tabela 12, podemos verificar que alguns laboratórios não reportaram os valores de recuperação, de LD e LQ para a análise de Aflatoxinas.

Os laboratórios PEP 11.1/06, 11.1/35 e 11.1/58 têm sua metodologia validada, porém não apresentaram todos os seus parâmetros de validação conforme apresentado no formulário de envio de resultados.

Quanto aos valores de recuperação reportados, todos os laboratórios encontraram um valor de recuperação dentro da faixa aceitável pelo Codex (Codex Alimentarius, 2003).

O gráfico de dispersão dos resultados dos laboratórios participantes encontra-se nas Figuras de 1 à 5. Nestes gráficos, a linha central representa o valor designado, e as linhas pontilhadas, azuis e vermelhas representam, respectivamente, os intervalos do desvio padrão ($y_{ref} \pm \sigma$), de duas vezes o desvio padrão ($y_{ref} \pm 2\sigma$) e de três vezes o desvio padrão ($y_{ref} \pm 3\sigma$).

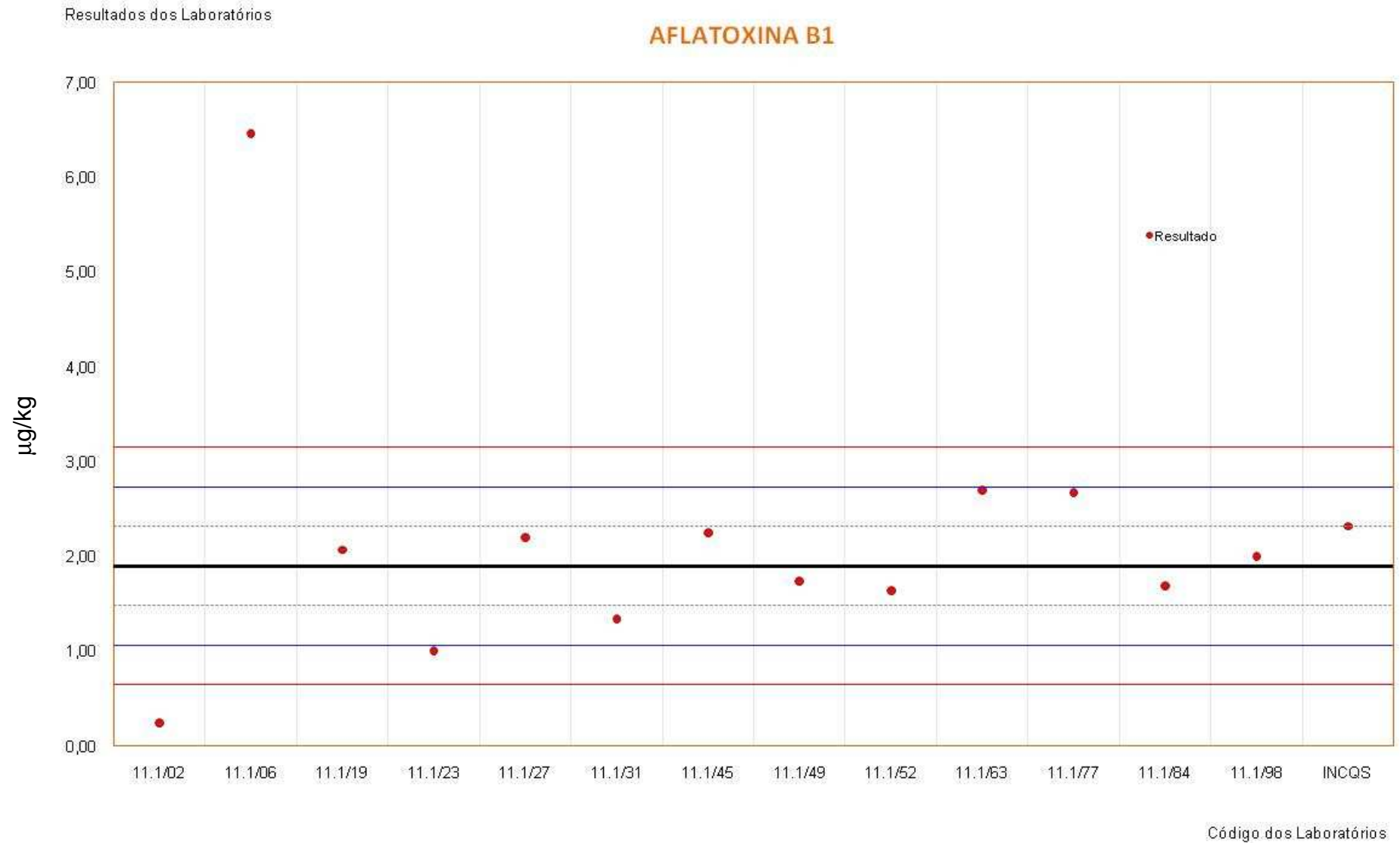


Figura 1: Gráfico dos resultados dos Laboratórios para a Aflatoxina B1

Resultados dos Laboratórios

AFLATOXINA B2

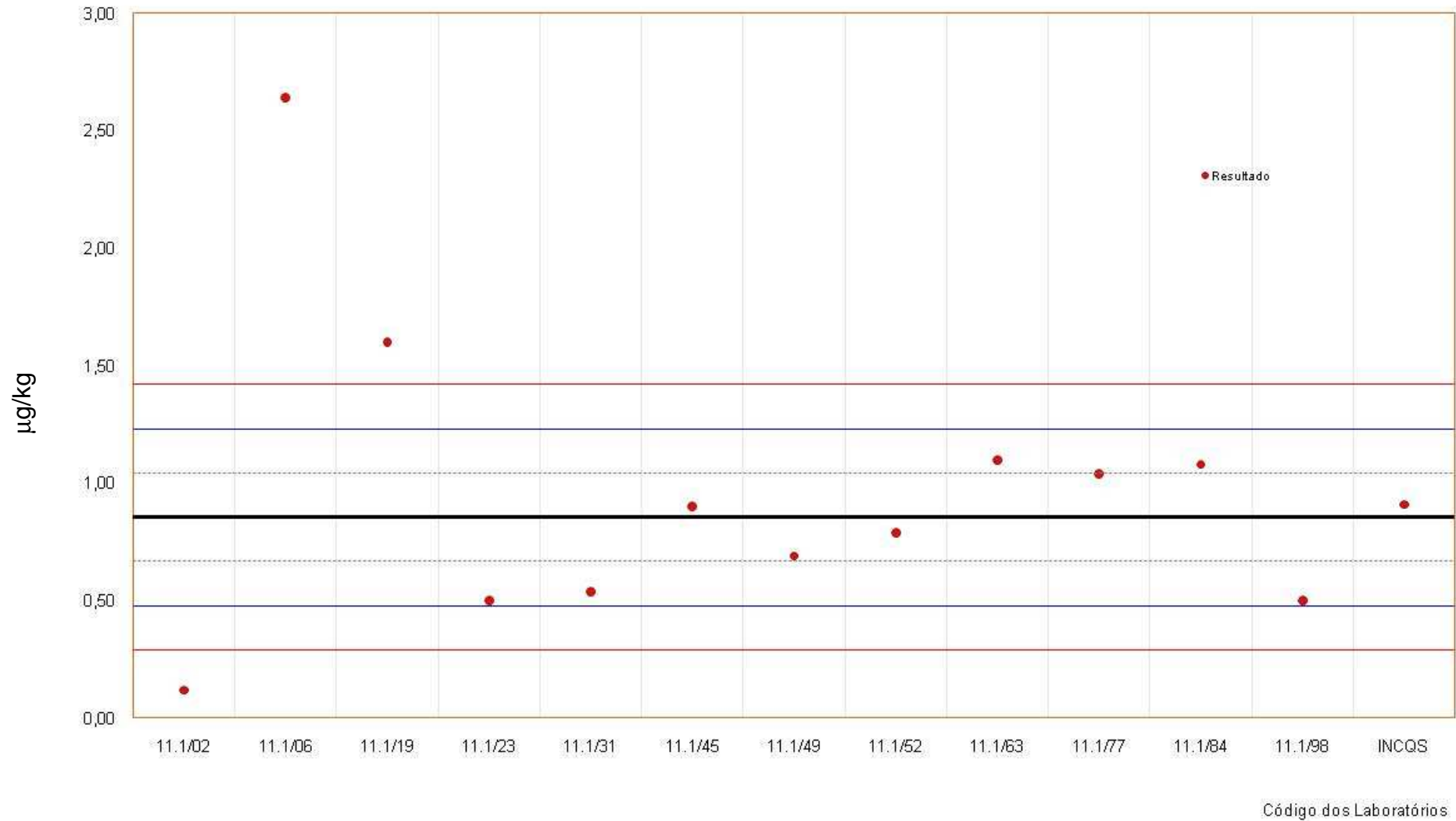


Figura 2: Gráfico dos resultados dos Laboratórios para a Aflatoxina B2

Resultados dos Laboratórios

AFLATOXINA G1

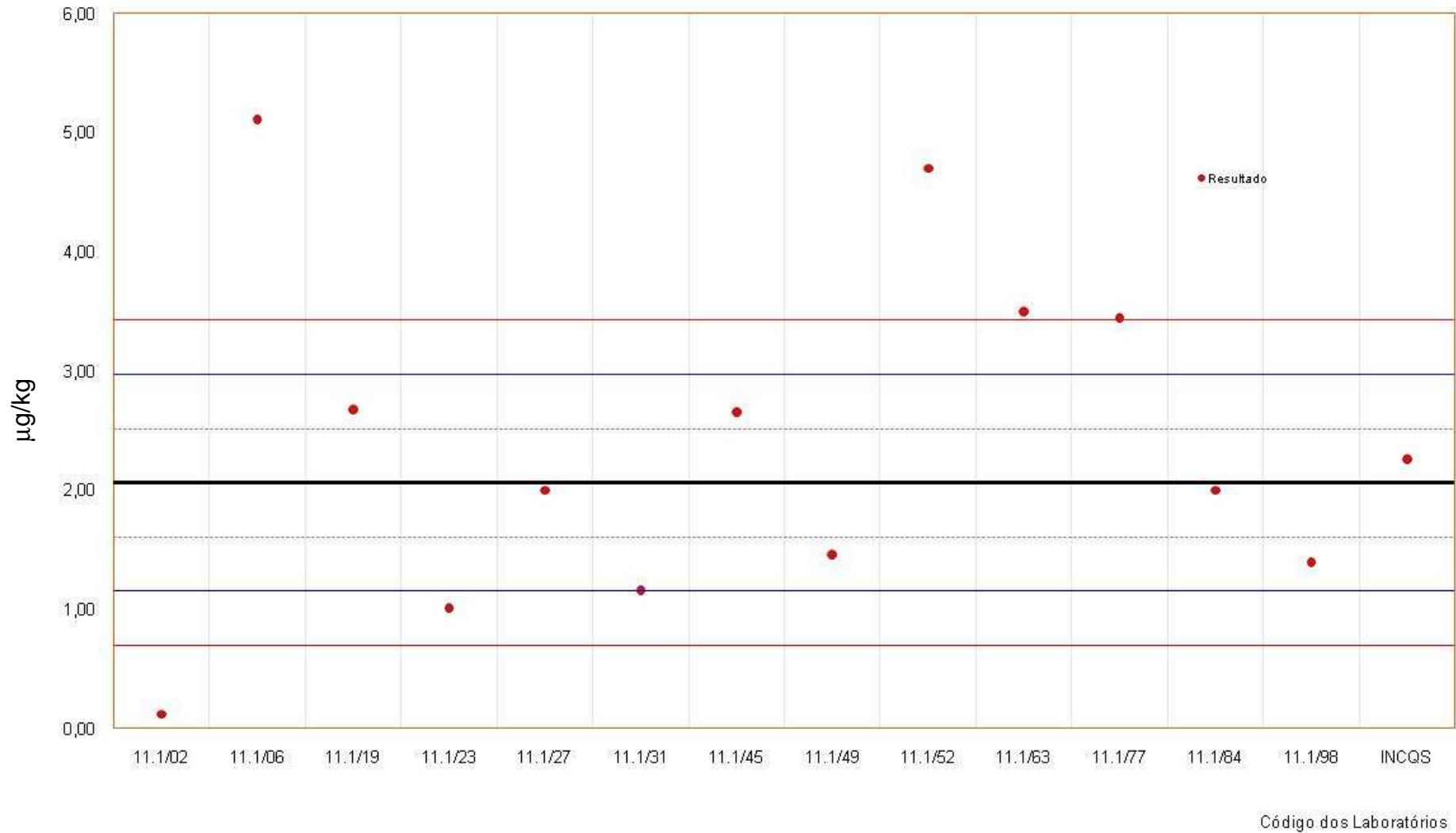


Figura 3: Gráfico dos resultados dos Laboratórios para a Aflatoxina G1

Resultados dos Laboratórios

AFLATOXINA G2

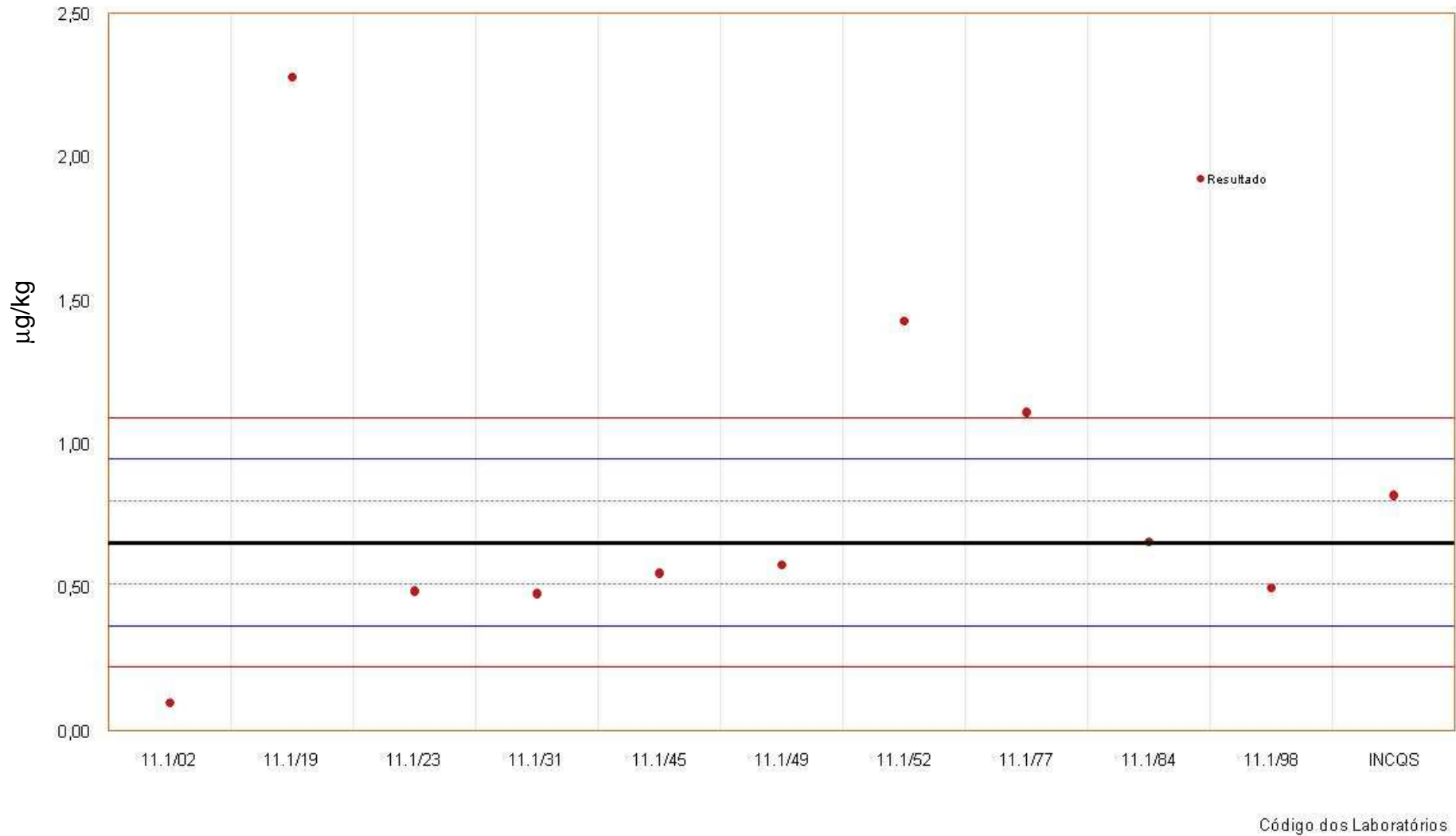


Figura 4: Gráfico dos resultados dos Laboratórios para a Aflatoxina G2

Resultados dos Laboratórios

AFLATOXINA Total

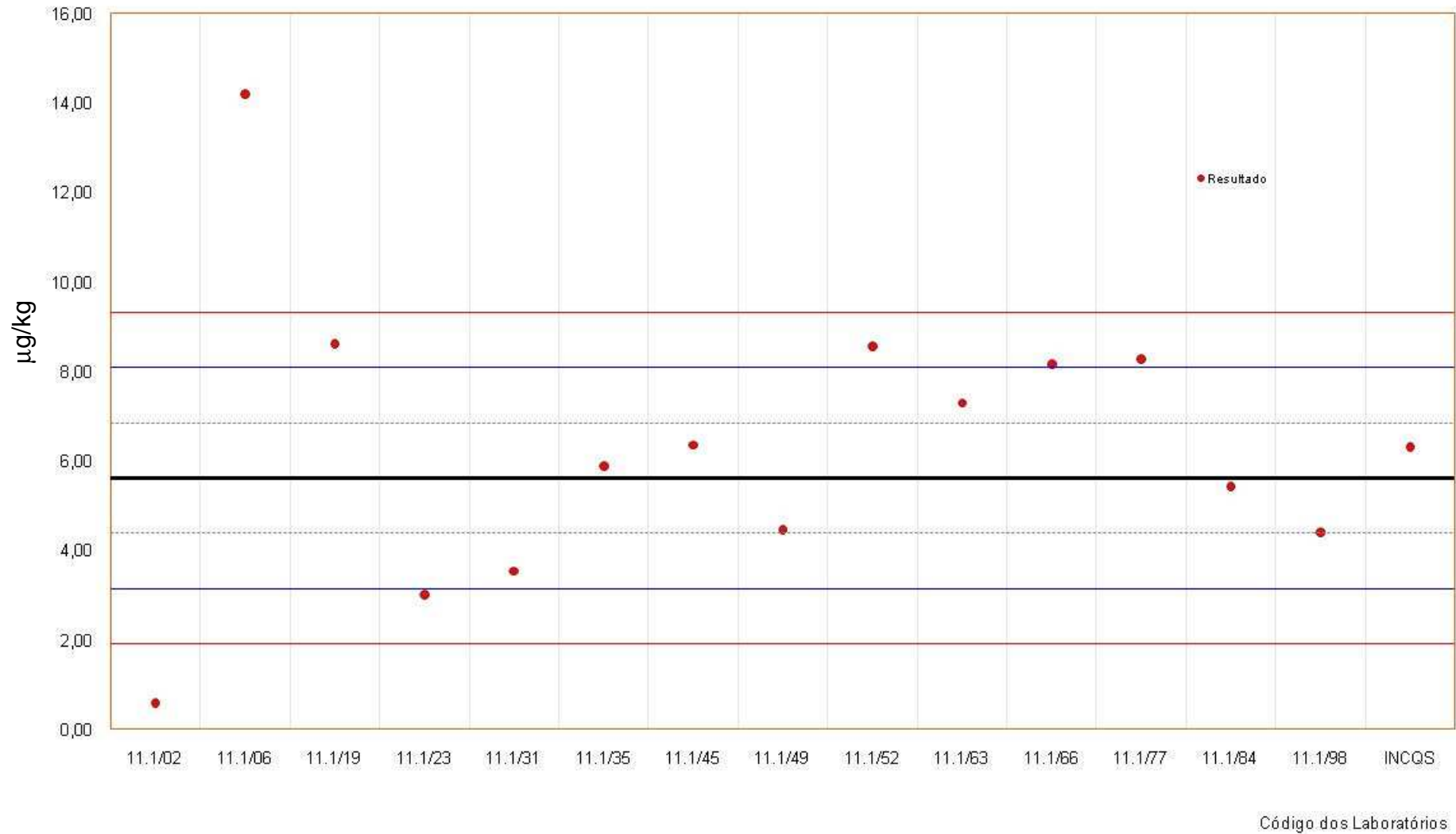


Figura 5: Gráfico dos resultados dos Laboratórios para Aflatoxina Total

A partir de uma análise visual dos gráficos de dispersão pode-se observar a incompatibilidade de alguns laboratórios que obtiveram resultados fora do limite de três vezes o desvio padrão com relação aos demais. Para a qualificação dos resultados dos laboratórios foram calculados os índices z (z-score).

7.3. Cálculo do Índice z

A avaliação de desempenho dos laboratórios participantes e do INCQS, expressa através do índice z (Equação 12), está apresentada na Tabela 13.

Tabela 13: Valores do índice z obtidos pelos laboratórios participantes da 1ª Rodada do EP de Micotoxinas.

Código do Laboratório	Aflatoxinas				
	B1	B2	G1	G2	TOTAL
11.1/02	-3,9	-3,9	-4,3	-3,9	-4,1
11.1/06	10,9	9,5	6,7	ND	7,0
11.1/19	0,4	4,0	1,4	11,2	2,4
11.1/23	-2,1	-1,9	-2,3	-1,2	-2,1
11.1/27	0,7	*	-0,1	*	*
11.1/31	-1,3	-1,7	-2,0	-1,2	-1,7
11.1/35	NT	NT	NT	NT	0,2
11.1/45	0,8	0,2	1,3	-0,7	0,6
11.1/49	-0,4	-0,9	-1,3	-0,5	-0,9
11.1/52	-0,6	-0,3	5,8	5,3	2,4
11.1/58	ND	ND	ND	ND	NT
11.1/63	1,9	1,3	3,2	*	1,4
11.1/66	NT	NT	NT	NT	2,1
11.1/77	1,9	1,0	3,1	3,1	2,2
11.1/84	-0,5	1,2	-0,1	0,0	-0,2
11.1/98	0,2	-1,9	-1,5	-1,1	-1,0
INCQS	1,0	0,3	0,4	1,1	0,6

* Valores menores que o limite de quantificação

NT = não testado

ND = não detectado.

Azul = resultado questionável

Vermelho = resultado insatisfatório

As Figuras de 6 à 10 apresentam os resultados de índice z obtidos pelos laboratórios participantes desta rodada.



Figura 6: Gráfico de índice z dos laboratórios participantes para Aflatoxina B1



Figura 7: Gráfico de índice z dos laboratórios participantes para Aflatoxina B2

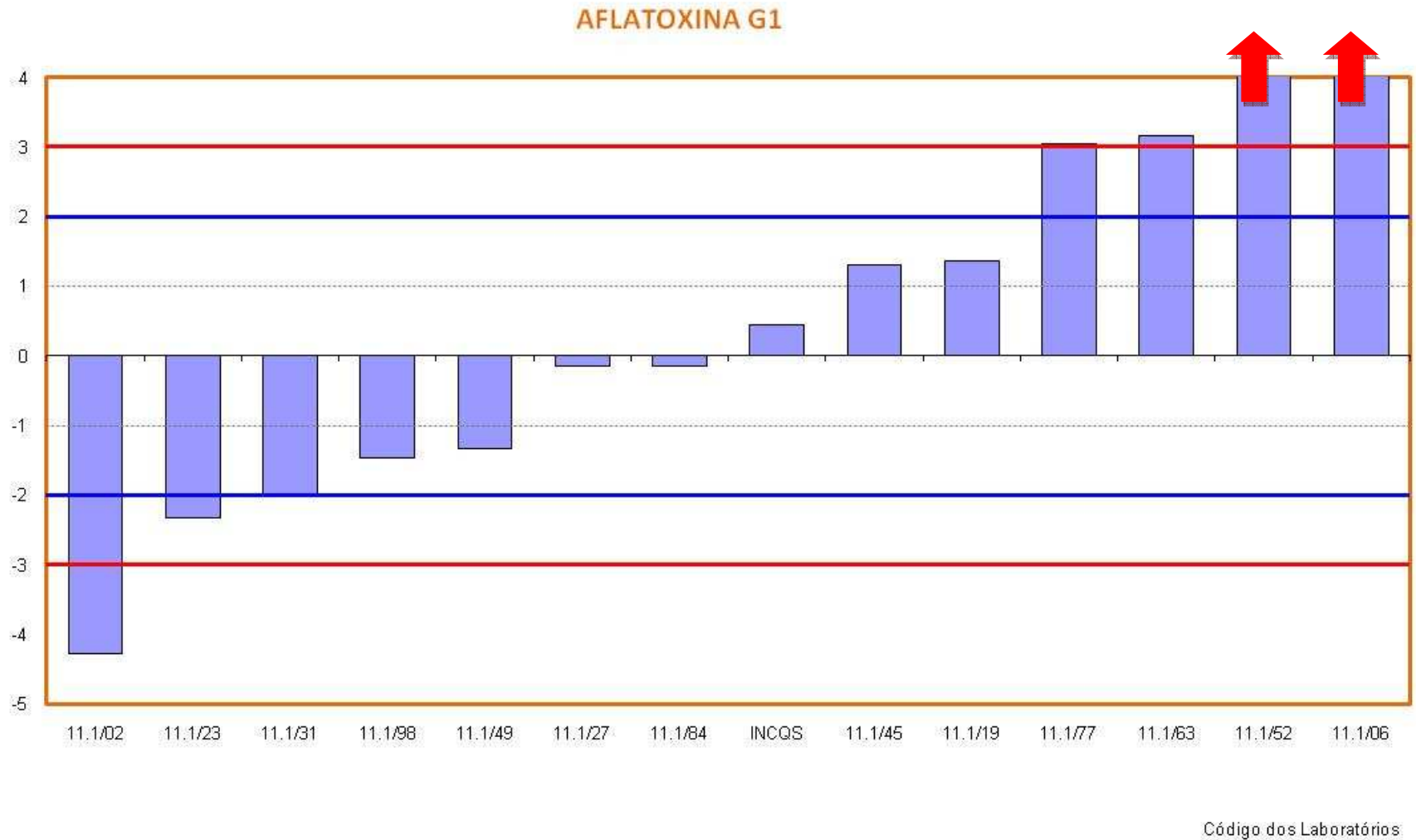


Figura 8: Gráfico de índice z dos laboratórios participantes para Aflatoxina G1



Figura 9: Gráfico de índice z dos laboratórios participantes para Aflatoxina G2



Figura 10: Gráfico de índice z dos laboratórios participantes para Aflatoxina Total

Os resultados reportados como < LQ ou não detectado, em que efetivamente o valor designado do agrotóxico encontrava-se entre o Limite de Quantificação (LQ) e o Limite de Detecção (LD), foram considerados satisfatórios.

Assim, de acordo com os resultados obtidos, onze (69 %) dos dezesseis laboratórios participantes obtiveram resultados questionáveis ou insatisfatórios para, pelo menos, uma aflatoxina analisada. De um total de sessenta e um resultados reportados (incluindo ND e < LQ), aproximadamente 63% foram considerados satisfatórios (quarenta e cinco resultados), 10% foram considerados questionáveis (sete resultados), e 27% insatisfatórios (dezenove resultados).

Cabe salientar 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 organização do ensaio de proficiência para determinação de micotoxinas em alimento se constituiu num trabalho da parceria estabelecida pelo Inmetro e INCQS/Fiocruz, com o intuito de promover a melhoria da qualidade das medições realizadas em alimentos no país.

Através de uma análise criteriosa dos dados gerados neste EP, podemos chegar às seguintes conclusões gerais:

Cinco (31 %) dos dezesseis laboratórios que enviaram resultados obtiveram resultados satisfatórios em todas as determinações. Se levarmos em consideração somente a legislação brasileira (soma de aflatoxinas em amendoim; RDC nº 274), este número sobe para oito (50 %) laboratórios. Devemos considerar também que a concentração total de aflatoxinas na amostra é bem inferior ao estabelecido na legislação brasileira, 20ppb (RDC nº 274). Contudo, é importante a quantificação em separado das micotoxinas, visto que além deste limite para o somatório de aflatoxinas A e G, alguns países já estipulam um limite máximo de Aflatoxina B1.

Para os laboratórios que obtiveram resultados insatisfatórios ou questionáveis, ações corretivas podem ser adotadas para o aprimoramento das suas medições. 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, será importante para a identificação dos pontos críticos.

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. Referências Bibliográficas

- Associação Brasileira de Normas Técnicas ISO/IEC GUIDE 43-1: Ensaio de proficiência por comparações interlaboratoriais – Parte 1. Desenvolvimento e operação de programas de ensaios de proficiência, **1999**.
- CHUI, Q. S. H.; BISPO, J. M. de A.; Iamashita, C. O.; O papel dos programas interlaboratoriais para a qualidade dos resultados analíticos. *Química Nova*, Vol. 27 (06), 993-1003, **2004**.
- CODEX ALIMENTARIUS. *Guidelines on Good Laboratory Practice in Residue Analysis: CAC/GL 40-1993*, Rev. 1-2003. Rome: FAO/WHO Joint Publications, **2003**. Vol.
- 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, Normalização e Qualidade Industrial. Vocabulário Internacional de Metrologia: Conceitos Fundamentais e Gerais e Termos Associados (VIM 2008). Rio de Janeiro, **2008**.
- International Laboratory Accreditation Cooperation - ILAC G13. Guidelines for the requirements for the competence of providers of proficiency testing schemes, **2007**
- International Organization for Standardization – ISO GUIDE 35 - Reference materials – General and statistical principles for certification. Geneva, **2006**
- International Organization for Standardization – ISO 13528 - Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons. **2005**.
- RDC nº 274, de 15 de outubro de 2002, ANVISA, DOU 16/10/**2002**.
- The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories. *Pure Appl. Chem.*, Vol. 78, N^o 1, pp. 145–196, **2006**.
- 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) *Analyst*, 125, 385-386, **2000**.

10. Laboratórios participantes

A lista dos laboratórios que enviaram os resultados à coordenação do Programa é apresentada na Tabela 14.

É importante ressaltar que a numeração da tabela é apenas indicativa do número de laboratórios participantes na CI, não estando, em hipótese alguma, associada à identificação dos laboratórios na apresentação dos resultados.

Tabela 14: Laboratórios participantes da 1ª Rodada do Ensaio de Proficiência para Determinação de Micotoxinas em Alimentos.

Instituição	
1.	A3Q Laboratórios Ltda
2.	Cerelab Laboratórios Químicos Ltda
3.	Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/USP
4.	Eurofins do Brasil Análises de Alimentos Ltda
5.	Fundação de Ciência e Tecnologia – CIENTEC
6.	Fundação Ezequiel Dias
7.	Fundação Núcleo de Tecnologia Industrial do Ceará
8.	Instituto de Tecnologia de Alimentos
9.	Instituto de Tecnologia do Paraná
10.	JLA Brasil Laboratório de Análise de Alimentos Ltda
11.	LAB TEC Laboratório de Análises Químicas Ltda
12.	Laboratório Nacional Agropecuário – LANAGRO-MG
13.	Nestlé Brasil Ltda
14.	SFDK Laboratório de Análise de Produtos Ltda
15.	SGS do Brasil Ltda
16.	Universidade de Brasília

- Total de participantes: 16 laboratórios