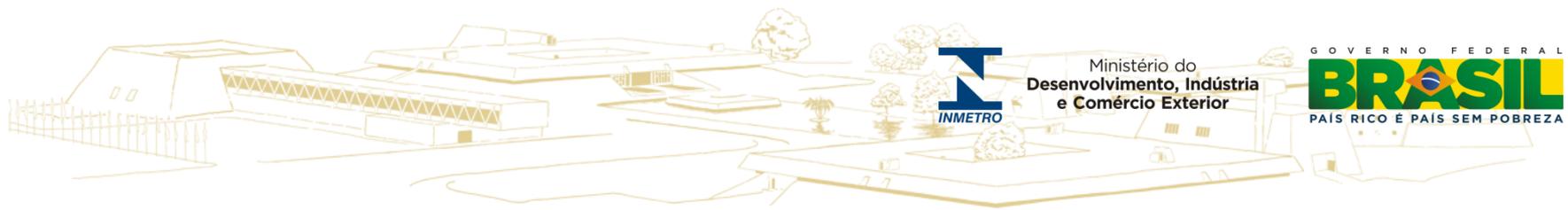


Aspectos técnicos relacionados ao ISO Guide 35: abordagens de diferentes produtores de materiais de referência.

Renata Martins Horta Borges
Divisão de Acreditação de Laboratórios
Coordenação Geral de Acreditação



Definição do material de referência a ser produzido, por exemplo:

- matriz,
- propriedades a serem certificadas e os níveis desejados,
- incerteza de medição desejada.

Planejamento do processo de amostragem

Planejamento do procedimento do preparo das amostras

Seleção dos métodos de medição apropriados para os estudos de homogeneidade e de estabilidade

Seleção do método de caracterização do material

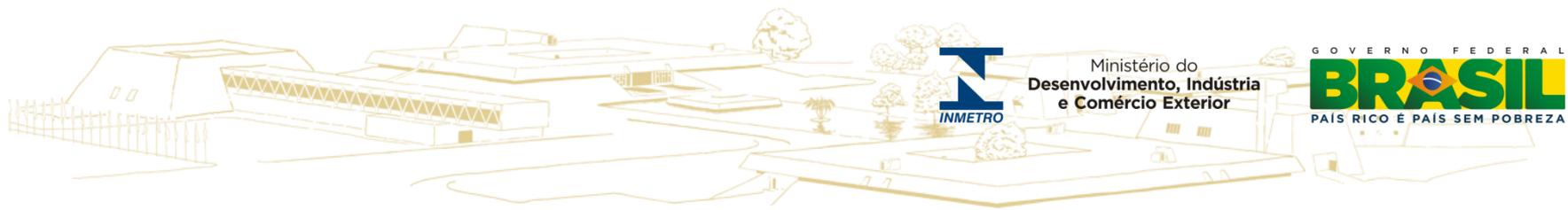
Estudos de homogeneidade, de estabilidade e de caracterização do material

Combinação dos resultados obtidos através dos estudos de homogeneidade, de estabilidade e de caracterização do material, incluindo a completa avaliação da incerteza de medição

Elaboração do certificado e, quando apropriado, do relatório de análises.

Fluxograma para a produção de um candidato a material de referência.

Ref. ISO Guide 35, 2006



Estudo de caso 01: Material de referência certificado ERM – BD476

Produtor de materiais de referência: BAM Federal Institute for Materials Research and Testing

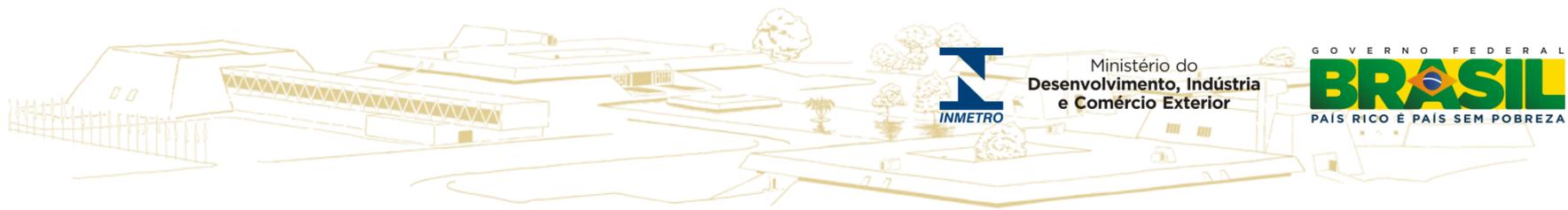
Departamento de química analítica, Berlim, Alemanha

Emissão do relatório de certificação: outubro de 2010 (após a publicação do Guide 34: 2009)

Responsáveis pela emissão do relatório: M. Koch, W. Bremser, R. Krüger, C. Quast, I. Nehls

Descrição do MRC: material de referência de vinho tinto para uso na determinação de ocratoxina (OTA) em alimentos.

Valor de propriedade certificado: **Ocratoxina A ($0,52 \pm 0,11$) $\mu\text{g.L}^{-1}$.**

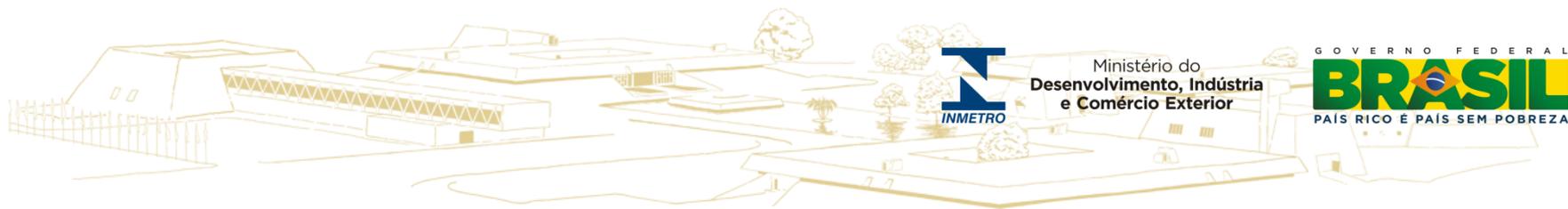


Estudo de caso 01: Material de referência certificado ERM – BD476

Dados inseridos no relatório de certificação:

1. Preparação do candidato a material de referência

- 11 litros (15 garrafas) de vinho tinto foram adquiridas no mercado;
- todo o vinho foi filtrado em papel de filtro (240 mm MN 612 ¼ paper filter by Macherey-Nagel);
- o vinho tinto filtrado foi mantido sob refrigeração **por três meses antes de ser processado**;
- todo o vinho foi filtrado mais uma vez em um sistema “glass-micro-phase-filter” (GF/A 110 mm) by Whatman Schleicher & Schell;
- o filtrado foi coletado e homogeneizado em um recipiente de 20 litros;
- um total de **205 unidades foram envasadas em condições controladas gravimetricamente** ($49,5 \pm 1,0$) g correspondendo a ($51,1 \pm 1,0$) mL em frascos âmbar purgados previamente com argônio;
- todo o lote foi armazenado a **4°C após envase**.

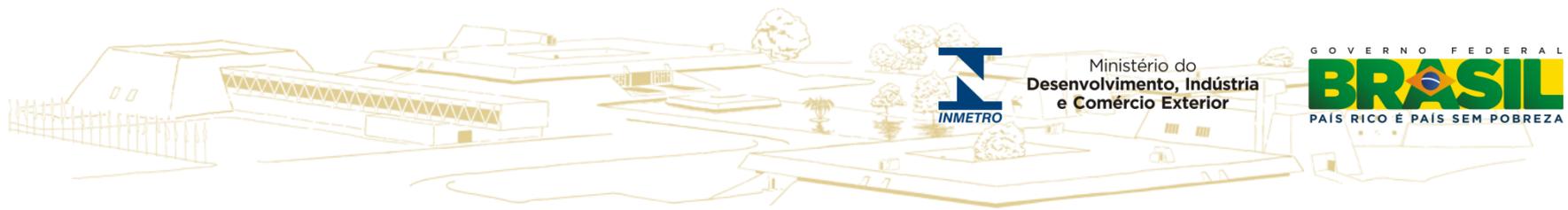


Ao final da descrição do preparo do candidato a MRC, são apresentados dados referentes à caracterização da matriz. Tais dados são apresentados na Tabela abaixo.

| Mensurando | Valor | Método utilizado |
|----------------|--------------------------|------------------|
| Teor de etanol | (11,04 ± 0,02) mL/100 mL | GC - MS |
| pH | 3,4 ± 0,2 | Medidor de pH |

2. Método analítico empregado

- Existem diferentes métodos para determinação de OTA, entretanto o PMR escolheu o método LC-MS/MS utilizando $^{13}\text{C}_{20}$ -OTA como padrão interno.
- Foram preparados **seis pontos** para a curva analítica. Cada solução de calibração foi preparada no momento da análise. Foi utilizado **método gravimétrico para o preparo das amostras e das soluções utilizadas para cada ponto da curva**. Para os dados obtidos, o PMR assumiu que a curva analítica apresentava comportamento linear.
- A quantidade mínima de amostra (“minimum sample size”) a ser utilizada nas medições foi estudada. **Tal parâmetro deve ser expresso no certificado de análise do material de referência produzido.**



3. Avaliação da homogeneidade

- ❖ Foram selecionadas 08 unidades aleatoriamente de um total de 205 frascos produzidos do candidato a material de referência.
 - ✓ Aproximadamente 4% do total de frascos produzidos. Valor menor que o orientado pelo Guide 35: 2006. Entretanto, foram feitas 04 determinações para cada unidade, além dos estudos prévios realizados pelo PMR. Tais estudos não foram apresentados no relatório, mas constam nas publicações citadas como referências do relatório.
- ❖ Cada frasco foi analisado 04 vezes. Todas as 08 unidades passaram pelo processo de extração, processados sob condições de repetitividade e analisados aleatoriamente.
- ❖ O material extraído foi analisado por HPLC-MS/MS sob condições de repetitividade, ou seja, todos os **32 extratos foram analisados versus uma única curva analítica.**

Dados referentes à avaliação da homogeneidade ...



| Nº Frasco | Determinações (concentração de OTA em µg/L) | | | | Média | Desvpad | CV (%) |
|-----------|---|------|------|------|--------|---------|--------|
| | a | b | c | d | | | |
| 8 | 0,49 | 0,46 | 0,51 | 0,52 | 0,4950 | 0,0265 | 5,34 |
| 55 | 0,51 | 0,49 | 0,48 | 0,50 | 0,4950 | 0,0129 | 2,61 |
| 83 | 0,49 | 0,49 | 0,50 | 0,50 | 0,4950 | 0,0058 | 1,17 |
| 112 | 0,48 | 0,50 | 0,48 | 0,53 | 0,4975 | 0,0236 | 4,75 |
| 140 | 0,47 | 0,49 | 0,52 | 0,49 | 0,4925 | 0,0206 | 4,19 |
| 156 | 0,50 | 0,49 | 0,48 | 0,50 | 0,4925 | 0,0096 | 1,94 |
| 175 | 0,51 | 0,48 | 0,48 | 0,50 | 0,4925 | 0,0150 | 3,05 |
| 202 | 0,48 | 0,51 | 0,52 | 0,48 | 0,4975 | 0,0206 | 4,14 |

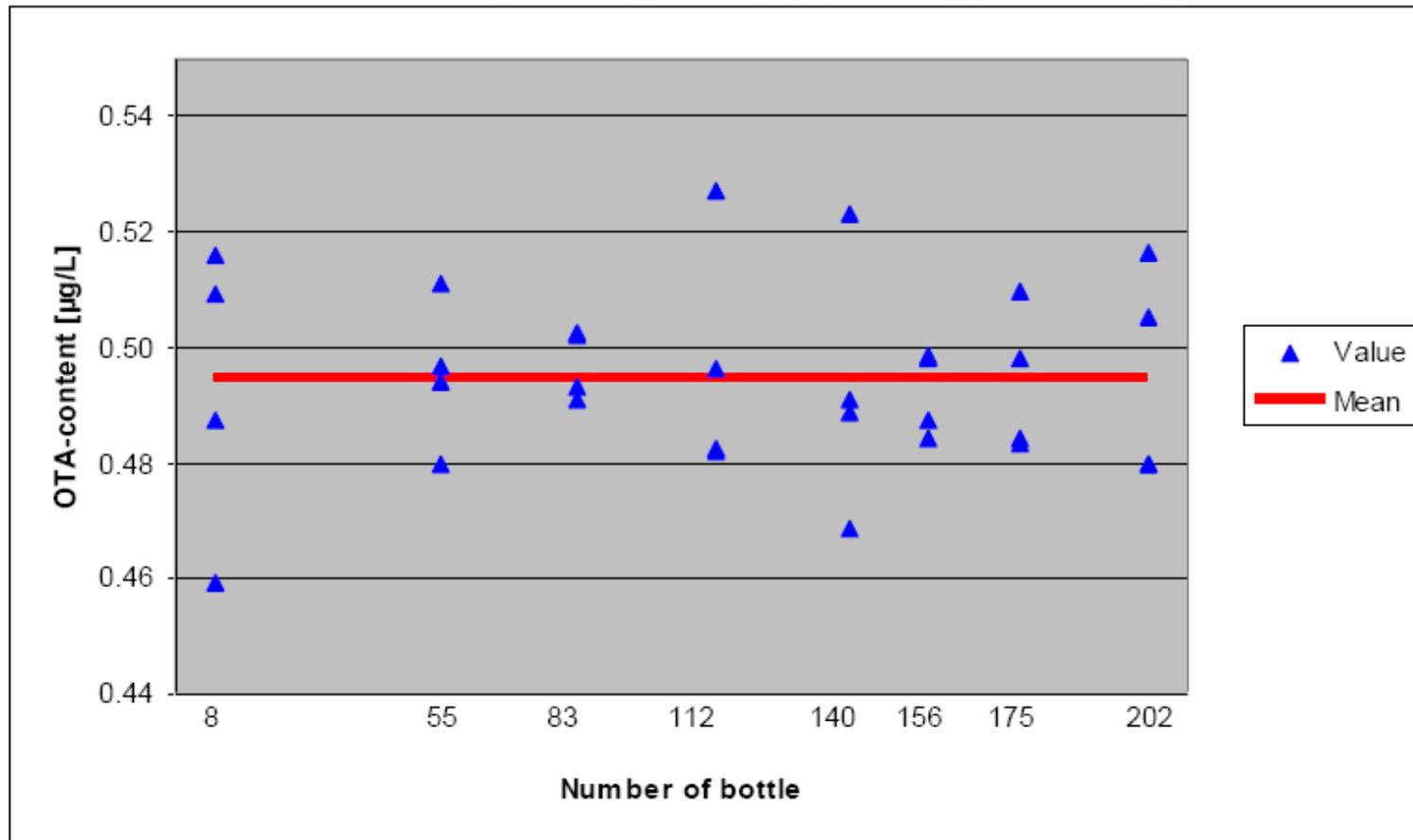
ANOVA

| Fonte da variação | SQ | gl | MQ | F | valor-P | F crítico |
|-------------------|---------|----|----------|---------|---------|-----------|
| Entre grupos | 0,00012 | 7 | 1,74E-05 | 0,05306 | 0,9997 | 2,423 |
| Dentro dos grupos | 0,00788 | 24 | 0,00034 | | | |
| Total | 0,00800 | 31 | | | | |

Considerando o Guide 35: 2006, pode-se obter a contribuição da incerteza referente à possível variação entre frascos a partir da equação abaixo:

$$u_{bb} = \sqrt{\frac{MQ_{dentro}}{n} * \sqrt{\frac{2}{gl_{dentro}}}}$$

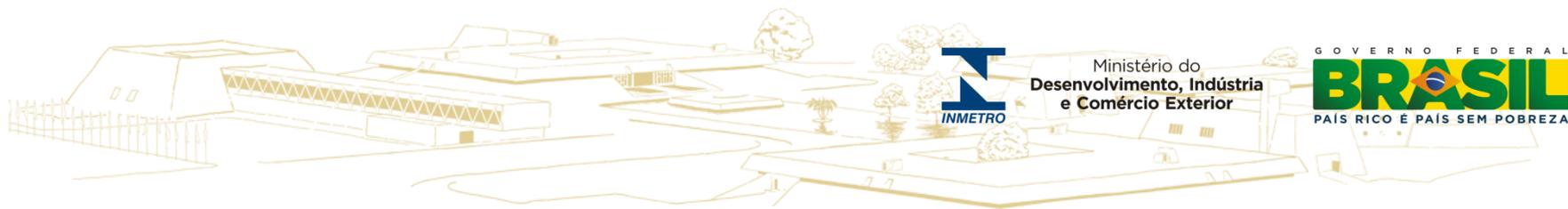
0,0046 µg/L 0,9% rel.



Indicativo de que a heterogeneidade do material é menor do que pode ser detectada com a metodologia analítica empregada, ou melhor, o método apresenta repetitividade insuficiente.

Ref.: ERM – BD476, 2010

$$u_{bb} = \sqrt{\frac{MQ_{entre} - MQ_{dentro}}{n}}$$

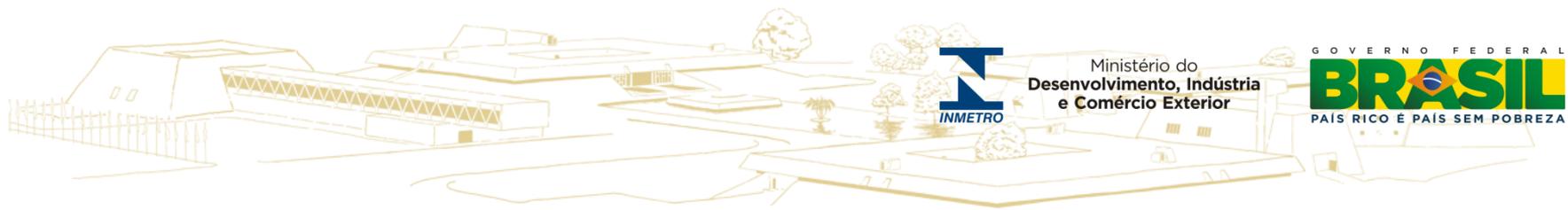


4. Avaliação da estabilidade

Planejamento do estudo

A partir da experiência analítica do PMR foi destacada a deterioração da OTA com o aumento de temperatura. Com isso, frascos foram selecionados para se realizar um estudo com variações de temperatura entre 4 °C e 60 °C por um período de 01 semana a 12 meses.

| Tempo (meses) | Nº frasco / Temperatura de armazenamento | | | | Observação |
|---------------|--|---------|-------|-------|---------------------------------------|
| | 4 °C | 23 °C | 40 °C | 60 °C | |
| 0,25 | 32/115 | 155 | 138 | 101 | Estudo inicial |
| 0,50 | 32/115 | 95 | 10 | 205 | Estudo inicial |
| 0,75 | 32/115 | 167 | 190 | 41 | Estudo inicial |
| 1 | 32/115 | 56 | 69 | 124 | Estudo inicial |
| 3 | 71 | 36 | 113 | - | Estudo inicial |
| 6 | 11 | 99 | 76 | - | Estudo inicial |
| 9 | 111 | 43 | - | - | Estudo inicial |
| 12 | 34 | 123/186 | - | - | Estudo inicial |
| 24 | | | | | Monitoramento pós-certificação |
| 36 | | | | | Monitoramento pós-certificação |
| 48 | | | | | Monitoramento pós-certificação |

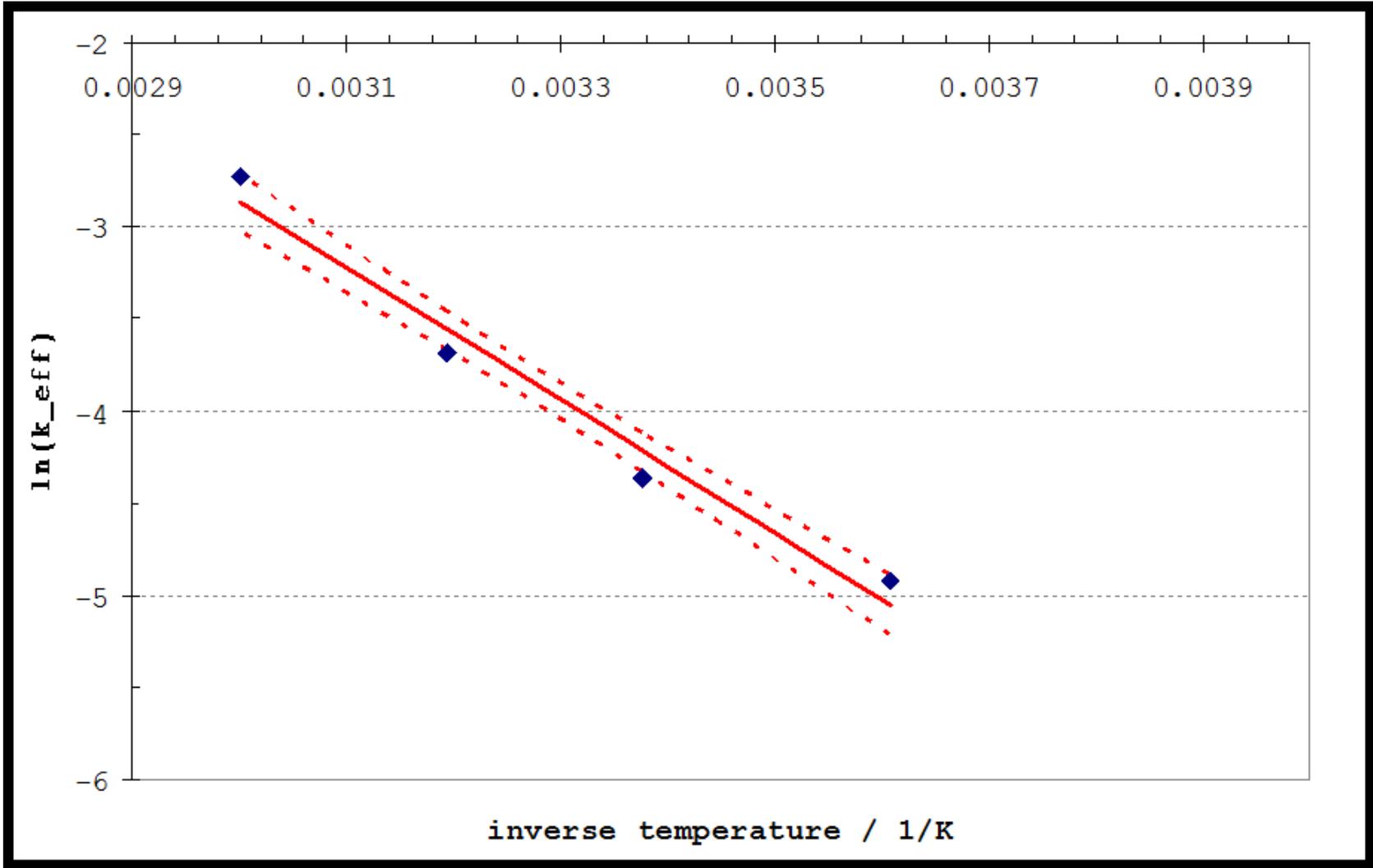


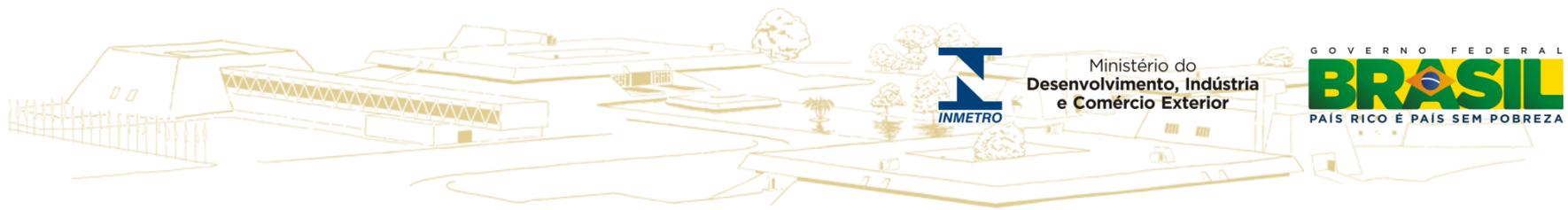
4. Avaliação da estabilidade

❖ Os estudos foram realizados em condições de repetitividade (isócrono) – Lamberty, 1998. Depois do período de estocagem, os frascos foram armazenados a 4 °C e posteriormente **analisados sob condições de repetitividade** seguindo o mesmo procedimento analítico, correndo **em paralelo 01 ou 02 amostras de referência mantidas previamente a temperatura de 4 °C.**

❖ Dois extratos independentes foram obtidos tanto para as amostras submetidas a variações de temperatura quanto para amostras de referência.

Logaritmo da taxa de reação versus o inverso da temperatura de estudo: Modelo de Arrhenius (Bremser et al.)





4. Avaliação da estabilidade

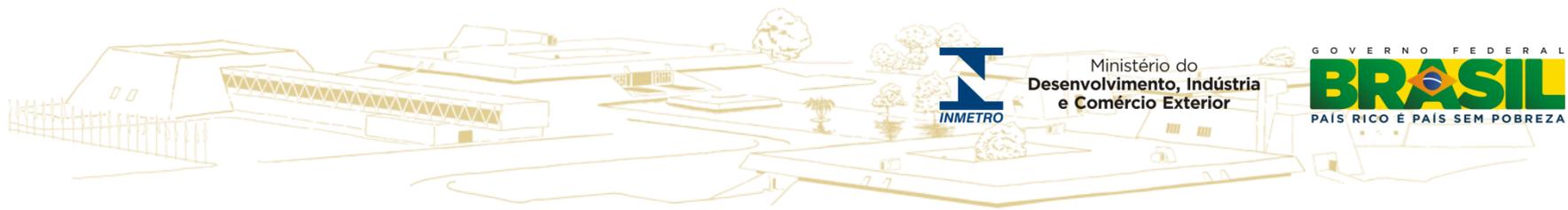
Com base nos estudos em relação à influência da temperatura na concentração da OTA, o PMR pôde estimar o tempo de prateleira do material de referência a ser certificado.

| Temperatura °C | Meses |
|----------------|-------|
| 4 °C | 35,2 |
| 20 °C | 16,3 |
| 40 °C | 8,4 |
| 60 °C | 4,0 |

❖ Os dados apresentados poderão atualizados de acordo com os estudos de monitoramento pós-certificação do material de referência.

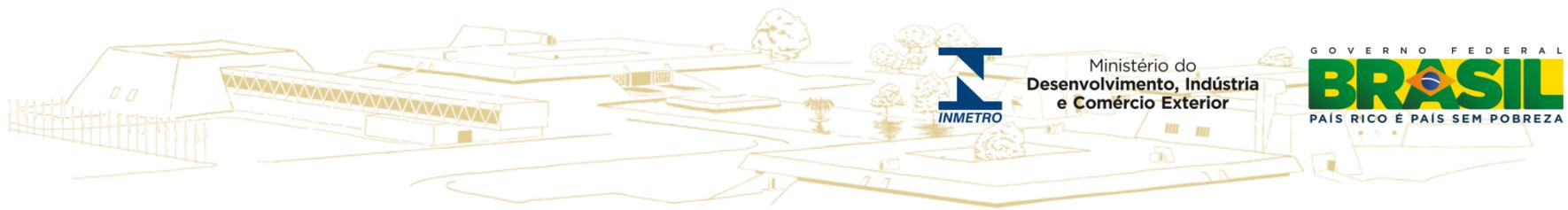
❖ Temperaturas acima de 4 °C podem reduzir o tempo de validade do material drasticamente. Com isso, a opção do PMR foi a seguinte:

❖ **Data de validade de 12 meses após entrega pelo PMR com o mesmo sendo mantido a 4 °C. As condições de transporte foram controladas visando a não degradação da ocratoxina.**



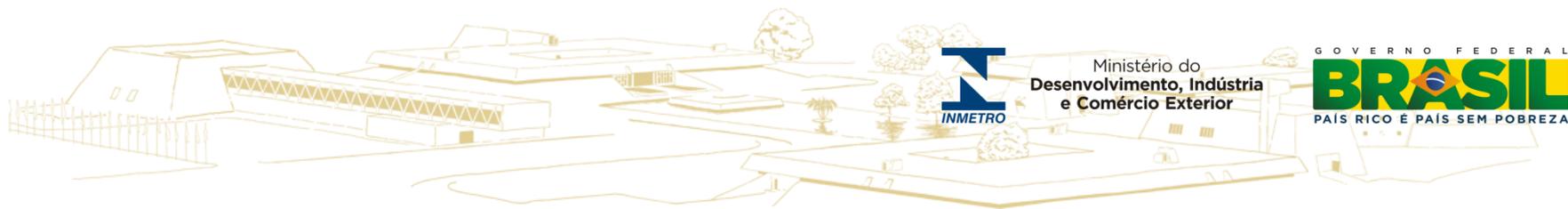
5. Planejamento do processo de caracterização do material de referência

- ❖ Avaliação dos resultados emitidos pelos laboratórios (subcontratados)
- ❖ A **atribuição do valor de propriedade foi realizada nas instalações do BAM** utilizando o método HPLC-MS/MS com ^{13}C -OTA como padrão interno;
- ❖ Paralelamente, foi realizada uma comparação interlaboratorial com 15 laboratórios com o objetivo de **prover suporte às análises realizadas no BAM**;
- ❖ Tanto para o propósito de certificação *in-house* quanto para o estudo interlaboratorial, duas amostras (amostra 01 e amostra 02) foram analisadas por cada laboratório em duplicata;
- ❖ O PMR informou que o nível de OTA nas amostras estaria dentro dos limites legais, desta forma esperava receber resultados comparáveis entre si;
- ❖ Além disso, cada participante recebeu uma unidade do candidato a material de referência para a **determinação da recuperação do método analítico**. Os laboratórios usaram HPLC e diferentes técnicas de detecção: fluorescência e MS/MS combinadas com calibração externa.



Todos os dados foram analisados criticamente pelo PMR (BAM):

- dados reportados como abaixo do limite de quantificação foram excluídos por razões técnicas;
- através da elipse de Youden o PMR pôde avaliar como os laboratórios avaliaram as duas amostras enviadas pelo PMR, incluindo uma avaliação sobre tendências significativas por parte de dois laboratórios;
- cada percentual de recuperação de cada laboratório foi analisado em relação ao requisito pré-estabelecido pelo PMR (**planejamento da produção, critérios de aceitação**);
- avaliações estatísticas foram realizadas com relação aos dados dos laboratórios:
 - teste de Cochran para a identificação de outliers em relação à variância;
 - teste de Grubbs para a identificação de outliers em relação à média;
 - teste de Dixon e Nalimov para a verificação de possíveis indicações de outliers;
 - teste Kolmogorov-Smirnov (versão de Lilliefors) para a avaliação da normalidade dos dados.



Dados provenientes dos laboratórios participantes da comparação interlaboratorial

| Lab-No. | 01 | 02 | 03 | 04 | 05 | 06 | 07 | 08 | 09 | 10 | 11 | 12 | 13 | 15 | BAM |
|--------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Values ¹⁾ | 0.26 | 0.31 | 0.43 | 0.29 | 0.49 | 0.48 | 0.49 | 0.63 | 0.41 | 1.1 | 0.46 | 0.79 | 0.42 | 0.53 | 0.45 |
| ($\mu\text{g L}^{-1}$) | 0.25 | 0.42 | 0.72 | 0.32 | 0.47 | 0.50 | 0.47 | 0.65 | 0.44 | 1.0 | 0.63 | 0.69 | 0.42 | 0.53 | 0.48 |
| | 0.28 | 0.32 | 0.72 | 0.28 | 0.50 | 0.49 | 0.50 | 0.65 | 0.40 | 1.1 | 0.53 | 0.64 | 0.42 | 0.51 | 0.46 |
| | 0.26 | 0.36 | 0.67 | 0.28 | 0.48 | 0.50 | 0.50 | 0.62 | 0.43 | 1.0 | 0.53 | 0.58 | 0.43 | 0.52 | 0.46 |
| recovery (%) | 84.0 | 77.9 | 88.1 | 105 | 91.5 | 89.5 | 88.5 | 92.3 | 67.5 | 99.9 | 87 | 73.8 | 88.4 | 69.5 | 89.4 |
| mean value ²⁾ | 0.31 | 0.45 | 0.72 | 0.28 | 0.53 | 0.55 | 0.55 | 0.69 | 0.62 | 1.05 | 0.62 | 0.91 | 0.48 | 0.75 | 0.52 |
| ($\mu\text{g L}^{-1}$) | | | | | | | | | | | | | | | |

¹⁾ The single values of each laboratory are not corrected for recovery.

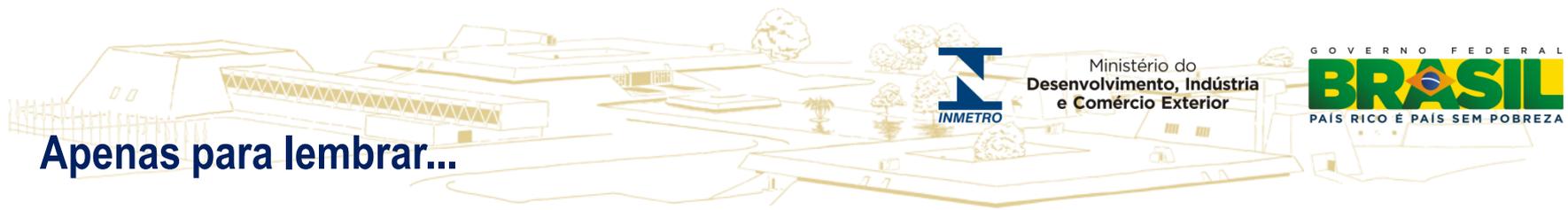
²⁾ The mean value of each laboratory is corrected for recovery.



Contribuições consideradas para a incerteza associada ao valor de propriedade



| Uncertainty contribution from ... | rel. value | Remarks |
|-----------------------------------|---------------------|---|
| weighing | U_w | 0.01039732 assessed using balance control chart |
| calibration | U_{cal} | 0.01879578 estimate for mean of four replicate determinations (standard scheme for certification) |
| ^{13}C aliquoting | $U_{^{13}\text{C}}$ | 0.00059522 uncertainty of the aliquoted amount of the isotope spike, not contained in the general estimate for weighing |
| purity native standard | U_{pur} | 0.005 as assessed by NMR (certified Biopure standard) |
| reproducibility | U_{rep} | 0.04442835 accounts for variability in the sample preparation (weighing, clean-up, bulk-up, peak integration, etc.), plus day-to-day variations |
| extraction completeness | U_{ec} | 0 included in extraction efficiency |
| recovery | U_{rec} | 0.02876484 referring to an $R = 0.894$, determined from recovery experiment |
| homogeneity | U_{bb} | 0.00933376 from homogeneity study |
| (in)stability | U_{trc} | 0 for a minimum shelf life of 36 months |
| commutability | U_{trc} | 0.08859027 half of the difference between BAM value and mean of the ILC (without BAM) |
| Total (rel.) | $U_{c,r}$ | 0.1059405 according to eq. 1 |
| Total | U_c | 0.05480702 $\mu\text{g L}^{-1}$ |



Apenas para lembrar...

$$u_{material} = \sqrt{u_{caracterização}^2 + u_{homogeneidade}^2 + u_{est.curta}^2 + u_{est.longa}^2}$$

onde:

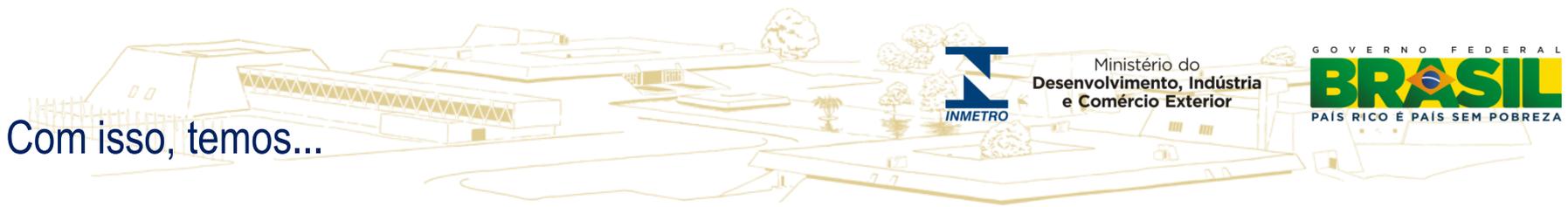
$u_{caracterização}$ corresponde à contribuição da incerteza de medição relativa ao processo de caracterização do material,

$u_{homogeneidade}$ corresponde à contribuição da incerteza de medição relativa ao estudo de homogeneidade,

$u_{est.curta}$ corresponde à contribuição da incerteza de medição relativa ao estudo de estabilidade de curta duração, muito comum quando se pretende avaliar condições extremas, como por exemplo, oscilações de temperatura ao longo do transporte do material ao cliente final,

$u_{est.longa}$ corresponde à contribuição da incerteza de medição relativa ao estudo de estabilidade de longa duração, onde se pretende estimar o tempo em que o produtor do material garante a estabilidade do material.

Com isso, temos...



6. Informações sobre o valor de propriedade e incerteza associada (expandida)

MRC ERM-BD476: valor certificado: $(0,52 \pm 1,1) \mu\text{g/L}$

A declaração de rastreabilidade metrológica do PMR foi a seguinte:

“Traceability of the certified values was directly established to stated references of the pure mycotoxin using the BAM certification method – stable isotope dilution analysis (SIDA) using ^{13}C -isotopic labelled internal standard for HPLC-MS/MS measurement. These measurements took traceability from pure reference substance (OTA: 99.5+ %; Biopure, Tulln, Austria) with a purity independently confirmed by UV absorption measurements.

The certified values were confirmed within their stated uncertainties by a supporting interlaboratory comparison of 15 participating laboratories, all using their duly validated and calibrated methods. “

7. Informações sobre o uso apropriado do material de referência certificado

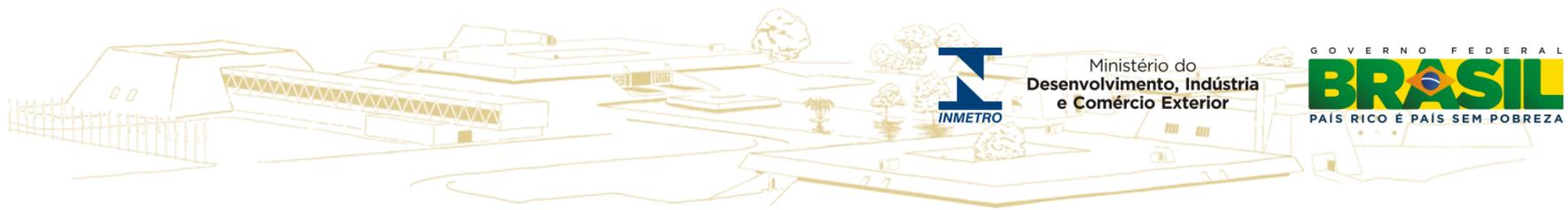
Tempo de prateleira

Condições de transporte, manuseio e estocagem

Instruções relacionadas à segurança

Notificações legais

8. Anexos com todos os resultados brutos obtidos no processo de produção do referido material de referência



Estudo de caso 02: Material de referência certificado ERM – CA615

Produtor de materiais de referência: IRMM Institute for Reference Materials and Measurements

Comissão Européia, Bélgica

Emissão do relatório de certificação: 2010 (após a publicação do Guide 34: 2009)

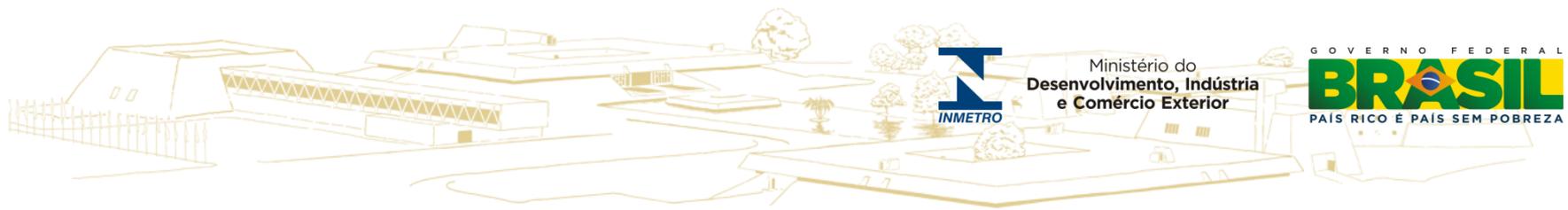
Responsáveis pela emissão do relatório: M. Ricci, E. De Vos, J. Charoud-Got, H. Emteborg, A. Held

Descrição do MRC: material de referência para determinação de metais, matriz água subterrânea

**Valores de
propriedade
certificados**

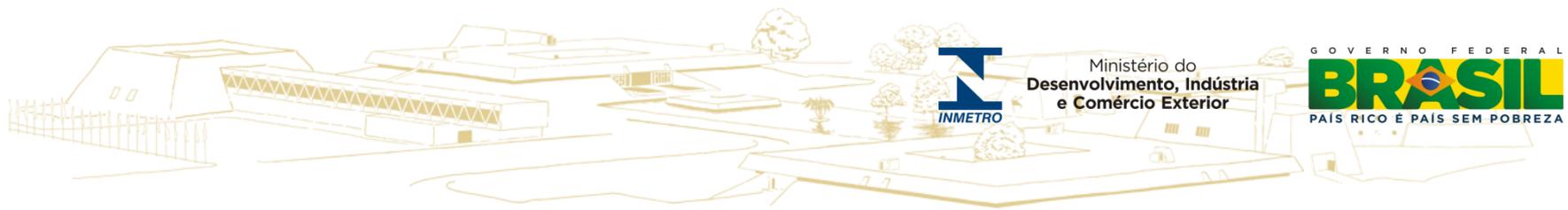


| | Valor certificado | Incerteza expandida |
|-----------|--------------------------|----------------------------|
| As | 9,9 µg/L | 0,7 µg/L |
| Cd | 0,106 µg/L | 0,011 µg/L |
| Fe | 5,11 mg/L | 0,26 mg/L |
| Hg | 0,037 µg/L | 0,004 µg/L |
| Mn | 107 µg/L | 5 µg/L |
| Ni | 25,3 µg/L | 1,1 µg/L |
| Pb | 7,1 µg/L | 0,6 µg/L |



Estudo de caso 02: Material de referência certificado ERM – CA615

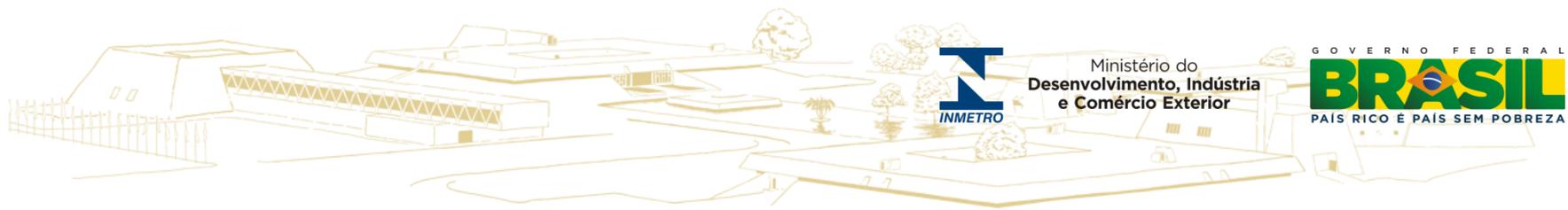
- ❖ Etapas de amostragem e processamento do candidato a material de referência sob responsabilidade do PMR: IRMM;
- ❖ Ensaios de homogeneidade realizados por um laboratório XXX acreditado segundo os requisitos da norma ISO/IEC 17025;
- ❖ Ensaios de estabilidade realizados por um laboratório YYY acreditado segundo os requisitos da norma ISO/IEC 17025;
- ❖ 15 laboratórios participaram do processo de caracterização do candidato a material de referência, sendo **11 deles acreditados segundo os requisitos da norma ISO/IEC 17025**) Tais informações sobre a acreditação são apresentadas no relatório referente ao processo de certificação do material de referência.



Estudo de caso 02: Material de referência certificado ERM – CA615

Cronograma de atividades do PMR

1. Amostragem: abril de 2007
2. Processamento: outubro de 2007
3. Estudos de homogeneidade: Junho de 2008
4. Estudos de estabilidade de curto prazo: setembro de 2008
5. Estudos de estabilidade de longo prazo: março de 2010
6. Caracterização: agosto de 2009



Estudo de caso 02: Material de referência certificado ERM – CA615

Um pouco de detalhe sobre o candidato a material de referência....

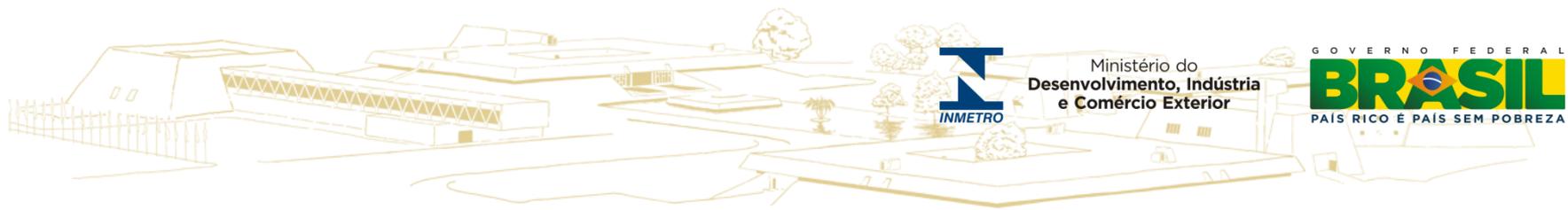
1. Amostragem, adição de padrão

Todo o processo de amostragem foi realizado por uma equipe treinada do IRMM, seguindo o protocolo de amostragem publicado pela OVAM, Public Waste Agency of Flanders

Foi realizada uma análise prévia para identificar a necessidade de adição de padrão visando atingir os níveis alvo estabelecidos no planejamento da produção.

2. Processamento do material

A água foi bombeada por um sistema de filtros. Todo o sistema, incluindo a bomba, foi previamente limpo com solução de HNO_3 2% e limpo continuamente com água deionizada ($18,2 \mu\text{S}/\text{cm}$). Ampolas de borosilicato de 100mL foram checadas quanto aos níveis de elementos traço a serem certificados. Foram mantidas em solução de HNO_3 2% por diferentes períodos de tempo (1, 7 e 25 dias). A solução obtida foi analisada por ICP-MS para identificação de possíveis contaminantes.



Estudo de caso 02: Material de referência certificado ERM – CA615

Um pouco de detalhe sobre o candidato a material de referência....

3. Esterilização

A água inserida nas ampolas dos candidatos a material de referência certificado foi esterilizada por irradiação γ com fonte ^{60}Co , dose mínima de 25 kG γ . A irradiação causa uma mudança da cor do vidro de borossilicato passando de transparente para âmbar.

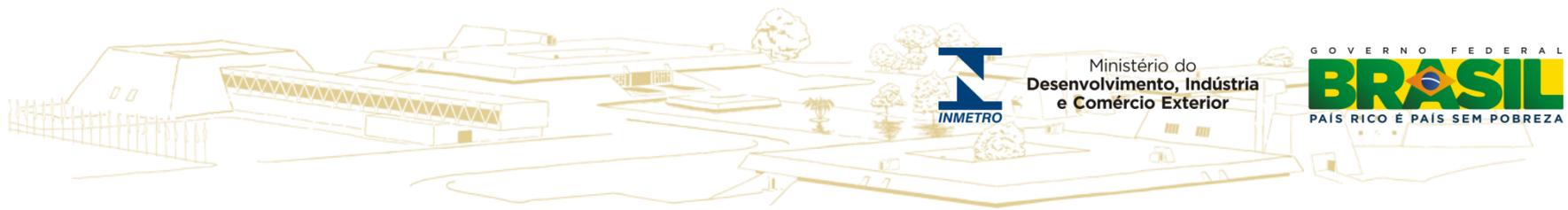
Foram envasadas 1838 unidades. O “head space” foi purgado com argônio antes de selar a ampola com chama usando um ampolador automático.



Um pouco de detalhe sobre o candidato a material de referência....

4. Avaliação da homogeneidade

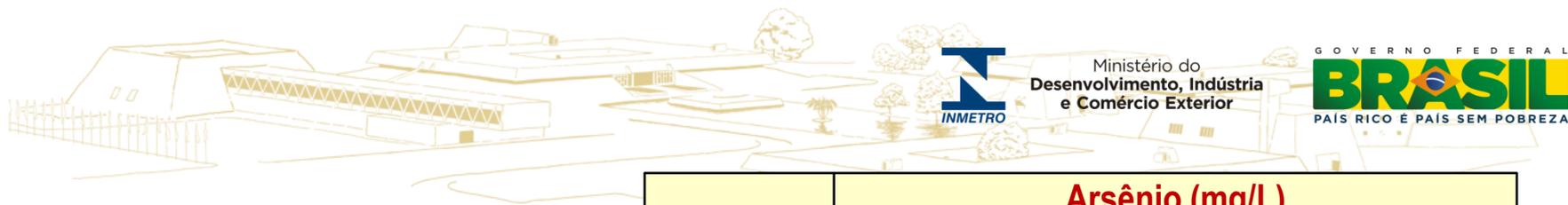
- ❖ 20 unidades foram selecionadas para o estudo ➔ PMR identificou partículas dentro das ampolas MESMO COM TODO O PRÉ-TRATAMENTO!!!;
- ❖ Cada amostra foi analisada em duplicata, filtrada e não filtrada, visando identificar possíveis diferenças entre as amostras do material;
- ❖ As análises foram realizadas em condições de repetitividade de forma aleatória, utilizando método analítico validado;
- ❖ Foram analisadas em conjunto amostras de controle e amostras branco;
- ❖ As determinações foram feitas via ICP-SFMS;
- ❖ Os dados foram comparados: amostras filtradas e não filtradas: teste-t para 95% (nível da confiança) ➔ todos os dados foram combinados para a avaliação da homogeneidade.



Um pouco de detalhe sobre o candidato a material de referência....

4. Avaliação da homogeneidade

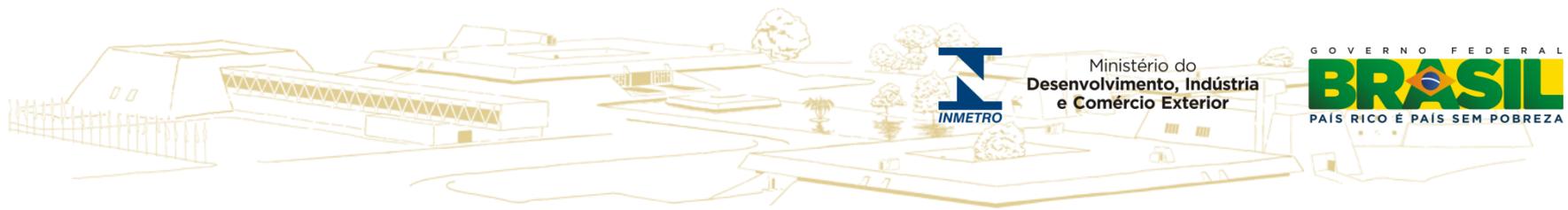
- ❖ Dados foram avaliados quanto a presença de extremos ou valores outliers:
 - Teste de Grubbs foi aplicado para $\alpha = 0,01$ e $0,05$, entretanto não foi identificada nenhuma razão técnica para os valores dados como discrepantes. Com isso, todos os dados foram mantidos para a Análise de Variância.



Dados referentes à avaliação da homogeneidade em relação ao parâmetro arsênio

Foram realizados os estudos para cada elemento a ser atribuído o valor de propriedade !!!

| Número da ampola | Arsênio (mg/L) | | | |
|------------------|----------------|---------|---------|---------|
| | Anal. 1 | Anal. 2 | Anal. 3 | Anal. 4 |
| 55 | 9,35 | 9,12 | 9,31 | 9,39 |
| 116 | 9,50 | 9,43 | 9,48 | 9,00 |
| 233 | 9,34 | 8,95 | 9,15 | 9,05 |
| 299 | 10,10 | 9,54 | 9,53 | 9,38 |
| 350 | 9,48 | 8,92 | 9,39 | 9,24 |
| 475 | 9,34 | 8,77 | 9,12 | 9,55 |
| 585 | 9,33 | 9,36 | 9,37 | 9,51 |
| 710 | 9,16 | 9,21 | 9,41 | 9,29 |
| 778 | 9,37 | 8,84 | 9,28 | 9,73 |
| 890 | 9,32 | 8,86 | 9,18 | 9,80 |
| 955 | 9,27 | 9,16 | 9,47 | 9,49 |
| 1081 | 9,58 | 9,13 | 9,37 | 9,39 |
| 1130 | 9,47 | 9,43 | 9,50 | 9,39 |
| 1187 | 9,32 | 9,14 | 9,32 | 9,33 |
| 1311 | 9,44 | 8,90 | 9,44 | 9,41 |
| 1430 | 8,96 | 9,51 | 9,34 | 9,14 |
| 1554 | 9,34 | 9,02 | 9,32 | 8,16 |
| 1615 | 9,39 | 8,41 | 9,50 | 9,58 |
| 1675 | 9,59 | 9,22 | 9,41 | 8,56 |
| 1795 | 9,40 | 9,60 | 9,66 | 9,48 |



ANOVA

| Fonte da variação | SQ | gl | MQ | F | valor-P | F crítico |
|-------------------|----------|----|----------|----------|----------|-----------|
| Entre grupos | 1,568124 | 19 | 0,082533 | 0,975609 | 0,500404 | 1,7626 |
| Dentro dos grupos | 5,075775 | 60 | 0,084596 | | | |
| Total | 6,643899 | 79 | | | | |

$$s_{wb} = \sqrt{MQ_{dentro}}$$



0,29 µg/L

3,1%

$$s_{bb} = \sqrt{\frac{MQ_{entre} - MQ_{dentro}}{n}}$$



A média quadrática dentro é menor que a média quadrática entre ampolas frascos

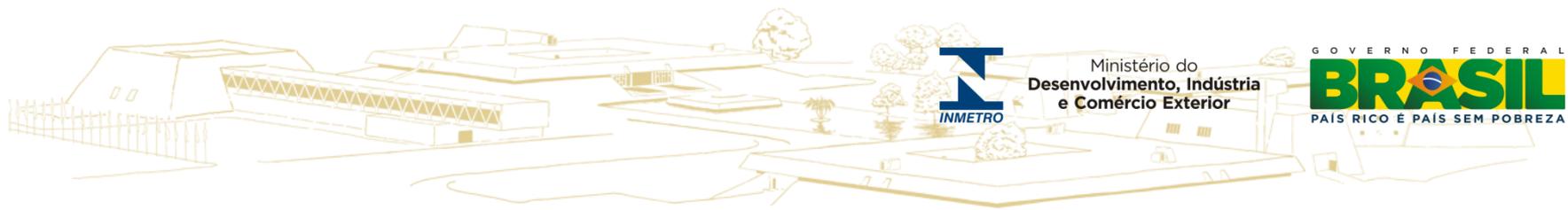
A heterogeneidade pode estar escondida pela repetitividade do método.



$$u_{bb} = \sqrt{\frac{MQ_{dentro}}{n} * \frac{2}{gl_{dentro}}}$$

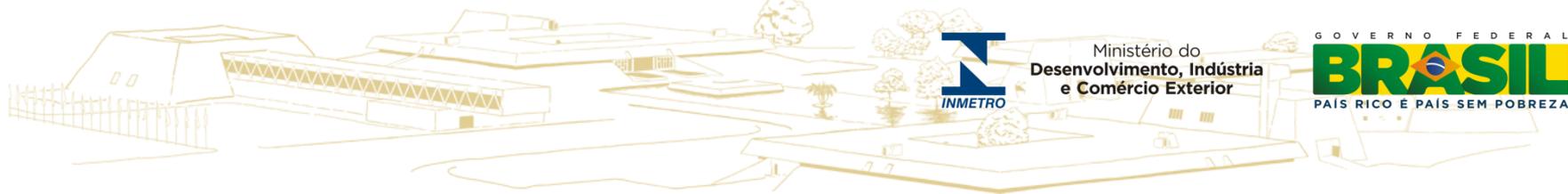


0,06 µg/L 0,7%



5. Etapa de caracterização do candidato a material de referência

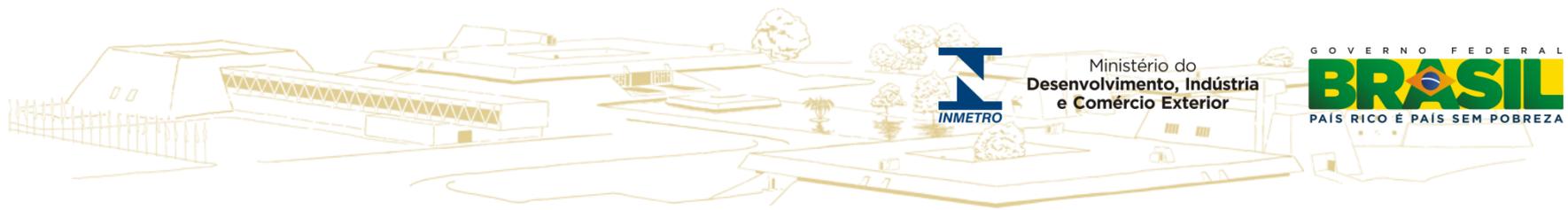
- ❖ Realizada com a realização de uma comparação interlaboratorial;
- ❖ Laboratórios só poderiam usar métodos validados;
 - ✓ Escolha dos laboratórios: parâmetros cobertos pelo escopo de acreditação;
 - ✓ Caso não fossem acreditados: envio de evidências para dar suporte a suas medições;
- ❖ Foram escolhidos laboratórios capazes de determinar o analito na matriz de interesse: no mínimo 02 laboratórios por método → interesse em demonstrar a ausência de tendência em relação ao método para a caracterização;
- ❖ Seis determinações independentes foram requeridas para cada laboratório: desta forma nova preparação de amostra era necessária para realizar a medição. Como foi descrito ao subcontratado que deveriam realizar as medições em dois dias, foi possível que o PMR avaliasse as condições de reprodutibilidade intralaboratorial (**planejamento prévio**);
- ❖ Foi solicitado que amostras controle fossem analisadas junto com o candidato a MRC, incluindo amostras branco. Amostras controle disponíveis pelo PMR (**BCR-610 (As, Cd e Pb) e ORMS-4 (Hg)**).



5. Etapa de caracterização do candidato a material de referência

- ❖ Análise crítica de todos os dados reportados pelos laboratórios:
 - ❖ Dados foram excluídos quando uma ou ambas amostras de referência (controles) não concordaram com os valores certificados e/ ou quando o coeficiente de variação foi superior a 12% (critérios de aceitação especificados previamente no planejamento da produção → **protocolo enviado aos laboratórios participantes do estudo**)

| Cód. Lab. | Arsênio ($\mu\text{g/L}$) | | | | | | | | | Média | U |
|-----------|-----------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-------|------|
| | Anal. 1 | Anal. 2 | Anal. 3 | Anal. 4 | Anal. 5 | Anal. 6 | Anal. 7 | Anal. 8 | Anal. 9 | | |
| L0 | 9,44 | 9,26 | 9,54 | 9,76 | 9,91 | 9,66 | | | | 9,60 | 0,17 |
| L1 | 10,41 | 9,86 | 11,23 | 9,91 | 11,48 | 11,36 | | | | 10,71 | 0,86 |
| L2 | 6,12 | 6,51 | 6,62 | 6,97 | 7,52 | 8,6 | | | | 7,06 | 0,36 |
| L4 | 10,1 | 10,6 | 10,8 | 10,2 | 10,7 | 10,3 | | | | 10,5 | 1,5 |
| L5 | 10,1 | 10,38 | 10,17 | 10,22 | 10,28 | 10,71 | | | | 10,31 | 2,68 |
| L6 | 9,26 | 9,74 | 9,93 | 9,36 | 9,77 | 9,98 | | | | 9,67 | 0,58 |
| L7 | 12 | 10,9 | 11,2 | 11,9 | 11,3 | 11,4 | 11,7 | 11,6 | 11,3 | 11,5 | 0,8 |
| L9 | 7,67 | 8,26 | 9,46 | 7,85 | 9,72 | 9,66 | | | | 8,8 | 2,0 |
| L10 | 10,74 | 10,45 | 11,83 | 10,52 | 10,32 | 10,56 | | | | 10,7 | 1,1 |
| L11 | 9,568 | 9,228 | 10,11 | 9,215 | 10,18 | 10,12 | | | | 9,74 | 0,68 |



| Cód. Lab. | Arsênio (µg/L) | | | | | |
|-----------|----------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | Anal. 1 | Anal. 2 | Anal. 3 | Anal. 4 | Anal. 5 | Anal. 6 |
| L0 | 9,44 | 9,26 | 9,54 | 9,76 | 9,91 | 9,66 |
| L4 | 10,10 | 10,60 | 10,80 | 10,20 | 10,70 | 10,30 |
| L5 | 10,10 | 10,38 | 10,17 | 10,22 | 10,28 | 10,71 |
| L6 | 9,26 | 9,74 | 9,93 | 9,36 | 9,77 | 9,98 |
| L9 | 7,67 | 8,26 | 9,46 | 7,85 | 9,72 | 9,66 |
| L10 | 10,74 | 10,45 | 11,83 | 10,52 | 10,32 | 10,56 |

$$u_{\text{caracterização}} = \sqrt{\frac{s_l^2}{p} + \frac{s_r^2}{n \cdot p}}$$

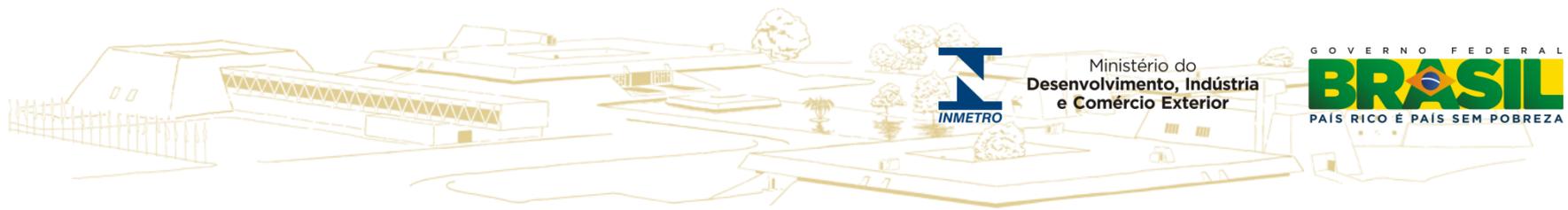
0,29 µg/L ou 2,96%

$$s_r = \sqrt{MQ_{dentro}}$$

$$s_l = \sqrt{\frac{MQ_{entre} - MQ_{dentro}}{n}}$$

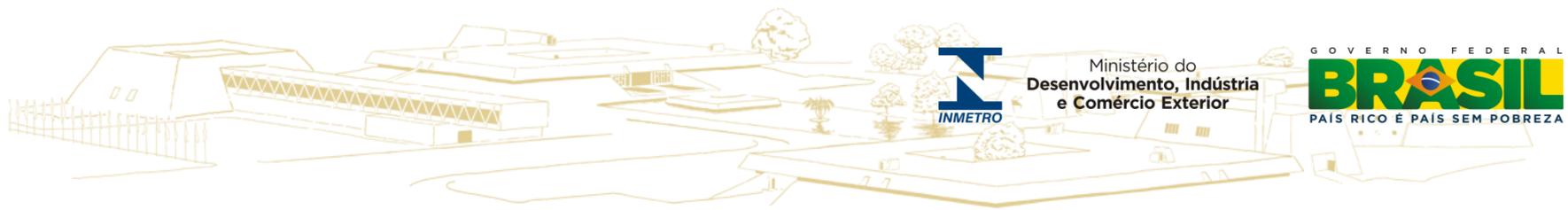
ANOVA

| Fonte da variação | SQ | gl | MQ | F | valor-P | F crítico |
|-------------------|--------|----|--------|--------|---------|-----------|
| Entre grupos | 15,533 | 5 | 3,1066 | 12,626 | 1,2E-06 | 2,5335 |
| Dentro dos grupos | 7,3819 | 30 | 0,2461 | | | |
| Total | 22,915 | 35 | | | | |



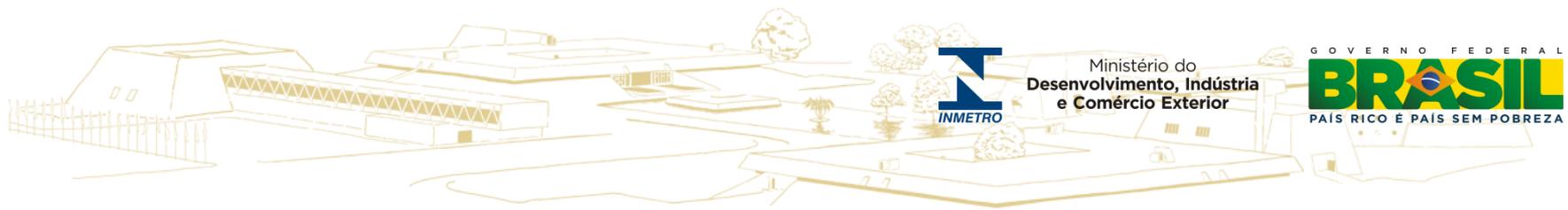
Declaração da rastreabilidade metrológica

- ❖ Os laboratórios quantificaram os analitos utilizando diferentes e independentes metodologias analíticas, tanto para o preparo das amostras quanto para os princípios de quantificação, com exceção do mercúrio pois uma técnica foi utilizada.
- ❖ Os laboratórios utilizaram “calibradores” (calibrants) disponíveis como substâncias puras, preparadas gravimetricamente in-house e/ou materiais de referências certificados.
- ❖ Para As, Cd, Fe, Pb, Mn e Ni houve concordância entre os resultados demonstrando ausência de tendência em relação ao método de medição.
- ❖ Somente métodos validados foram aceitos. Foi avaliada a concordância entre os valores certificados das amostras controle e os dados reportados pelos laboratórios, demonstrando ausência de tendência significativa, além de adequada elaboração da curva analítica.
- ❖ A realização de todas as condições acima expostas demonstram que os valores certificados são rastreáveis ao Sistema Internacional de Unidades (SI).



Comutatividade

- ❖ O material ERM-CA615 é um material proveniente de matriz natural com adição de elementos para o processo de certificação.
- ❖ Os laboratórios que participaram do estudo de caracterização foram selecionados para prover uma ampla variedade de métodos analíticos, considerando o preparo da amostra, etapas de calibração e quantificação. A concordância entre os resultados obtidos, levou à certificação de diversos parâmetros, demonstrando que o material de referência certificado ERM-CA615 exibe o mesmo comportamento que uma amostra típica de um laboratório e confirma sua comutatividade.



Estudo de caso 03: Material de referência certificado IRMM-354

Produtor de materiais de referência: IRMM Institute for Reference Materials and Measurements

Comissão Européia, Bélgica

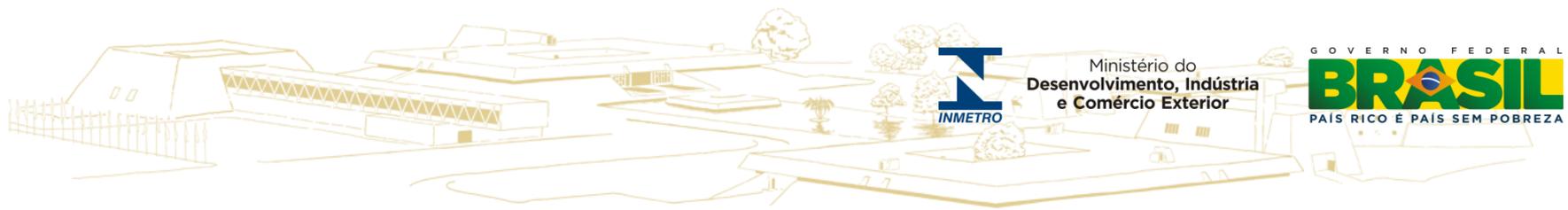
Emissão do relatório de certificação: 2009

Responsáveis pela emissão do relatório: L. De Baets, N. Meeus, H. Schimmel

Descrição do MRC: material de referência de *Candida albicans*

O IRMM já vinha comercializando materiais de referência com certificação de unidades formadoras de colônia (cfu) cobrindo 06 diferentes microrganismos em alimentos e em água. Entretanto, efeitos de medição, como a distribuição dos resultados de medição (distribuição de Poisson) para baixos valores de cfu, levaram o PMR a desenvolver abordagens alternativas para produção e certificação de materiais de referência.

A produção de freeze-dried Bioballs™ é baseada na transferência de um número de células de bactérias ou leveduras em um único material esférico.

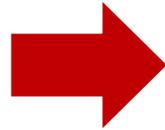


Estudo de caso 03: Material de referência certificado IRMM-354

Etapas da produção

Processamento do material de referência: BTF Pty Ltd. (North Ryde, Austrália)

Avaliação da homogeneidade
Avaliação da estabilidade
Caracterização adicional



IRMM

**Produtor responsável por todo o planejamento da produção
Total controle e definição dos critérios para escolha dos subcontratados!!!**

Caracterização do material de referência

IRMM

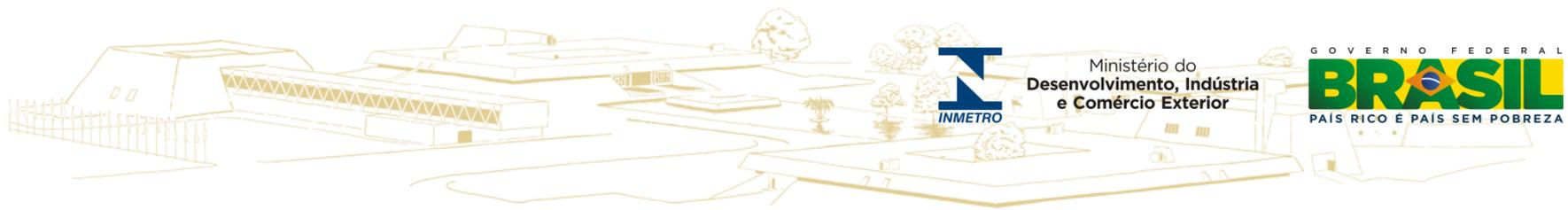
CCFRA (acreditação ISO/IEC 17025)

TNO

Central Veterinary Institute (certificado ISO 9001)

Institut Pasteur de Lille (acreditação ISO/IEC 17025)

Food and consumer product safety authority (acreditação ISO/IEC 17025)



Estudo de caso 03: Material de referência certificado IRMM-354

Etapas da produção

1000 unidades foram produzidas (material esférica com a célula transferida) e estocadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$;

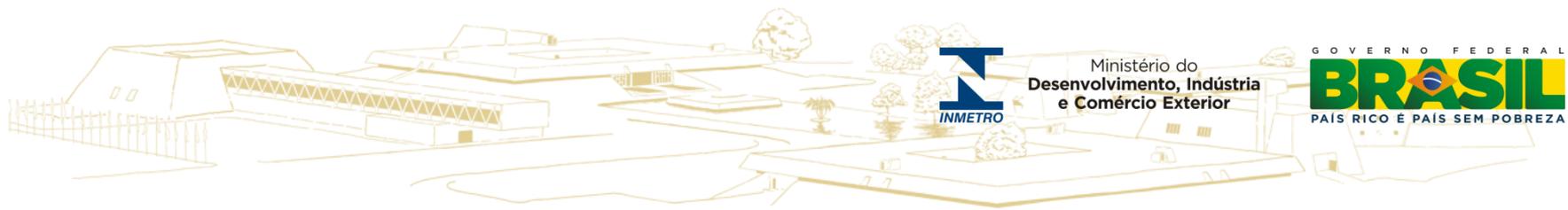
O PMR realizou o plaqueamento e contagem de unidades formadoras de colônia em dois tipos de agar (NA de acordo com a norma ISO 7218 e OGYE de acordo com a norma ISO 13681);

Para estimar a quantidade de unidades a serem utilizadas no **estudo da homogeneidade** do lote de candidato a material de referência produzido o produtor utilizou a seguinte equação:

$$\sqrt[3]{1000} = 10$$

Ref.: van der Veen, A.M.H, Linsinger, T.P.J, Pauwels, J. (2001), *Acqual*, 6, 26-30.

Foi realizada a avaliação tanto para plaqueamento em NA quanto para OGYE !!!



Estudo de caso 03: Material de referência certificado IRMM-354

Avaliação da estabilidade do candidato a material de referência

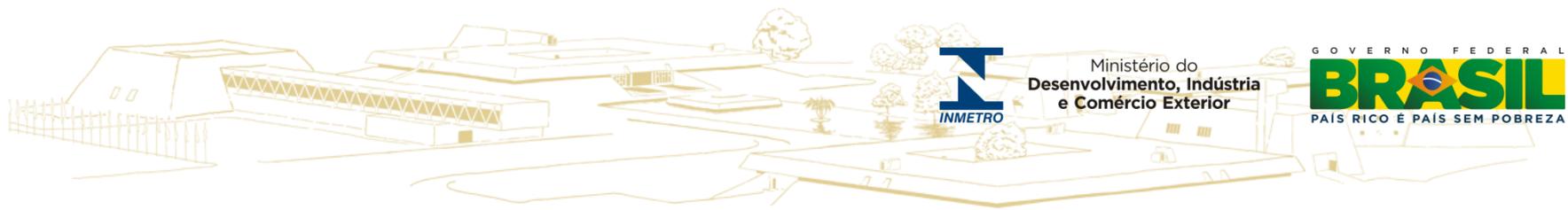
Tempo em meses



| Meio NA | t=0 | t=3 | t=6 | t=9 | t=12 | t=18 |
|--------------|-------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|
| Temperatura | | | | | | |
| -20 | 1016 | 897 | 956 | 1091 | 950 | 998 |
| -20 | 1036 | 972 | 971 | 1221 | 1043 | 938 |
| -20 | 1005 | 1000 | 703* | 1002 | 1027 | 939 |
| Média | 1019 | 956 | 877 | 1105 | 1007 | 958 |
| -70 | 1016 | 1038 | 937 | 1036 | 1011 | 959 |
| -70 | 1036 | 815* | 909 | 1013 | 971 | 1010 |
| -70 | 1005 | 939 | 866 | 980 | 1006 | 967 |
| Média | 1019 | 931 | 904 | 1010 | 996 | 979 |

O teste de Grubbs foi utilizado e dois valores discrepantes foram detectados, entretanto não foram excluídos. O PMR investigou se houve alguma razão técnica para tal valor discrepante, mas não conseguiu identificá-la.

Foi realizada a avaliação tanto para plaqueamento em NA quanto para OGYE !!!

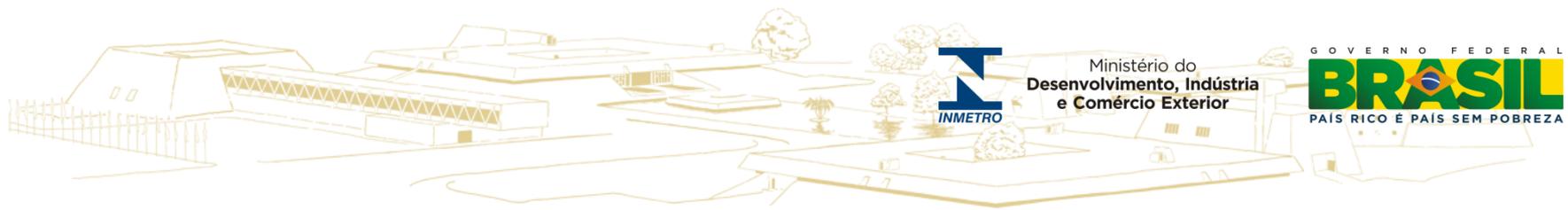


A avaliação da estabilidade foi feita através do cálculo dos coeficientes angular e linear a partir do método dos mínimos quadrados e aplicação do seguinte critério:

$|b_1| < t_{0,95;n-2} \cdot S_{(b_1)}$ Caso o critério seja atendido, o coeficiente angular (b_1) não é significativo e, conseqüentemente, o material se manteve estável ao longo do estudo.

$S_{(b_1)}$ consiste na incerteza associada ao coeficiente angular e pode ser calculada através:

$$S_{(b_1)} = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - b_0 - b_1 x_i)^2}{n-2}}}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} = \frac{MQ_r}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$



Análise de variância para regressão linear utilizada no estudo de estabilidade.

| Fonte de Variação | SQ | gl | MQ | F |
|-------------------|---|-----|---------------------------|---------------------|
| Regressão | $SQ_R = \sum_i^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2$ | 1 | $MQ_R = \frac{SQ_R}{1}$ | $\frac{MQ_R}{MQ_r}$ |
| Resíduo | $SQ_r = \sum_i^n (y_i - \hat{y}_i)^2$ | n-2 | $MQ_r = \frac{SQ_r}{n-2}$ | |
| Total | $SQ_T = \sum_i^n (y_i - \bar{y})^2$ | n-1 | | |

Fonte: ISO, 2006.

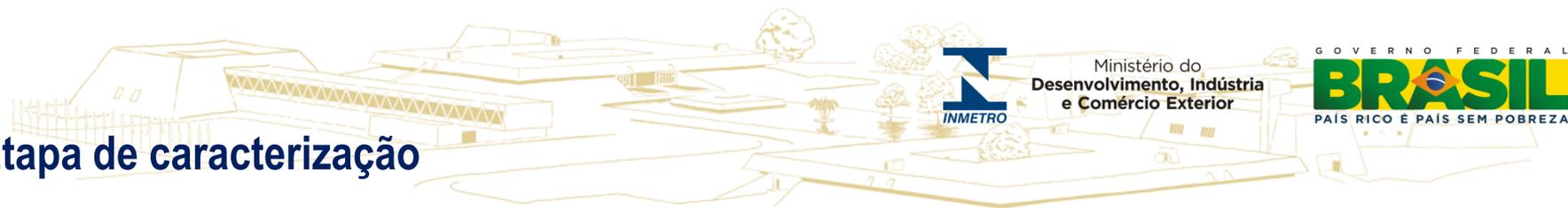
Avaliação para a significância da inclinação após 18 meses de estudo

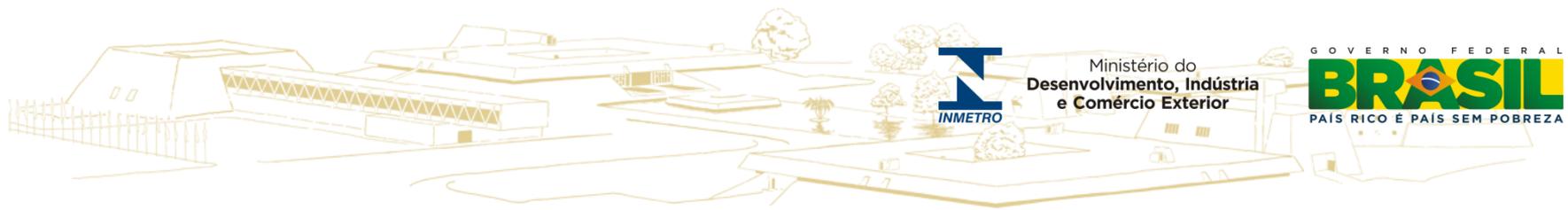
| Temperature [°C] | Agar | slope <i>b</i> | intercept <i>a</i> | relative <i>u_b</i> | $ b / u_b$ | <i>t</i> _{crit} (0.05; 16) |
|------------------|------|----------------|--------------------|-------------------------------|-------------|-------------------------------------|
| -20 | NA | 0.13 | 985.89 | 4.12 | 0.03 | 2.12 |
| -70 | NA | 0.80 | 966.64 | 2.51 | 0.32 | 2.12 |
| -20 | OGYE | -0.61 | 996.59 | 2.45 | 0.25 | 2.12 |
| -70 | OGYE | -2.46 | 983.87 | 2.54 | 0.97 | 2.12 |

Etapa de caracterização

06 laboratórios participantes;
15 materiais esféricos em NA e 15 em OGYE;
Resultados de medição para NA:

| Nº Vial | Lab 1 | Lab 2 | Lab 3 | Lab 4 | Lab 5 | Lab 6 |
|--------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|
| 1 | 804 | 1050 | 953 | 978 | 799 | 984 |
| 2 | 801 | 985 | 906 | 997 | 854 | 994 |
| 3 | 868 | 851 | 922 | 961 | 919 | 1014 |
| 4 | 969 | 850 | 869 | 1048 | 824 | 1046 |
| 5 | 651 | 924 | 888 | 1039 | 877 | 1010 |
| 6 | 878 | 943 | 982 | 972 | 793 | 1048 |
| 7 | 912 | 836 | 1028 | 980 | 658 | 1040 |
| 8 | 864 | 984 | 992 | 975 | 865 | 1047 |
| 9 | 834 | 901 | 897 | 1016 | 898 | 1051 |
| 10 | 903 | 945 | 910 | 1026 | 764 | 970 |
| 11 | 717 | 875 | 975 | 861 | 835 | 1011 |
| 12 | 696 | 946 | 1000 | 1025 | 801 | 897 |
| 13 | 925 | 1140 | 926 | 916 | 813 | 992 |
| 14 | 842 | 1018 | 930 | 969 | 718 | 982 |
| 15 | 904 | 976 | 929 | 643 | 682 | 1002 |
| Média | 838 | 948 | 940 | 960 | 807 | 1006 |
| s | 90,4 | 82,5 | 46,0 | 100,2 | 75,7 | 40,5 |





Etapa de caracterização

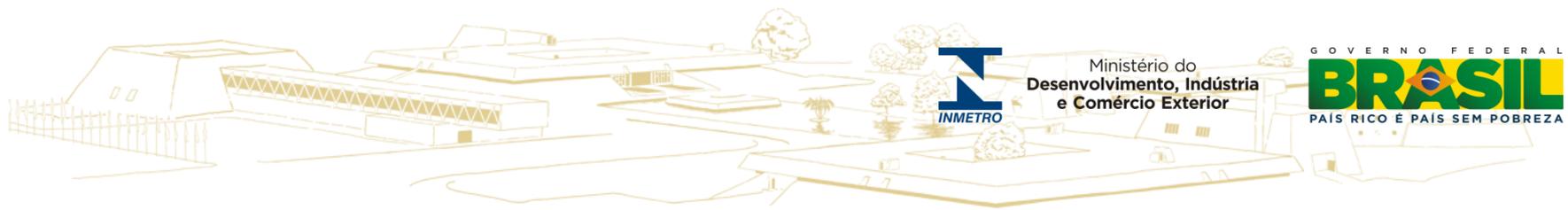
Teste de Grubbs foi aplicado para a avaliação de outliers;
A incerteza referente à caracterização do material foi calculada pela equação:

$$u_{\text{caracterização}} = \frac{S_{\text{medições}}}{\sqrt{n}}$$

onde n corresponde ao número de laboratórios!

Para confirmação do estudo...Caracterização adicional

Três amostras foram escolhidas aleatoriamente do lote e foram analisadas pela amplificação do gene hwp1 por PCR usando primers CRR-f e CRR-r.. O programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) compara seqüências de nucleotídeos ou proteínas e calcula a probabilidade de ser determinado microrganismo comparando-se com uma base de dados genéticos (GenBank). 99% de confirmação foi obtida em relação ao gene hwp1 da *Candida albicans* confirmando a autenticidade do DNA genômico produzido (gDNA).



Estudo de caso 04: Material de referência certificado BAM-P012

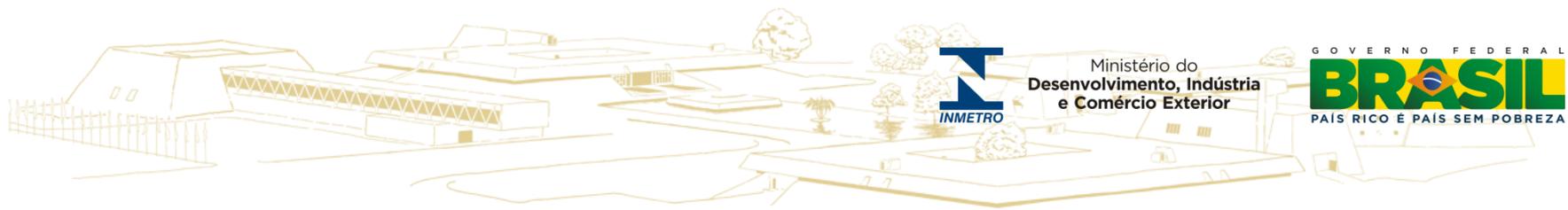
Produtor de materiais de referência: BAM Federal Institute for Materials Research and Testing

Berlim, Alemanha

Emissão do relatório de certificação: 2007

Responsáveis pela emissão do relatório: u. Just, St. Weidner

Descrição do MRC: material de referência de poliestireno



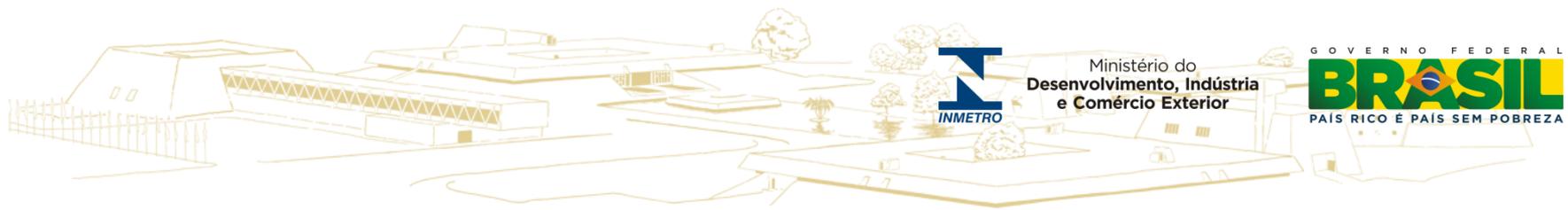
Avaliação da estabilidade

Previamente estudos de estabilidade para dois materiais de referência de poliestireno com diferentes pesos moleculares foram realizados pelo BAM;

- ❖ Tal estudo foi conduzido armazenando as amostras por dois anos a temperaturas elevadas (40 °C)
- ❖ Não demonstraram mudanças significativas da massa molecular;

Desta forma, o PMR declarou que de acordo com o Guide 35: 2006, na situação em que mudanças no material possam ser razoavelmente negligenciáveis, a contribuição da incerteza do método utilizado para o estabelecimento da insignificância da alteração tem que ser incluído no balanço de incerteza do valor certificado.

A contribuição, para este caso, foi calculada através da repetitividade do método SEC (size exclusion chromatography). O material foi considerado estável e com validade de 05 anos, caso seja armazenado em ambiente sêco e protegido da luz, a temperatura abaixo de 7 °C.



Obrigada pela atenção!

www.inmetro.gov.br

rmborges@inmetro.gov.br