



Programa de  
Acreditação de

**OAC**

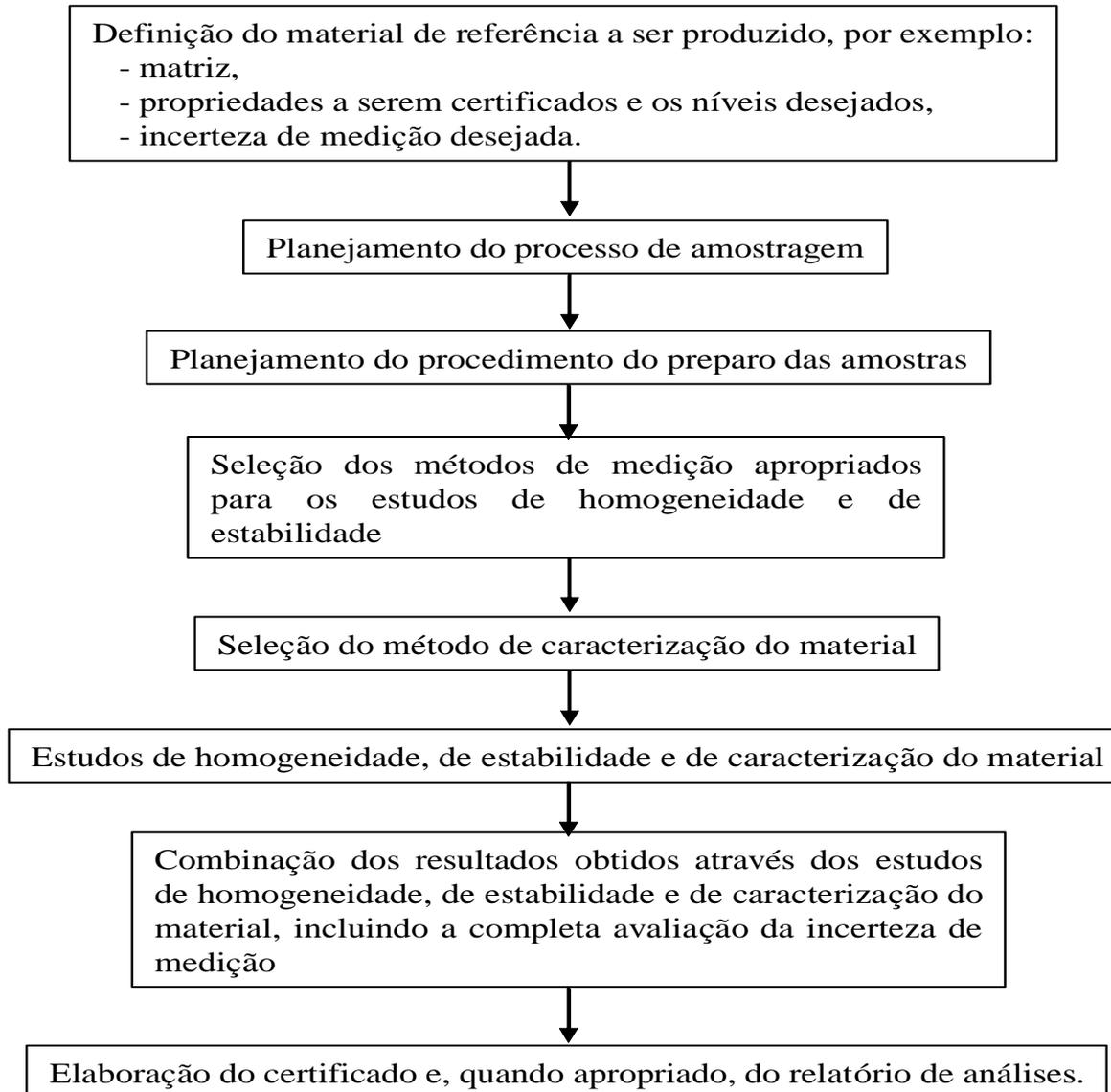
Coleções de Cultura  
dos Centros de  
Recursos Biológicos



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



# **Discussão de relatórios técnicos de produção de materiais de referência**



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

## ABNT ISO Guia 35: 2012

- este Guia fornece modelos para ensaios de homogeneidade, ensaios de estabilidade e a caracterização do candidato a MRC.
- conhecimento do material e suas propriedades e dos métodos de medição empregados durante os ensaios de homogeneidade, de estabilidade e caracterização do material, juntamente com um amplo conhecimento dos métodos estatísticos



**são necessários para o processamento e interpretação corretos dos dados experimentais em um projeto de certificação típico.**



A quantidade de material requerida é estabelecida pelo:

- número de amostras do MR(C) requeridas;
- necessidade de estudo de viabilidade;
- número de amostras requeridas para o estudo de homogeneidade;
- número de amostras requeridas para o estudo de estabilidade;
- número de amostras requeridas para a caracterização do candidato a MRC;
- quantidade de material requerida para uma medição.

## Sobre a avaliação da homogeneidade ....

O número ideal de amostras para um estudo de homogeneidade pode ser determinado através de técnicas de planejamento apoiadas estatisticamente.

o número de frascos depende do tamanho do lote, de modo que o número de amostras tiradas do lote pode ser considerado como **“representativo” do lote todo.**

## Sobre a avaliação da estabilidade ...

- visa determinar o grau de instabilidade remanescente do candidato a MR após a preparação ou confirmar a estabilidade do material.
- uma distinção é feita entre a estabilidade sob condições especificadas:
  - de armazenamento (estabilidade a longo prazo), e
  - de transporte.

**ISO/IEC17025**

Como no caso de um estudo de homogeneidade, os aspectos da garantia de qualidade são tão importantes quanto a avaliação das incertezas devido aos efeitos da instabilidade.

- estabilidade a longo prazo está relacionada à instabilidade remanescente dos valores de propriedade do MRC sob condições de armazenamento especificadas.
  - é importante especificar adequadamente tais condições e estudar a estabilidade do material sob as mesmas condições.
  - recomenda-se escolher uma **temperatura de referência** de tal modo que seja praticamente certo que o material seja estável nesta temperatura.
  
- muitos materiais de referência **biológicos e ambientais** apresentam algum grau de instabilidade, apesar do empenho na definição/determinação das condições ideais de armazenamento.

**condições de transporte sejam** idealmente escolhidas de modo que a instabilidade do material durante o transporte não exceda aquela do material nas prateleiras do produtor.

□ estudo de estabilidade a curto prazo é tipicamente realizado em diferentes temperaturas a fim de estudar o efeito da temperatura sobre as propriedades do material.

□ com base nos efeitos observados, podem ser definidas as condições de transporte e elaboradas as instruções de embalagem, para efetivamente eliminar quaisquer efeitos secundários indesejáveis.

□ um estudo de estabilidade a curto prazo leva, tipicamente, 1 a 2 meses, podendo levar mais tempo quando as condições ideais de armazenamento têm que ser simultaneamente determinadas.

□ estudo de estabilidade a longo prazo requer um número considerável de frascos (unidades). De preferência, é conveniente que mais de um frasco esteja disponível para cada ponto no tempo. Como os estudos de estabilidade levam, em sua maioria, entre 24 e 36 meses para serem realizados, com, tipicamente, 5 ou 6 pontos no tempo, pelo menos 10 a 12 frascos são necessários para cada temperatura.

**Menor incerteza**

**O método preferido para a realização de um estudo de estabilidade em uma certificação de lote consiste em trabalhar sob condições de repetitividade.**



□ a incerteza de um material de referência pode ser expressa da seguinte maneira:

- incerteza do valor certificado conforme obtida para o lote (caracterização);
- transferida para uma única embalagem (homogeneidade);
- como enviada para o cliente (estabilidade a curto prazo);
- na ocasião da venda (estabilidade a longo prazo).

□ esta definição da incerteza associada ao valor de propriedade de um MRC considera os seguintes fatores:

- a caracterização (completa) do material é acompanhada de uma incerteza;
- o usuário utilizará (via de regra) apenas uma amostra de cada vez;
- o material será armazenado por um período maior de tempo pelo produtor / distribuidor;
- o material deve ser transportado até o usuário.

$$x_{\text{CRM}} = x_{\text{char}} + \delta x_{\text{bb}} + \delta x_{\text{lts}} + \delta x_{\text{sts}} \quad \rightarrow \quad u_{\text{CRM}} = \sqrt{u_{\text{char}}^2 + u_{\text{bb}}^2 + u_{\text{lts}}^2 + u_{\text{sts}}^2}$$



## **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

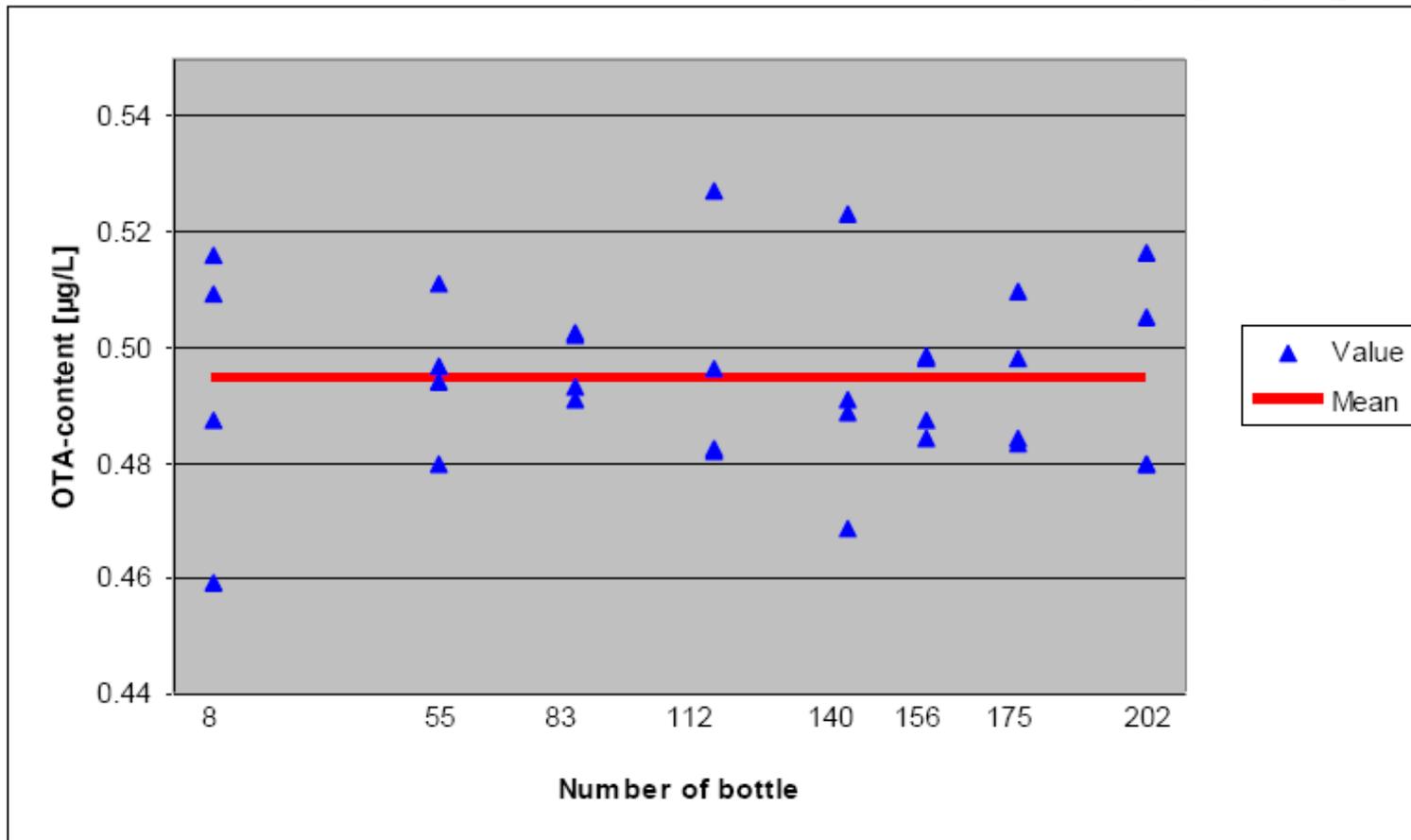
### ANOVA

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:

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

**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

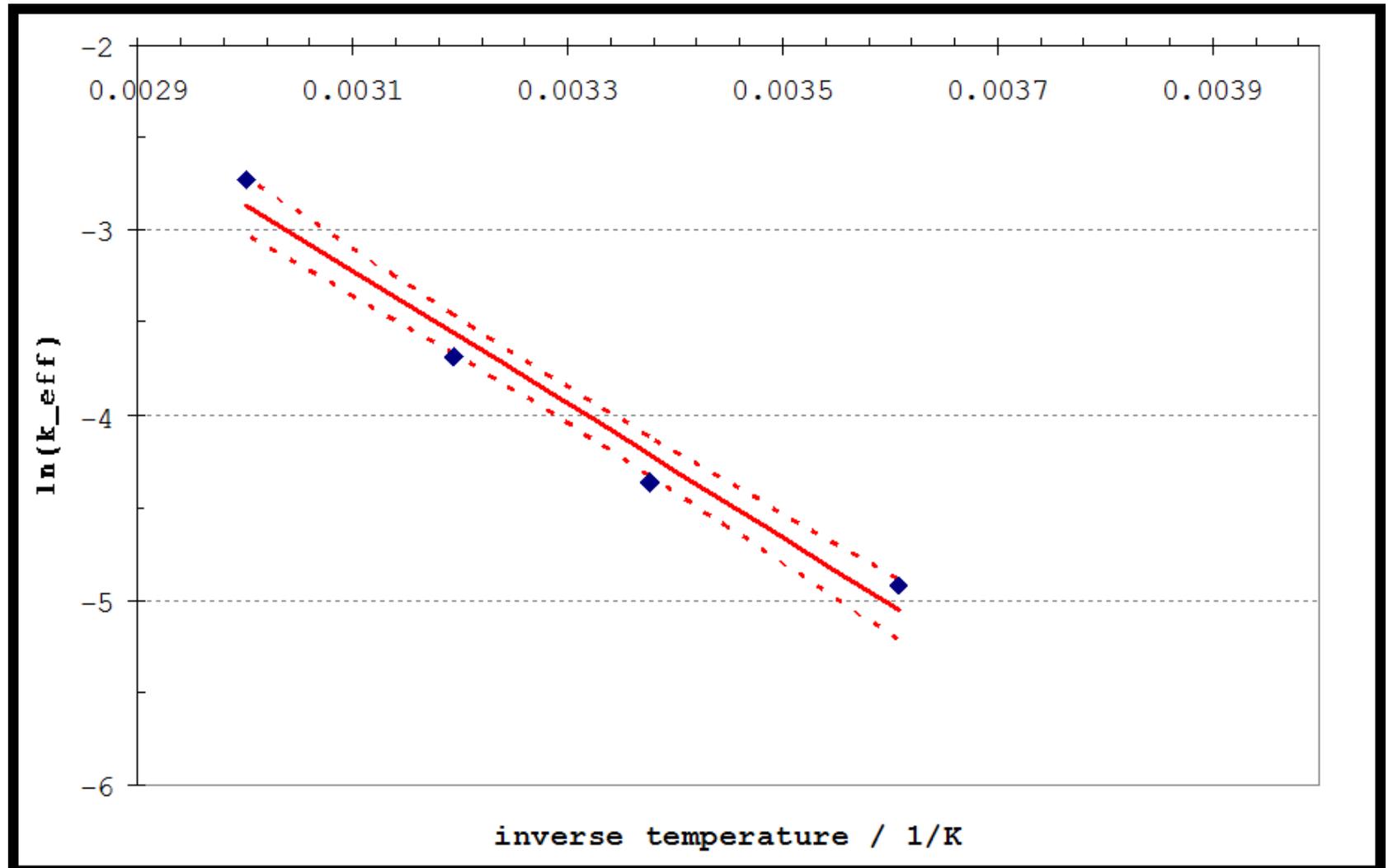
A partir da experiência analítica do PMR foi destacada a deterioração da OTA com o aumento de temperatura. Com isso, frascos foram selecionados para se realizar um estudo com variações de temperatura entre 4 °C e 60 °C por um período de 01 semana a 12 meses.

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
<b>24</b>					<b>Monitoramento pós-certificação</b>
<b>36</b>					<b>Monitoramento pós-certificação</b>
<b>48</b>					<b>Monitoramento pós-certificação</b>

## 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**

## 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  $^{13}\text{C}$ -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 <sup>1)</sup>	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 <sup>2)</sup> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	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

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)
$^{13}\text{C}$ 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  $^{13}\text{C}$ -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
<b>As</b>	9,9 µg/L	0,7 µg/L
<b>Cd</b>	0,106 µg/L	0,011 µg/L
<b>Fe</b>	5,11 mg/L	0,26 mg/L
<b>Hg</b>	0,037 µg/L	0,004 µg/L
<b>Mn</b>	107 µg/L	5 µg/L
<b>Ni</b>	25,3 µg/L	1,1 µg/L
<b>Pb</b>	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  $\text{HNO}_3$  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  $\text{HNO}_3$  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  $\gamma$  com fonte  $^{60}\text{Co}$ , dose mínima de 25 kG  $\gamma$ . 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 (mg/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 (mg/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.

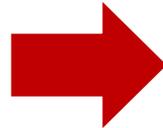
A produção de freeze-dried Bioballs™ é baseada na transferência de um número de células de bactérias ou leveduras em um único material esférico.

## 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  $-70^{\circ}\text{C}$ ;

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
<b>Média</b>	<b>1019</b>	<b>956</b>	<b>877</b>	<b>1105</b>	<b>1007</b>	<b>958</b>
-70	1016	1038	937	1036	1011	959
-70	1036	815*	909	1013	971	1010
-70	1005	939	866	980	1006	967
<b>Média</b>	<b>1019</b>	<b>931</b>	<b>904</b>	<b>1010</b>	<b>996</b>	<b>979</b>

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<sub>b</sub></i>	$ b  / u_b$	<i>t</i> <sub>crit</sub> (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
<b>Média</b>	<b>838</b>	<b>948</b>	<b>940</b>	<b>960</b>	<b>807</b>	<b>1006</b>
<b>s</b>	<b>90,4</b>	<b>82,5</b>	<b>46,0</b>	<b>100,2</b>	<b>75,7</b>	<b>40,5</b>

## 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 IRMM-447

- propósito do MRC: suporte na harmonização e validação de método PCR;
- Central Science Laboratory (York, UK): responsável pelo isolamento e purificação do gDNA da *Listeria monocytogenes* NCTC11994 ← **Subcontratado!!!**
- produção e certificação foi realizada pelo IRMM;
- planejamento da avaliação da homogeneidade:
  - método repetitivo (demonstração prévia) para quantificação de gDNA: PicoGreen (CV = 2,4%; para uma concentração de 50 ng/mL);
  - a máxima contribuição relação à não homogeneidade a ser combinada no balanço final = 6%;
  - foram produzidos 2394 vials;
  - número de vials utilizados na avaliação da homogeneidade

$$N = \sqrt[3]{2394} = 13,4 \approx 20 \text{ unidades}$$

Número de determinações  
por vial = 3

Vial	massa gDNA ( $\mu\text{g}$ )			
	n=1	n=2	n=3	média
71	1,20	1,11	1,11	1,14
172	1,02	0,97	0,99	0,99
247	0,91	0,93	0,93	0,92
305	0,98	0,99	0,94	0,97
470	0,97	0,96	0,88	0,94
550	0,92	0,91	0,97	0,93
597	1,00	1,01	0,97	0,99
690	1,39	1,43	1,43	1,42
775	1,29	1,30	1,31	1,30
898	0,94	0,96	0,91	0,94
933	1,47	1,50	1,50	1,49
1061	1,03	1,03	1,05	1,04
1151	0,55	0,55	0,51	0,54
1276	1,13	1,12	1,15	1,13
1316	1,48	1,50	1,57	1,52
1413	1,38	1,34	1,40	1,37
1577	1,48	1,48	1,44	1,47
1636	1,43	1,37	1,42	1,41
1929	1,51	1,53	1,48	1,51
2207	0,89	0,78	0,80	0,82



## Dados da avaliação da homogeneidade

## ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	4,357367	19	0,229335	<b>237,2432</b>	4,03E-35	1,852892
Dentro dos grupos	0,038667	40	0,000967			
Total	4,396033	59				

**Varição entre vials (sbb) foi igual a 14% !!!**

**Mesmo com valores acima do esperado para variação entre frascos, o processo foi finalizado!**

**Para o estudo de estabilidade a longo prazo foi utilizada a variabilidade obtida com um **outro material de referência**: IRMM-449: gDNA de *Escherichia coli* O157 (ults = 27,5%)**

**Como ficaria tal abordagem a luz do Guide 34 ???**



**Obrigada pela atenção!**

**[www.inmetro.gov.br](http://www.inmetro.gov.br)**

**[rmborges@inmetro.gov.br](mailto:rmborges@inmetro.gov.br)**