



# CERTIFICAÇÃO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA POR INTERMÉDIO DE RODADA DE ENSAIO DE PROFICIÊNCIA

*Marcus Henrique C. de la Cruz, Maria Helena W. M. Cardoso, Lucia Helena P. Bastos, Adherlene V. Gouvêa  
Armi W. da Nóbrega*

INCQS/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil, marcus.delacruz@incqs.fiocruz.br

**Resumo:** A certificação de um Material de Referência de agrotóxicos em polpa de tomate a partir dos resultados de um Ensaio de Proficiência é apresentada nesse trabalho. Os analitos certificados foram Clorpirifós, Fenitrotiona, Oxifluorfem, Permetrina e Trifluralina.

**Palavras chave:** Material de Referência Certificado, Certificação, Ensaio de Proficiência, Agrotóxicos, Alimentos.

## 1. INTRODUÇÃO

Por definição, Material de Referência Certificado (MRC) é o material suficientemente homogêneo e estável em relação a uma ou mais propriedades específicas, que é estabelecido para o seu uso em um processo de medição [1].

A utilização de MRC nos processos de calibração e ensaio é uma exigência da norma NBR ISO/IEC 17025 [2], uma vez que estes materiais são ferramentas essenciais para o controle da qualidade dos processos de medição, pois conferem rastreabilidade e confiabilidade ao resultado. O MRC vem acompanhado de um certificado, onde são mencionados os valores das grandezas de interesse com as respectivas incertezas, e a sua certificação é realizada utilizando ferramentas como metodologias primárias e intercomparações laboratoriais.

A certificação de um material de referência é realizada conforme os requisitos das normas ISO da série 30 (ISO GUIDE 30 a 35) [3,4]. A ISO GUIDE 35 [4] estabelece que o processo de certificação de um Material de Referência (MR) requer um estudo criterioso de todas as fontes de incerteza que impactam na validade dos valores certificados. De uma forma geral, estas fontes são correspondentes à incerteza da caracterização, à incerteza da homogeneidade, à incerteza da estabilidade inerente ao transporte (estabilidade de curta duração) e à incerteza de estabilidade inerente ao armazenamento (estabilidade de longa duração), as quais são imprescindíveis para o desenvolvimento e a certificação de um MR.

## 2. OBJETIVOS

Descrever o processo de certificação do material de referência (MR) de Polpa de Tomate, lote INCQS-MRC02 a partir dos resultados da 5ª Rodada do Ensaio de Proficiência para a Determinação de Agrotóxicos em Alimentos – matriz Tomate.

## 3. METODOLOGIA

O candidato a material de referência certificado de Polpa de Tomate, lote INCQS-MRC02, foi preparado e analisado quanto ao seu grau de homogeneidade e estabilidade no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro/RJ a partir do mês de abril de 2009, sendo o seu envase realizado em 28/04/2009.

### 3.1. Preparação do Lote INCQS-MRC02

Aproximadamente 16.000 g de tomate adquiridos na cidade do Rio de Janeiro foram utilizados para o preparo do material. Os tomates foram lavados, descascados e suas sementes retiradas antes de processados em liquidificador. Este volume de polpa de tomate foi homogeneizado com o auxílio de um agitador mecânico e após 30 minutos retirou-se quantidade suficiente para servir como branco da amostra, 3.000 g. Em seguida foram mantidos em congelador sob temperaturas entre -10 a -25 °C até o momento de fortificação. O volume de polpa preparada para fortificação foi de aproximadamente 7.000 g.

Após a homogeneização o lote preparado foi envasado em frascos de vidro inequivocamente identificadas, perfazendo um total de 150 frascos de polpa de tomate fortificado e 50 frascos de branco de matriz.

Os agrotóxicos, suas purezas e suas concentrações teóricas adicionadas ao lote de polpa de tomate produzido, bem como os limites máximos de resíduo permitido – LMR para a cultura de tomate, no Brasil, são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Concentrações teóricas finais dos agrotóxicos adicionados à polpa de tomate.

Agrotóxico	Pureza (certificado)	Concentração (mg/kg)	LMR (mg/kg)
Clorpirifós	98,5 %	0,036	0,5
Fenitrotiona	97,7 %	0,054	Não Indicado
Oxifluorfem	97,5 %	0,056	Não Indicado
Permetrina	94,5 %	0,108	0,3
Trifluralina	99,5 %	0,057	0,05

### 3.2. Quantificação Analítica dos Agrotóxicos da Polpa de Tomate

Os agrotóxicos fortificados neste lote de polpa de tomate foram analisados pelo método Luke modificado [5].

### 3.3 Estudo de Homogeneidade

O teste de homogeneidade foi executado no dia 30/04/2009, no laboratório de resíduos de agrotóxicos do INCQS e a homogeneidade foi avaliada através de medições

analíticas realizadas em duplicatas (A e B) genuínas de 10 (dez) itens de ensaio, separados aleatoriamente, do candidato à MRC. A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos nas análises cromatográficas.

Tabela 2 – Resultados, em mg/kg, das análises do estudo de homogeneidade.

Item de Ensaio	Trifluralina		Oxifluorfem		Clorpirifós		Fenitrotiona		Permetrina	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
11	0,047	0,052	0,066	0,068	0,030	0,033	0,045	0,054	0,103	0,106
16	0,045	0,045	0,068	0,069	0,034	0,031	0,050	0,048	0,100	0,093
47	0,037	0,043	0,064	0,068	0,029	0,032	0,046	0,047	0,099	0,093
54	0,039	0,047	0,068	0,068	0,030	0,031	0,047	0,048	0,099	0,117
62	0,039	0,044	0,065	0,067	0,029	0,031	0,046	0,047	0,095	0,110
65	0,045	0,042	0,067	0,067	0,033	0,031	0,047	0,046	0,097	0,111
78	0,042	0,049	0,064	0,068	0,031	0,032	0,046	0,047	0,093	0,109
101	0,048	0,048	0,069	0,066	0,033	0,031	0,047	0,048	0,118	0,088
109	0,043	0,040	0,067	0,065	0,030	0,030	0,046	0,044	0,118	0,087
143	0,046	0,040	0,066	0,066	0,031	0,031	0,048	0,046	0,090	0,103

### 3.4. Estudo de Estabilidade

O estudo de estabilidade de longa duração visa estimar as condições de armazenamento nas quais a(s) propriedade(s) certificada(s) do MRC se mantém. Neste tipo de estudo, é estimada a validade do MRC.

Desta forma, a estabilidade de longa duração foi avaliada na condição clássica para armazenamento das amostras que é em 'freezer' sob temperaturas entre -10 a -25 °C durante o período de 1 (um) ano. Foram analisados 2 frascos em cada dia, preparados em duplicata. O estudo foi realizado pelo método clássico onde as amostras são analisadas em dias diferentes.

Os valores utilizados na análise de regressão correspondem aos valores médios obtidos em cada ponto no tempo (dia de análise). Na Tabela 4 estão apresentados os

resultados médios obtidos durante os dias de estudo pelo INCQS/Fiocruz para o estudo de estabilidade da amostra.

A ISO Guide 35 [4], estabelece que a avaliação da estabilidade do material seja realizada pela análise de resíduos da regressão linear e a análise de variância (ANOVA), que consiste em observar se a regressão linear dos valores de concentração dos analitos ao longo do tempo apresenta alguma tendência. Se a inclinação da reta ou a não linearidade da mesma não forem significativas, ou seja, se a concentração do agrotóxico não variar em função do tempo, o material é considerado estável. Considera-se estável o agrotóxico que apresenta o valor-P maior que 0,05 (95%), indicando que a inclinação da reta da regressão linear é insignificante, podendo ser considerada igual a zero.

Tabela 3 – Resultados, em mg/kg, das análises do estudo de estabilidade.

Dias	Data da Análise	Agrotóxicos									
		Trifluralina		Oxifluorfem		Clorpirifós		Fenitrotiona		Permetrina	
		[ ]	média	[ ]	média	[ ]	média	[ ]	média	[ ]	média
0	30/04/2009	0,043	0,044	0,066	0,067	0,031	0,031	0,047	0,048	0,101	0,102
		0,045		0,067		0,031		0,048		0,102	
20	20/05/2009	0,038	0,041	0,067	0,067	0,037	0,038	0,052	0,056	0,105	0,109
		0,044		0,068		0,038		0,059		0,113	
27	27/05/2009	0,038	0,034	0,056	0,056	0,032	0,031	0,044	0,044	0,135	0,130
		0,031		0,056		0,030		0,044		0,126	
34	03/06/2009	0,029	0,032	0,056	0,058	0,031	0,032	0,045	0,045	0,135	0,128
		0,035		0,059		0,033		0,045		0,121	
40	09/06/2009	0,033	0,033	0,058	0,058	0,032	0,031	0,045	0,046	0,137	0,134
		0,033		0,059		0,031		0,046		0,131	
48	17/06/2009	0,037	0,036	0,055	0,055	0,029	0,029	0,043	0,043	0,130	0,127
		0,035		0,055		0,031		0,044		0,125	
62	01/07/2009	0,045	0,045	0,069	0,069	0,034	0,035	0,049	0,049	0,115	0,113
		0,044		0,068		0,035		0,049		0,110	
68	07/07/2009	0,050	0,053	0,069	0,071	0,034	0,036	0,045	0,046	0,118	0,104
		0,055		0,073		0,037		0,046		0,129	
144	21/09/2009	0,037	0,043	0,070	0,070	0,036	0,038	0,049	0,051	0,122	0,119
		0,048		0,070		0,039		0,052		0,116	
270	25/01/2010	0,037	0,038	0,063	0,063	0,032	0,032	0,045	0,045	0,103	0,106
		0,038		0,062		0,032		0,045		0,108	
384	20/05/2010	0,038	0,039	0,055	0,055	0,023	0,023	0,039	0,040	0,121	0,123
		0,039		0,055		0,023		0,040		0,125	

### 3.5 Caracterização do MR

A forma de caracterização escolhida para este material foi através dos resultados de um ensaio de proficiência.

Este Ensaio de Proficiência - 5ª Rodada do Ensaio de Proficiência para a Determinação de Agrotóxicos em Alimentos [6] - foi 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).

Foram enviados dois itens de ensaio contendo, cada um, cerca de 40 g da polpa de tomate congelada, sendo que um deles continha a polpa fortificada com os agrotóxicos e o outro constituía-se na polpa isenta de agrotóxicos (branco de matriz). Estes foram enviados por via aérea em uma caixa de isopor devidamente lacrada, com gelo seco.

Participaram da etapa de caracterização 10 Laboratórios Acreditados, além do Laboratório de Resíduos de Agrotóxicos do INCQS. Somente os resultados satisfatórios foram considerados na determinação do valor de caracterização e do desvio padrão robusto. As análises foram realizadas entre os dias 12 de maio de 2009 e 12 de junho do mesmo ano.

### 3.6 Incerteza do MRC

A Norma ISO 13528:2005 [7] é um documento complementar à ISO/IEC GUIA 17043 [8] 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 desvio padrão, além da incerteza de caracterização. O valor e a incerteza de caracterização deste MR foram calculados através da análise robusta.

Assim, a incerteza de caracterização,  $u_{(c)}$ , pode ser representada pela variação dos resultados reportados pelos laboratórios,  $u_{(l)}$ , e foi calculada através do desvio padrão robusto,  $s^*$ , conforme Equação 1.

$$u_c = u_l = \frac{1,25}{\sqrt{p}} \times s^* \quad (1)$$

Onde:  $p$  é o número de laboratórios que forneceram resultados para o cálculo do  $s^*$ .

O modelo básico para a avaliação da incerteza para o MR deve incluir todos os fatores que contribuem significativamente para a incerteza associada ao seu valor de propriedade. Essas fontes de incerteza incluem a incerteza do valor certificado obtido para o lote produzido (caracterização), as variações inerentes à falta de homogeneidade entre as unidades, e as tendências provocadas pela instabilidade do material ao longo do tempo quando transportado e armazenado pelo usuário.

Assim, podemos definir a incerteza combinada do MR como (Equação 2):

$$u_c = \sqrt{u_{(h)}^2 + u_{(e)}^2 + u_{(c)}^2} \quad (2)$$

Onde  $u_c$  é a incerteza combinada do MR.

A incerteza expandida, que será associada ao valor de propriedade do MR, foi calculada multiplicando-se a

incerteza combinada,  $u_c$ , pelo fator de abrangência  $k$ . Assumindo a função de distribuição dos resultados como sendo uma distribuição normal, um fator de abrangência  $k=2$  pode ser definido para um nível de confiança de 95 %.

## 4. RESULTADOS

A Tabela 4 apresenta os resultados dos valores de referência e as incertezas da caracterização dos agrotóxicos deste estudo.

Tabela 4 – Valores de referência (mg/kg) e incerteza de caracterização,  $u_{(c)}$ .

Agrotóxico	Valor de Referência	$s^*$ (mg/kg)	$u_{(c)}$ (mg/kg)	Contribuição (%)
Clorpirifós	0,0342	0,0073	0,0028	8,1
Fenitrotiona	0,0452	0,0034	0,0015	3,4
Oxifluorfem	0,0557	0,0099	0,0047	8,4
Permetrina	0,118	0,037	0,017	14,8
Trifluralina	0,0430	0,012	0,0054	12,5

Na Tabela 5 são apresentados os valores de propriedades que contribuíram para a certificação do material INCQS-MRC02 e as suas incertezas associadas.

Tabela 5 – Valores de referência,  $V_{ref}$ , e incerteza expandida e incertezas associadas. Valores em mg/kg.

Agrotóxicos	$V_{ref}$	$u_{(h)}$	$u_{(e)}$	$u_{(c)}$	$U^1$	%
Clorpirifós	0,034	0,00059	0,0058	0,0028	0,013	38
Fenitrotiona	0,045	0,00088	0,0062	0,0015	0,013	29
Oxifluorfem	0,056	0,00063	0,011	0,0047	0,023	42
Permetrina	0,118	0,0027	0,018	0,017	0,051	43
Trifluralina	0,043	0,0016	0,011	0,0054	0,024	55

1 – O fator de abrangência para todos os agrotóxicos foi  $k = 2$ .

Foi estabelecido para esse Material de Referência um prazo de validade inicial de 7 meses (a partir do dia 20 de maio de 2010), quando armazenado entre -10 a -25 °C. Contudo, o monitoramento da estabilidade do seu valor de propriedade continuará em andamento e, caso o material não seja instável após este prazo, o mesmo poderá ser prorrogado conforme os resultados dos estudos em andamento.

## 5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, foi demonstrado que o material de referência (MR) de polpa de tomate, lote INCQS-MRC02, produzido no âmbito do projeto “Rede de Detecção de Resíduos e Contaminantes em Alimentos - Capacitação de Laboratórios de Ensaio – RARCAL”, pode ser considerado homogêneo e estável para o seu uso como Material de Referência Certificado (MRC).

A caracterização desse Material de Referência foi realizada a partir dos resultados reportados por 10 laboratórios e pelo INCQS em uma comparação interlaboratorial. A fonte de incerteza identificada nesse estudo que contribuiu de forma mais significativa na incerteza final associada ao valor de propriedade, foi a relacionada a instabilidade do material na condição de armazenamento.

## REFERÊNCIAS

- [1] H. Emons, A. Fajgelj, A. M.H. van der Veen, R. Watters . Accred. Qual. Assurance, New Definitions on Reference Materials, 2006.
- [2] Associação Brasileira de Normas Técnicas – NBR/ISO GUIA NBR/ISO/IEC 17025. *Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração*. Rio de Janeiro, 2005.
- [3] Associação Brasileira de Normas Técnicas – NBR/ISO GUIA 30, *Termos e Definições Relacionados com Materiais de Referência*, Rio de Janeiro, 2000; NBR/ISO GUIA 31, *Materiais de Referência - Conteúdo de Certificados e Rótulos*, Rio de Janeiro, 2004; NBR/ISO GUIA 32, *Calibração em Química Analítica e Uso de Materiais de Referência Certificados*, Rio de Janeiro, 2000; NBR/ISO GUIA 33, *Utilização de materiais de referência certificados*, Rio de Janeiro, 2002; NBR/ISO GUIA 34, *Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência*. Rio de Janeiro, 2004.
- [4] International Organization for Standardization - ISO Guide 35, *Reference materials – General and statistical principles for certification*, 3<sup>rd</sup> Edition, 2006.
- [5] M.H.W.M. Cardoso, A.V. Gouvêa, A. W. Nóbrega, S.M.P. Abrantes, *Validação de Método para Determinação de Resíduos de Agrotóxicos em Tomate: uma Experiência Laboratorial*, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 30(1), 63-72, 2010.
- [6] Relatório do Ensaio de Proficiência para Determinação do Teor de Agrotóxicos em hortifrutigranjeiros - 5<sup>a</sup> Rodada - Matriz: Tomate, disponível em [www.incqs.fiocruz.br/ep](http://www.incqs.fiocruz.br/ep).
- [7] International Organization for Standardization – ISO 13528 - Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons. 2005.
- [8] International Organization for Standardization – ISO/IEC 17043 - Conformity assessment – General requirement for proficiency testing. Geneva, 2010.