



Relatório do Programa de Ensaio de Proficiência
Desoxinivalenol – Farinha de Trigo
Rodada – Maio- 2015

ORGANIZAÇÃO E COORDENAÇÃO

Instituto Adolfo Lutz

Centro de Contaminantes

Núcleo de Contaminantes Orgânicos

Centro de Materiais de Referência

COORDENADORES DO PROGRAMA

Coordenador Técnico: Adriana Palma de Almeida

Coordenador Técnico Substituto: Leda Conceição Antonia Lamardo

Endereço: Avenida Doutor Arnaldo, 355 – Cerqueira César – Prédio da Química – 4º andar

São Paulo – SP – CEP: 01246-902

Tel: (11) 3068-2921 – (coordenadores)

E-mail: provedordon@ial.sp.gov.br

EQUIPE TÉCNICA

Janete Alaburda – Diretor Técnico - Pesquisador Científico – IAL

Luzia Shundo – Pesquisador Científico – IAL

Simone Alves da Silva – Pesquisador Científico – IAL

Valter Ruvieri – Pesquisador Científico – IAL

Elenice Lopes de Oliveira – Auxiliar Técnica – IAL

Sueli Aparecida da Silva Cruz – Oficial de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica - IAL

APOIO



SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	3
2. OBJETIVOS	3
3. ESCOPO	4
4. SERVIÇOS SUBCONTRATADOS	4
5. PARTICIPAÇÃO	4
6. CONFIDENCIALIDADE	4
7. ITENS DE ENSAIO	5
8. TESTES DE HOMOGENEIDADE E ESTABILIDADE	6
9. ANÁLISE DOS RESULTADOS E AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS LABORATÓRIOS	7
10. AVALIAÇÃO GERAL	10
11. ATENDIMENTO AO PARTICIPANTE, RECLAMAÇÕES E CONTESTAÇÕES	10
12. USO DOS RESULTADOS PELAS PARTES INTERESSADAS	11
13. INFORMAÇÕES ADICIONAIS	11
14. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11
ANEXO A - Relação dos laboratórios participantes	12
ANEXO B - Informações dos laboratórios sobre métodos analíticos utilizados	13

1. INTRODUÇÃO

O trigo é um dos principais cereais cultivados no mundo, sendo que 65% da sua produção é consumida na forma de farinha branca, 20% é utilizada na alimentação animal e 15% é perdida durante manuseio e processamento pós-colheita. A produção brasileira é cerca de 3 milhões de toneladas anuais, porém não supre completamente o consumo, fazendo com que o Brasil importe trigo principalmente da Argentina, Canadá e EUA.

Embora o trigo e seus produtos representem uma importante fonte de alimento, esta cultura pode ser afetada por diversos microrganismos, especialmente os fungos toxigênicos, capazes de produzir toxinas. Dentre as micotoxinas presentes no trigo, o desoxinivalenol, DON, é a mais comumente encontrada, tendo sido responsável por vários surtos de doenças agudas em humanos, na Ásia, com sintomas como vertigens, distúrbios gastrintestinais, dentre outros.

No Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, por meio da Resolução - RDC nº 7, de 09 de março de 2011 e RDC nº 59, de 23 de dezembro de 2013, estabeleceu uma redução dos limites máximos tolerados (LMT) de DON para 2017. De acordo com o Art. 4º da RDC nº 7, os níveis de micotoxinas deverão ser tão baixos quanto razoavelmente possível, devendo ser aplicadas as melhores práticas e tecnologias na produção, manipulação, armazenamento, processamento e embalagem, de forma a evitar que um alimento contaminado seja comercializado ou consumido. Os LMT referem-se aos resultados obtidos por metodologias que atendam aos critérios de desempenho estabelecidos pelo Codex Alimentarius.

Desta forma, há a necessidade da utilização de métodos seguros e confiáveis que garantam a qualidade analítica dos resultados. O uso regular de materiais de referência certificados e a participação em programas interlaboratoriais podem assegurar a qualidade dos resultados dos programas de monitoramento dos alimentos realizados pelos Laboratórios de Saúde Pública, bem como pelos laboratórios privados e universidades.

Atualmente, existem poucos provedores de ensaio de proficiência nacionais para a área de alimentos; isso dificulta a participação dos laboratórios atuantes nesta área em programas dessa natureza, e prejudica a avaliação de seu desempenho analítico.

O desenvolvimento e a operação de programas de ensaio de proficiência brasileiros diminuem a dependência a provedores internacionais, fornecendo aos laboratórios participantes evidências da confiabilidade de seus resultados e proporcionando oportunidades de melhorias.

2. OBJETIVOS

O Programa de Ensaio de Proficiência para a determinação de desoxinivalenol em farinha de trigo (PEP DON) teve como objetivos:

- ✓ Disponibilizar aos laboratórios participantes uma ferramenta para verificar sua competência na medição de desoxinivalenol em farinha de trigo, utilizando as técnicas analíticas empregadas rotineiramente em seus laboratórios;
- ✓ Contribuir para a melhoria contínua dos procedimentos de medição de cada laboratório;
- ✓ Fornecer uma alternativa de participação de PEP em âmbito nacional e auxiliar no processo de avaliação para a acreditação de laboratórios junto à Coordenação Geral de Acreditação (CGCRE/INMETRO).

3. ESCOPO

O escopo deste Programa de Ensaio de Proficiência é a determinação de desoxinivalenol em farinha de trigo, na faixa de concentração situada entre 200 µg/kg e 1000 µg/kg.

4. SERVIÇOS SUBCONTRATADOS

O PEP DON não utilizou serviços subcontratados.

5. PARTICIPAÇÃO

O PEP DON foi aberto à participação de laboratórios públicos, universidades públicas e privadas e laboratórios privados atuantes na área de toxicologia, que realizam o ensaio de determinação de desoxinivalenol em farinha de trigo. Os participantes utilizaram o método analítico de sua escolha, preferencialmente, o de sua rotina.

6. CONFIDENCIALIDADE

O Provedor tratou com confidencialidade toda a informação, documentada ou não, recebida ou obtida durante a execução do PEP DON.

Cada laboratório foi identificado por um código alfa-numérico individual, segundo a ordem de retorno dos formulários de inscrição ao provedor. O código de cada participante foi informado apenas ao responsável pela participação do laboratório no PEP.

O provedor do PEP DON tem o compromisso de manter a confidencialidade de informações específicas dos laboratórios, incluindo identificação, resultados e desempenhos. Em circunstâncias excepcionais, por solicitação de autoridades regulamentadoras ou de acreditação, o provedor poderá fornecer os resultados diretamente a estas autoridades. Nestes casos, esta ação será notificada por escrito aos laboratórios envolvidos. O laboratório enviará um acordo também por escrito.

7. ITENS DE ENSAIO

Os itens de ensaio foram preparados a partir de um lote de farinha de trigo branca adquirido no comércio da cidade de São Paulo. Analisou-se o lote de farinha, pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com purificação em coluna de imunoafinidade (CIA), detecção por ultravioleta e quantificação por padronização externa.

Cada item de ensaio continha cerca de 50 g de farinha de trigo acondicionados em embalagem aluminizada, selada, devidamente identificada com rótulo, contendo as seguintes informações: identificação do programa, mensurando, código da amostra e rodada/ano em questão. Para cada laboratório inscrito na 1ª Rodada do Ensaio de Proficiência para determinação de desoxinivalenol em farinha de trigo, foi enviado 1 (um) item de ensaio (**Figura 1**).

As amostras de farinha de trigo foram enviadas a 14 laboratórios participantes do Programa de Ensaio de Proficiência, de diferentes estados. Dentre esses, 13 laboratórios enviaram seus resultados dentro do prazo estabelecido.

Cada laboratório participante recebeu uma diferente codificação para cada amostra, a fim de evitar qualquer forma de identificação das amostras entre os participantes. A equipe executora manteve sigilo e controle sobre a numeração das amostras, durante o andamento desta fase do programa. A Tabela 1 apresenta o código do laboratório, bem como a respectiva identificação do item de ensaio recebido.



figura 1: Item de ensaio do PEP DON - detalhes da embalagem e do rótulo

Tabela 1. Código do laboratório e identificação das amostras do PEP DON.

Nº	CÓDIGO DO LABORATÓRIO	CÓDIGO DO ITEM DE ENSAIO
1	DON – 01/21	ITEM Nº 059
2	DON – 01/25	ITEM Nº 225
3	DON – 01/33	ITEM Nº 063
4	DON – 01/46	ITEM Nº 068
5	DON – 01/48	ITEM Nº 170
6	DON – 01/49	ITEM Nº 235
7	DON – 01/58	ITEM Nº 074
8	DON – 01/66	ITEM Nº 242
9	DON – 01/72	ITEM Nº 161
10	DON – 01/75	ITEM Nº 090
11	DON – 01/87	ITEM Nº 221
12	DON – 01/89	ITEM Nº 109
13	DON – 01/93	ITEM Nº 141
14	DON – 01/97	ITEM Nº 008

8. TESTES DE HOMOGENEIDADE E ESTABILIDADE

Antes do envio dos itens de ensaio aos laboratórios participantes, a coordenação do PEP DON realizou testes para verificação da homogeneidade das amostras, seguindo as orientações da norma ISO 13528:2005.

Além disso, a coordenação do PEP DON efetuou testes de estabilidade, visando garantir a estabilidade das amostras até a conclusão da rodada.

Para estes testes, o teor de DON em cada amostra foi determinado pelo método CLAE com detecção por ultravioleta.

8.1. Homogeneidade

O teste de homogeneidade entre amostras foi realizado de acordo com o descrito na ISO 13528, utilizando o desvio padrão de Horwitz/Thompson como desvio padrão para avaliação da proficiência.

Dez amostras foram selecionadas e analisadas em duplicata. Dessa forma, o material mostrou-se homogêneo.

8.2. Estabilidade

8.2.1 Estabilidade de curta duração

Para avaliar a estabilidade de desoxinivalenol em farinha de trigo durante o transporte, um estudo de estabilidade clássico de curta duração foi conduzido. Para isso, doze amostras foram selecionadas aleatoriamente e armazenadas à temperatura ambiente e à 42 °C por 3, 6 e 9 dias. Após os respectivos períodos de armazenamento, as amostras foram analisadas em triplicata pelo método CLAE com detecção por ultravioleta. O teste de estabilidade de curta duração foi realizado de acordo com o descrito no ISO Guia 35, por meio da análise de regressão linear simples.

Os pressupostos da análise de regressão linear simples (normalidade e homocedasticidade) foram avaliados e os itens de ensaio foram considerados suficientemente estáveis (valor $p > 0,05$).

8.2.2 Estabilidade durante a rodada

Para avaliar a estabilidade de desoxinivalenol em farinha de trigo durante a rodada, três amostras mantidas à temperatura de -20°C foram selecionadas e analisadas em triplicata após 30 dias. O teste de estabilidade foi realizado de acordo com o descrito no ISO 13528, utilizando o desvio padrão de Horwitz/Thompson como desvio padrão para avaliação da proficiência. Dessa forma, o material mostrou-se estável no período analisado.

Em ambos os testes, homogeneidade e estabilidade, todas as medições foram realizadas aleatoriamente e em condições de repetibilidade. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de *Shapiro Wilk*, e, por meio dos testes de *Grubbs*, não foi detectada a presença de valores discrepantes. Ambos os testes foram realizados com 95% de confiança.

9. ANÁLISE DOS RESULTADOS E AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS PARTICIPANTES

9.1. Resultados das Medições dos Laboratórios

Além dos resultados analíticos, expressos em $\mu\text{g/kg}$, os laboratórios participantes foram orientados a informar, também, o limite de quantificação e a incerteza, inerentes ao método empregado, através do “Formulário de Registro de Resultados”, e outras informações sobre as técnicas e os equipamentos utilizados nos ensaios.

9.3. Análise Estatística

O método estatístico empregado para a avaliação dos resultados do PEP DON classifica o desempenho de cada laboratório segundo o índice z, conforme descrito a seguir.

$$z = \frac{x_i - X}{\hat{\sigma}}$$

Onde,

x_i = média dos valores relatados pelo participante i;

X = valor designado;

$\hat{\sigma}$ = desvio padrão para avaliação de proficiência

A coordenação do PEP DON adotou como valor designado, o valor obtido pela média robusta dos resultados válidos dos laboratórios participantes e como desvio padrão para avaliação de proficiência, o desvio padrão robusto, ambos calculados de acordo com o algoritmo A da Norma ISO 13528.

Os desempenhos dos laboratórios foram classificados de acordo com o índice z, conforme descrito a seguir:

$|z| \leq 2$ desempenho satisfatório

$2 < |z| < 3$ desempenho questionável

$|z| \geq 3$ desempenho insatisfatório

9.4. Resultados dos Laboratórios Participantes

A Tabela 2 mostra o resumo estatístico dos resultados válidos apresentados pelos participantes na determinação de desoxinivalenol em farinha de trigo.

Tabela 2. Estatística descritiva da determinação de desoxinivalenol ($\mu\text{g}/\text{kg}$) em farinha de trigo.

Média robusta (X)	696,18 $\mu\text{g}/\text{kg}$
Incerteza padrão da média robusta (u_x)	42,91 $\mu\text{g}/\text{kg}$
Desvio padrão robusto (σ)	123,78 $\mu\text{g}/\text{kg}$
Incerteza/desvio	0,35
CV(%)	18%
Mínimo	566,67 $\mu\text{g}/\text{kg}$
Máximo	893,33 $\mu\text{g}/\text{kg}$
Amplitude	326,67 $\mu\text{g}/\text{kg}$
Nº de laboratórios	13

A Tabela 3 apresenta os resultados médios, desvio padrão, CV% e os índices obtidos pelos participantes.

Tabela 3. Resultados de três medições para determinação de desoxinivalenol em farinha de trigo.

Código dos laboratórios	Técnica analítica	Replicatas ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			Média ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Desvio Padrão	CV (%)	Índice z
		1	2	3				
DON – 01/21	CIA/CLAE	710,0	876,6	775,3	787,30	83,95	11%	0,74
DON – 01/25	CIA/CLAE	609,4	600,0	628,7	612,70	14,63	2%	-0,67
DON – 01/46	ELISA	700	600	-	650,00	70,71	11%	-0,37
DON – 01/48	ELISA	699,2	682,4	685,2	688,93	9,00	1%	-0,06
DON – 01/49	ELISA	920	690	840	816,67	116,76	14%	0,97
DON – 01/58	ELISA	870	970	840	893,33	68,07	8%	1,59
DON – 01/66	CIA/CLAE	570,9	572,9	571,6	571,80	1,01	0%	-1,00
DON – 01/72	ELISA	750	620	770	713,33	81,45	11%	0,14
DON – 01/75	ELISA	560,00	600,00	540,00	566,67	30,55	5%	-1,05
DON – 01/87	CIA/CLAE	634,9	708,5	669,9	671,10	36,81	5%	-0,20
DON – 01/89	CIA/CLAE	608	613	617	612,67	4,51	1%	-0,67
DON – 01/93	LC-MS/MS	564,7	665,8	601,3	610,60	51,19	8%	-0,69
DON – 01/97	ELISA	870	860	870	866,67	5,77	1%	1,38

O gráfico do desempenho dos laboratórios participantes é apresentado na figura 2.

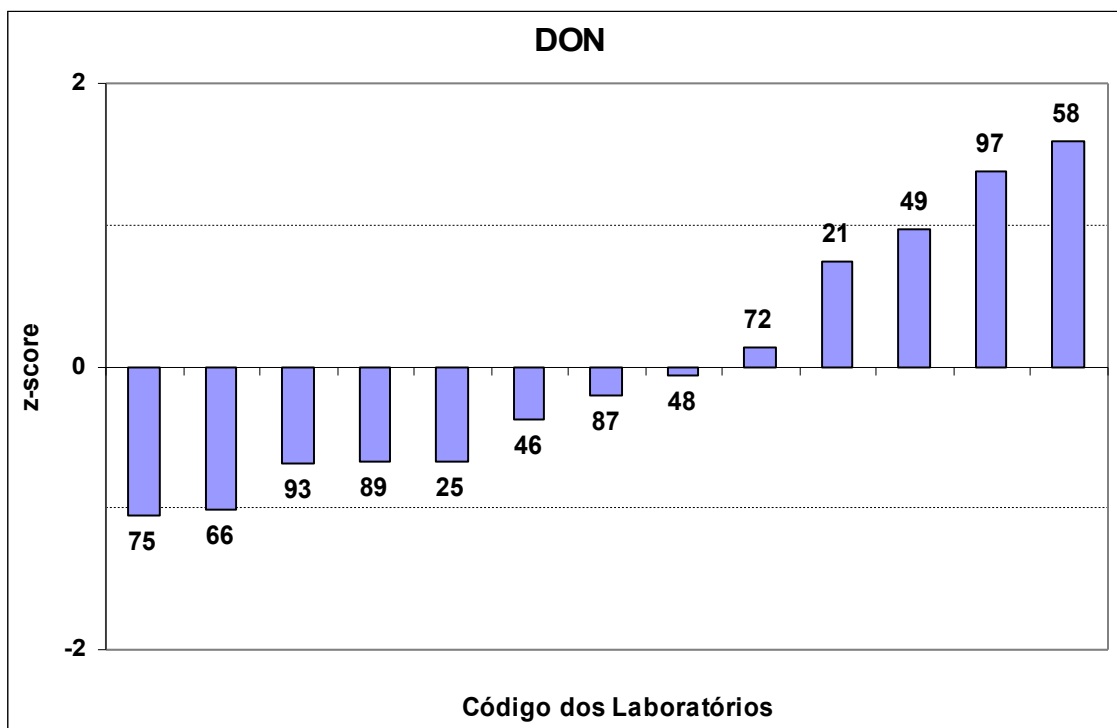


Figura 2. Desempenho (z-score) dos laboratórios participantes do PEP DON.

10. AVALIAÇÃO GERAL

A análise dos dados evidenciou que todos os participantes obtiveram resultados satisfatórios na determinação de desoxinivalenol em farinha de trigo. Independentemente do desempenho satisfatório, convém que todos os laboratórios realizem uma análise crítica de sua participação.

Vale ressaltar que a participação com desempenho satisfatório em uma única rodada de um PEP não garante a qualidade contínua dos resultados analíticos de um laboratório; convém que este realize periodicamente uma análise crítica de todo o processo envolvido nas análises.

11. ATENDIMENTO AO PARTICIPANTE, RECLAMAÇÕES E CONTESTAÇÕES

A coordenação do PEP DON encontra-se aberta aos participantes e outros interessados para esclarecimentos que se fizerem necessários. Também, compromete-se a corrigir prontamente qualquer equívoco que possa ter cometido. Na ocorrência de dúvidas quanto a qualquer aspecto do Programa, o participante poderá entrar em contato com a coordenação por meio de correio eletrônico. As sugestões que forem enviadas serão registradas, analisadas e respondidas. As apelações sobre a avaliação de desempenho ou reclamações recebidas dos laboratórios participantes, clientes e outras partes, serão avaliadas e, quando pertinentes, incluídas no relatório ou comunicadas aos interessados.

Informações adicionais a respeito do ensaio de proficiência podem ser obtidas através do e-mail: provedordon@ial.sp.gov.br ou telefone +55 11 3068-2921.

12. USO DOS RESULTADOS PELAS PARTES INTERESSADAS

A coordenação se reserva no direito de apresentar os resultados deste PEP em publicações ou em eventos científicos respeitando-se a confidencialidade dos laboratórios.

13. INFORMAÇÕES ADICIONAIS

A coordenação do PEP DON empenhou-se ao máximo no sentido de desestimular a colusão ou falsificação de resultados. A política para evitar tal situação é a adoção de práticas, como a identificação dos itens de ensaio de forma aleatória e unívoca em relação à rodada e não divulgação prévia dos resultados.

14. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT NBR ISO/IEC 17043. "Avaliação de Conformidade — Requisitos Gerais para Ensaio de Proficiência". Rio de Janeiro: ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2011.

ISO 13528. "*Statistical Methods for use in Proficiency Testing by Interlaboratory Comparisons.*" Geneve: ISO - International Organization for Standardization, 2005.

ANEXOS

Anexo A - Relação dos laboratórios participantes

BRF S.A. – Laboratório de Resíduos (Videira-SC)

COOPERATIVA AGROINDUSTRIAL ALFA – Controle de Qualidade da Indústria de Trigo (Chapecó-SC)

DOMINGOS COSTA INDÚSTRIAS ALIMENTÍCIAS S.A. – Laboratório Central – Setor de Microbiologia (Contagem-MG)

DOMINGOS COSTA INDÚSTRIAS ALIMENTÍCIAS S.A. – Laboratório de Trigo (Cambé-PR)

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ (ESALQ/USP) – Laboratório de Micotoxinas e Micologia (Piracicaba-SP)

EUROFINS DO BRASIL ANÁLISE DE ALIMENTOS LTDA – Laboratório de Química (Indaiatuba-SP)

FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS (FUNED) - Divisão de Vigilância Sanitária - Laboratório de Micotoxinas (Belo Horizonte/MG)

IN VIVO NUTRIÇÃO E SAÚDE ANIMAL LTDA – Laboratório In Vivo Labs (Descalvado-SP)

LABORATÓRIO NACIONAL AGROPECUÁRIO (LANAGRO/RS) – Laboratório RPM: Resíduos, Pesticidas e Medicamentos (Porta Alegre-RS)

PRÓ-AMBIENTE ANÁLISES QUÍMICAS E TOXICOLÓGICAS – Laboratório de Microbiologia (Porto Alegre-RS)

ROYAL CANIN DO BRASIL – Laboratório de Análises Físico-Químicas (Descalvado-SP)

SL ALIMENTOS – Laboratório de Físico-Química (Mauá da Serra-PR)

TÜV SÜD SFDK LABORATÓRIO DE ANÁLISE DE PRODUTOS LTDA – Laboratório de Análise de Produtos (São Paulo-SP)

Anexo B - Informações sobre os métodos analíticos utilizados pelos laboratórios

Nº	Código do Laboratório	Método/Técnica	LQ (µg/kg)	Método Modificado	Método Validado	Ensaio Acreditado
1	DON – 01/21	CIA/CLAE	80	Não	Sim	Não
2	DON – 01/25	CIA/CLAE	60	Sim	Sim	Não
3	DON – 01/46	ELISA	60	Não	Sim	Sim
4	DON – 01/48	ELISA	70	Não	Sim	Não
5	DON – 01/49	ELISA	250	Não	Sim	Sim
6	DON – 01/58	ELISA	250	Não	Sim	Sim
7	DON – 01/66	CIA/CLAE	100	Sim	Sim	Não
8	DON – 01/72	ELISA	250	Não	Sim	Sim
9	DON – 01/75	ELISA	250	Não	Não	Não
10	DON – 01/87	CIA/CLAE	100	Sim	Sim	Sim
11	DON – 01/89	CIA/CLAE	100	Não	Não	Não
12	DON – 01/93	LC-MS/MS	100	Sim	Não	Não
13	DON – 01/97	ELISA	250	Não	Sim	Sim