

## **Estudo de homogeneidade em candidato a material de referência certificado na matriz peixe**

### **Homogeneity study of candidate the certified reference material in fish matrix**

**João Cristiano Ulrich, Jorge Eduardo de S Sarkis, Marcos Antonio Hortellani**

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/CNEN-SP  
Travessa R, 400 – Cidade Universitária – São Paulo

E-mail: jculrich@ipen.br

**Resumo:** Um material é perfeitamente homogêneo em relação a uma dada característica ou composição se não houver nenhuma diferença entre os valores obtidos de uma parte para outra do material. Os resultados, normalmente, são avaliados utilizando-se análise de variância (ANOVA), porém as premissas que as populações dos dados a serem tratados devem ter distribuição normal e variâncias iguais, limitam muito a utilização dessa ferramenta estatística. Assim, um teste mais adequado para avaliar a homogeneidade de MRs foi proposto por Fearn & Thompson, chamado de “homogeneidade suficiente”. Neste trabalho a avaliação pelos dois tratamentos estatísticos foi realizada e os resultados discutidos.

**Palavras-chave:** estudo homogeneidade, material de referência certificado, análise de variância, peixe

**Abstract:** A material is perfectly homogeneous with respect to a given characteristic or composition if there is no difference between the values obtained from one part to another. The results are usually evaluated using analysis of variance (ANOVA), but the assumptions that populations of data to be processed must have a normal distribution and equal variances, greatly limit the use of this statistical tool. Thus, a most suitable test for assessing the homogeneity of RMs was proposed by Fearn and Thompson, called "sufficient homogeneity". In this work, the evaluation by the two statistical treatments were performed and the results discussed.

**Keywords:** homogeneity study, certified reference material, analysis of variance, fish

#### **1. INTRODUÇÃO**

O estudo de homogeneidade é parte integrante do planejamento na produção de um material de referência certificado (MRC), fazendo parte da etapa designada de certificação do MRC.

Na preparação dos materiais de referência, espera-se que os mesmos tenham alto grau de homogeneidade. Porém, apesar de todo esforço realizado, os materiais podem apresentar alguma heterogeneidade. Dessa forma, o produtor do

material tem que assegurar e provar a homogeneidade utilizando, para esse objetivo, procedimentos adequados em detectar quaisquer impurezas, interferências ou irregularidades, que podem ser devidas a problemas não detectados durante a preparação.

De acordo com ISO guia 35 [1], um material é perfeitamente homogêneo em relação a uma dada característica ou composição se não houver

nenhuma diferença entre os valores obtidos de uma parte para outra do material.

A quantidade de material necessária aos estudos de homogeneidade e a escolha dos métodos de medição apropriados, para determinação das características ou composição química, deverão estar integrados desde o início do planejamento.

Um modelo básico para a avaliação de um estudo de homogeneidade compreendendo frascos (ou partes) do material e os valores das medições, pode ser expresso pela relação entre a média geral do valor das medições e termos de erro para a homogeneidade entre frascos e do erro aleatório de medição. As variâncias destes termos são a variância entre frascos e a variância de repetibilidade, respectivamente. Dessa forma, a avaliação, normalmente, é realizada utilizando-se análise de variância (ANOVA). Porém, este tipo de avaliação pode conduzir a conclusões errôneas em duas situações. Se o método analítico usado for pouco preciso, possíveis heterogeneidades não são detectadas e o teste indicará que o material é homogêneo ou ainda, a variabilidade nos resultados pode ser significativa. Por outro lado, se o método analítico é bastante preciso, o teste indicará que o material é heterogêneo, pois qualquer pequena diferença entre a composição dos frascos produzirá um resultado de heterogeneidade. Baseado nos conceitos estatísticos, também existe a observação que as populações dos dados a serem tratados por ANOVA devem ter distribuição normal e variâncias iguais, o que limita muito a utilização dessa ferramenta estatística.

Com base nisso, um teste mais adequado para avaliar a homogeneidade de MRs foi proposto por Fearn & Thompson [2], chamado de “homogeneidade suficiente”. Nesse teste, diferentemente do realizado por ANOVA, é imposto um limite ao desvio padrão analítico, chamado de  $\sigma_{an}$  em relação ao “desvio padrão alvo (ou esperado)”, chamado de  $\sigma_p$ . Esse limite estabelece que a razão de  $\sigma_{an}$  por  $\sigma_p$  deve ser menor que 0,5, se possível. Outro ponto diferente, nesse método, é o cálculo do valor crítico para comparação, sendo calculado a partir da obtenção dos valores da variância permissível entre-amostras ( $\sigma_{all}^2$ ), da variância analítica ( $s_{an}^2$ ) e fatores ( $F_1$  e  $F_2$ ) extraídos de uma tabela

específica para testar “homogeneidade suficiente” [2].

Devido a melhor performance do teste de homogeneidade suficiente, em relação ao tradicional, ele foi incorporado a um protocolo internacional [3] e já citado em literatura nacional [4].

O objetivo deste trabalho é comparar as avaliações por ANOVA e “homogeneidade suficiente” no estudo de homogeneidade para o analito metilmercúrio em candidato a material de referência certificado na matriz peixe.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1. Planejamento do estudo de homogeneidade

Conforme descrito no ISO guia 35, selecionou-se um subconjunto do lote produzido através de um planejamento de amostragem. Assim, 10 frascos foram selecionados aleatoriamente nos quais foram realizadas as determinações de metilmercúrio (MeHg). Para avaliação dos dados por ANOVA, foram retiradas de cada frasco, três porções de 0,5 g cada e cada alíquota foi medida em triplicata, obtendo-se, portanto três valores médios para cada frasco. Posteriormente, para avaliação pelo método de “homogeneidade suficiente”, mais duas porções de 0,5 g cada foram retiradas de cada frasco e cada alíquota foi medida em triplicata, obtendo-se, portanto seis (6) resultados para cada frasco.

### 2.2. Preparo das amostras e determinação do MeHg

O método é baseado na lixiviação ácida com solução de ácido clorídrico (HCl) 6 mol L<sup>-1</sup> (v/v) e separação do mercúrio orgânico e inorgânico em uma coluna de troca iônica. A solução de HCl extrai quantitativamente o MeHg dos tecidos biológicos e a coluna de troca iônica foi usada para separar o composto MeHgCl não iônico do complexo HgCl<sub>4</sub><sup>2-</sup>. A metodologia utilizada foi baseada nos trabalhos de Horvat e May [5,6].

Uma vez separado, o MeHg foi decomposto para Hg<sup>2+</sup>, por radiação ultravioleta (UV) e a solução final, após diluição é inserida no sistema de introdução de amostra do espectrofotômetro de absorção atômica (SpectrAA220-FS, Varian Austrália Pty Ltd.) e o metilmercúrio (como

mercúrio) é determinado por meio da técnica de espectrofotometria de absorção atômica com geração de vapor frio e injeção em fluxo (FIA-CV-AAS).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Determinação de metilmercúrio (MeHg) nas porções do candidato a MRC

As porções dos 10 frascos foram analisadas e valores discrepantes (outliers) foram testados, por meio do teste de Grubbs [7]. A análise não indicou a presença de qualquer valor discrepante.

##### 3.1.1. Análise de variância fator único

A tabela 1 mostra os resultados obtidos da análise de variância fator único, para os valores de MeHg.

**Tabela 1.** Resultados obtidos da análise de variância (ANOVA) dos resultados de MeHg.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	F crítico
Entre grupos	0,0950	9	0,0106	2,72	2,39
Dentro dos grupos	0,0774	20	0,0039		
Total	0,1724	29			

Como  $F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$  a homogeneidade não é comprovada, e portanto, o material não é aprovado no teste de homogeneidade. Verificando os dados obtidos no cálculo de variância para esses valores de medição (tabela 2), observa-se que uma das premissas da ANOVA não foi confirmada, pois as variâncias são diferentes. A comprovação desse fato pode ser realizada pela divisão do maior valor obtido pelo menor valor de variância e obtém-se que esse valor é igual a 34, sendo que o recomendado é que seja de 3 ou 4 [8]. O teste F, utilizado neste tratamento, é um teste de hipótese considerando variâncias e, como as variâncias são diferentes é mais uma prova que o teste não comprovaria ou validaria a hipótese de igualdade dos valores.

**Tabela 2.** Resultados obtidos dos valores médios, desvio padrão e variância dos resultados das replicatas analisadas para MeHg.

Frasco N <sup>o</sup> .	Média ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Desvio Padrão ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Variância	N. Medidas ( $n_j$ )
2	0,277	0,032	0,00104	3
9	0,205	0,033	0,00107	3
14	0,388	0,134	0,01789	3
26	0,241	0,017	0,00030	3
31	0,265	0,100	0,01001	3
36	0,317	0,074	0,00545	3
50	0,334	0,009	0,00008	3
55	0,216	0,022	0,00047	3
63	0,237	0,044	0,00195	3
78	0,223	0,021	0,00044	3

A diferença comprovada dos valores de variâncias na ANOVA pode ser proveniente do método analítico utilizado nas medições (FIA-CV-AAS), uma vez que, realizado em diferentes dias, apresentou variabilidade nos sinais de resposta tanto da curva de calibração como nos sinais das amostras analisadas.

##### 3.1.2. Método de “homogeneidade suficiente” proposto por Fearn & Thompson

Como recomendado nas instruções [2], porções em duplicata foram analisadas dos 10 frascos em condições de repetibilidade e o resultado da avaliação dos dados é mostrado na tabela 3.

Nos itens apresentados após a tabela, são mostradas as equações utilizadas para os cálculos e seus resultados. No item (a), a variância analítica ( $s_{an}^2$ ) é obtida dividindo-se o somatório dos quadrados das diferenças ( $D^2$ ) por  $2*m$ , sendo  $m$  o número de frascos. Em (b) obtém-se a precisão analítica na forma de desvio padrão. Em (c) é obtido o valor para a estimativa da variância entre-frascos ( $S_{sam}^2$ ). O valor da variância permissível entre-amostras ( $\sigma_{all}^2$ ), calculado em (d), é obtido após ter o valor do desvio padrão alvo ( $\sigma_p$ ) calculado pela função de Horwitz [3,9]. O valor crítico para o estudo de homogeneidade, chamado  $c$ , é calculado em (e), sendo obtido pela multiplicação de fatores específicos [2] pelos valores de ( $\sigma_{all}^2$ ) e ( $s_{an}^2$ ), sendo em seguida esses valores somados. A decisão desse teste segue o

seguinte critério: se “ $S_{sam}^2 > c$ ” o teste de homogeneidade falhou e esta não pode ser comprovada e se “ $S_{sam}^2 < c$ ” o teste de homogeneidade foi aceito e esta é comprovada.

Tabela 3. Teste de homogeneidade entre frascos, aplicado aos dados de MeHg.

Frasco N.	Resultado 1 (a)	Resultado 2 (b)	D = a - b	S = a + b	D <sup>2</sup> = (a - b) <sup>2</sup>
2	0,296	0,295	0,001	0,591	0,000001
9	0,195	0,241	-0,046	0,436	0,002116
14	0,291	0,333	-0,042	0,624	0,001764
26	0,245	0,255	-0,010	0,500	0,000100
31	0,379	0,226	0,153	0,605	0,023409
36	0,382	0,332	0,050	0,714	0,002500
50	0,328	0,329	-0,001	0,657	0,000001
55	0,217	0,237	-0,020	0,454	0,000400
63	0,208	0,215	-0,007	0,423	0,000049
78	0,243	0,224	0,019	0,467	0,000361

Somatória = 0,030701

Item(a)  $s_{an}^2 = \frac{D^2}{2m} = \frac{0,030701}{(2.10)} = 0,001535 \mu\text{g g}^{-1}$  (variância analítica)

Item(b)  $s_{an} = \sqrt{S_{an}^2} = \sqrt{0,001535} = 0,039179 \mu\text{g g}^{-1}$  (precisão analítica expressa como desvio padrão)

Item(c)  $S_{sam}^2 = (s_s^2/2 - S_{an}^2)/2 = (0,010686/2 - 0,001535)/2 = 0,001904$

Item(d)  $\sigma_{all}^2 = (0,3\sigma_p)^2 = (0,3.0,05326)^2 = 0,000255 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

$\sigma_p$  (obtido pela função de Horwitz) =  $0,02c^{0,8495} = 0,02(0,274.10^{-6})^{0,8495}/10^{-6} = 0,05326 \mu\text{g g}^{-1}$  (sendo “c” a concentração média obtida de MeHg expressa como fração de massa).

Item (e)  $c = F_1\sigma_{all}^2 + F_2S_{sam}^2 = 1,88.0,0002553 + 1,01.0,001535 = 0,002030$ .

Usando o critério, tendo  $S_{sam}^2 = 0,001904 < c = 0,002030$  a homogeneidade é comprovada.

#### 4. CONCLUSÕES

O teste de homogeneidade foi realizado, conforme planejado, usando duas ferramentas estatísticas para o candidato a material de referência certificado na matriz peixe.

O tratamento realizado por ANOVA mostrou que o material não estava homogêneo. Entretanto, o

tratamento realizado pelo método proposto por Fearn e Thompson, comprovou a homogeneidade suficiente do material. Portanto, consideramos o material homogêneo.

O teste de homogeneidade fornece um dos componentes de incerteza necessário para a composição da incerteza total do material de referência certificado conferindo qualidade e aceitabilidade do material de referência produzido.

#### REFERÊNCIAS

- [1] International Organization for Standardization (ISO); ISO Guide 35:2006, Reference Materials – General and Statistical Principles for Certification, Geneva, 2006.
- [2] Fearn T, Thompson M 2001 *Analyst*, **126** 1414-1417
- [3] Thompson M, Ellison S L R, Wood R 2006 The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories, *Pure Appl. Chem.* **78** 1 145–196
- [4] Cotta A J B 2007 Estudo da homogeneidade e atribuição de valores e incertezas certificados a um material de referência de basalto ((BRP-1) basalto de Ribeirão Preto) Dissertação (Mestrado) - Instituto de Geociências, Universidade Estadual de Campinas, Campinas
- [5] Horvat M, May K, Stoeppler M, Byrne A R 1988 *Applied Organometallic Chemistry* **2** 515-524
- [6] May K, Stoeppler M, Reisinger K 1988 Studies in the ratio total mercury methylmercury in the aquatic food chain. In: Merian E, Frei R W, Hardi W, Schlatter C H (Ed.) Carcinogenic and mutagenic metal compounds 2
- [7] Roper P, Burke S, Lawn R, Barwick V, Walker R 2001 *Applications of Reference Materials in Analytical Chemistry*. Cambridge, UK Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House
- [8] Vieira S. 2006 Análise de variância, editora Atlas São Paulo
- [9] Albert R, Horwitz W, 1997 *Anal. Chem.* **69** 789-790