

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**INCERTEZA DE MEDIÇÃO EM ANÁLISES MICOTOXICOLÓGICAS:  
ESTIMATIVA PELAS ABORDAGENS *BOTTOM UP*, MONTE CARLO E  
KRAGTEN**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Liziane Rachel da Silva Wovst**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2015**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Wovst, Liziane Rachel da Silva

Incerteza de medição em análises micotoxicológicas: estimativa pelas abordagens Bottom up, Monte Carlo e Kragten. / Liziane Rachel da Silva Wovst.-2015.

40 p.; 30cm

Orientador: Carlos Augusto Mallmann

Coorientador: Paulo Dilkin

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2015

1. Incerteza de medição 2. Micotoxinas 3. Abordagem Bottom up 4. Método de Monte Carlo 5. Planilha de Kragten I. Mallmann, Carlos Augusto II. Dilkin, Paulo III. Título.

**INCERTEZA DE MEDIÇÃO EM ANÁLISES MICOTOXICOLÓGICAS:  
ESTIMATIVA PELAS ABORDAGENS *BOTTOM UP*, MONTE CARLO E KRAGTEN**

**Liziane Rachel da Silva Wovst**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**.

**Orientador: Prof. Carlos Augusto Mallmann**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2015**

**Universidade Federal de Santa Maria**  
**Centro de Ciências Rurais**  
**Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
Aprova a Dissertação de Mestrado**

**INCERTEZA DE MEDIÇÃO EM ANÁLISES MICOTOXICOLÓGICAS:  
ESTIMATIVA PELAS ABOARDAGENS *BOTTOM UP*, MONTE CARLO E  
KRAGTEN**

elaborada por

**Liziane Rachel da Silva Wovst**

como requisito parcial para a obtenção do grau de

**Mestre em Medicina Veterinária**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

-----  
**Carlos Augusto Mallmann, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

-----  
**Alberto Souza Schmidt, Dr. (UFSM)**

-----  
**Maria José Moreira Batatinha, Dra. (UFBA)**

**Santa Maria, 06 de Março de 2015.**

## AGRADECIMENTOS

Dedico esta conquista a todos que amo e que em algum momento, com atitudes ou palavras, me incentivaram a lutar pelos meus sonhos e a concluir mais esta etapa da minha vida.

### **Em especial,**

A Deus que sempre esteve me guiando e protegendo. Sua maravilhosa graça me tornou maior que os meus problemas.

À minha família, pelo incentivo e amor em todos os dias da minha vida. E, particularmente, à minha mãe **Nilva Teresinha da Silva**, que me ensinou valores para viver com dignidade e respeito, sempre acreditando e orando por mim.

Ao **Dyhonatan Willian Russi**, pelo amor e carinho proporcionado todos os dias. Por estar sempre ao meu lado, seja comemorando as minhas conquistas ou me confortando nos momentos mais difíceis.

Ao professor **Paulo Dilkin**, que esteve sempre disposto a me ajudar. Pela confiança em mim depositada e pelos valorosos ensinamentos que me fizeram evoluir como pessoa.

Aos colegas e amigos do **Instituto SAMITEC** pelo companheirismo, amizade e colaboração.

Um agradecimento especial ao meu orientador, professor **Carlos Augusto Mallmann**, por quem tenho grande admiração, não somente por sua competência, mas também pelos valorosos ensinamentos passados.

Os meus sinceros agradecimentos.

“A qualidade e a utilidade da incerteza apresentada para o resultado de uma medição dependem, em última instância, da compreensão, da análise crítica e da integridade daqueles que contribuíram para atribuir-lhe um valor.”

*Guide to the Expression of Uncertainty in Measurements, International Organization for Standardization, Geneva, (1993)*

**Dissertação de Mestrado**  
**Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária**  
**Universidade Federal de Santa Maria**

**INCERTEZA DE MEDIÇÃO EM ANÁLISES MICOTOXICOLÓGICAS:  
ESTIMATIVA PELAS ABORDAGENS *BOTTOM UP*, MONTE CARLO E KRAGTEN**

**AUTORA:** Liziane Rachel da Silva Wovst

**ORIENTADOR:** Carlos Augusto Mallmann

Santa Maria, 11 de fevereiro de 2015

**RESUMO.** A literatura cita diferentes abordagens para estimar a incerteza de medição em ensaios quantitativos. No presente trabalho três abordagens foram utilizadas para estimar a incerteza da determinação de aflatoxinas (AB<sub>1</sub>, AB<sub>2</sub>, AG<sub>1</sub>, AG<sub>2</sub>) e desoxinivalenol em milho por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa tandem (LC-MS/MS): a abordagem *Bottom up*, adaptada do Guia para a Expressão da Incerteza de Medição (ISO GUM); o método de Monte Carlo (MMC), que propaga distribuições atribuídas às grandezas de entrada através de uma simulação numérica; e a abordagem de Kragten que calcula desvios padrão e intervalos de confiança com uma técnica planilha universalmente aplicável. Um modelo matemático foi desenvolvido para os ensaios de micotoxinas e um diagrama de causa-efeito foi proposto para auxiliar na identificação das fontes de incerteza associadas ao método. A análise detalhada das contribuições das várias fontes de incerteza foi realizada. A incerteza de medição foi determinada pela adição das variações dos passos individuais do procedimento de ensaio, de acordo com cada abordagem. Os métodos *Bottom up*, MMC e Kragten geraram estimativas similares para a incerteza combinada, com um coeficiente de variação (CV) menor que 1,0% entre elas. O principal componente de incerteza é a precisão intermediária, com contribuições acima de 90,0% para cada micotoxina. Como resultado da pesquisa, conclui-se que as três abordagens são adequadas para estimar a incerteza nos ensaios para quantificação de micotoxinas por LC-MS/MS. Dentre elas, a abordagem *Bottom up* é a mais apropriada, pois requer que o analista avalie o método detalhadamente para identificar os principais componentes de incerteza, possibilitando a implementação de melhorias no sistema de medição. Os métodos de Monte Carlo e Kragten são indicados como uma ferramenta de confirmação dos resultados obtidos pela abordagem *Bottom up*.

**Palavras-chave:** incerteza de medição, micotoxinas, Abordagem *Bottom up*, Método de monte Carlo, planilha de Kragten.

**Master's Dissertation**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**  
**Universidade Federal de Santa Maria**

**MEASUREMENT UNCERTAINTY IN MYCOTOXINS ANALYSIS: EVALUATION  
BY *BOTTOM UP*, MONTE CARLO AND KRAGTEN APPROACHES**

**AUTHOR:** Liziane Rachel da Silva Wovst

**ADVISER:** Carlos Augusto Mallmann

Santa Maria, February 11, 2015

**ABSTRACT.** Different approaches for the estimation of the uncertainty related to measurement results are found in the literature and in published guidelines. In the present work three approaches were used to estimate the uncertainty of the determination of aflatoxins (AB<sub>1</sub>, AB<sub>2</sub>, AG<sub>1</sub>, AG<sub>2</sub>) and deoxynivalenol in maize by liquid chromatography coupled to mass spectrometry tandem (LC-MS/MS): the *Bottom up* approach, adapted from the Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (ISO GUM); the Monte Carlo Method (MCM), which propagates distributions assigned to the input quantities through a numerical simulation; and the Kragten approach which calculates standard deviations and confidence intervals with a universally applicable spreadsheet technique. A measurement equation was developed for mycotoxins analysis and a cause-and-effect diagram was drafted to assist in the identification of the sources of uncertainty associated with the method. Detailed analysis of contributions of the various uncertainty sources was carried out. Measurement uncertainty was determined by the addition of the variances of the individual steps of the test procedure, according to each approach employed. The *Bottom up*, MCM and Kragten approaches produced very similar estimates to the combined uncertainty and the coefficient of variation (CV) between them was smaller than 1.0%. The main contribution to overall uncertainty is the intermediate precision with contributions over 90,0% for each mycotoxin. The results obtained with this research conclude that the three approaches are adequate for estimating the uncertainty in mycotoxin assays with LC-MS/MS technique. Among them, *Bottom up* is the most appropriate approach, since it requires that the analyst performs a detailed investigation about dominant components of the measurement uncertainty, allowing for better understanding and improvement of the measurement process. The Monte Carlo and Kragten methods are indicated the data generated by the *Bottom up* approach.

**Keywords:** measurement uncertainty, mycotoxins, *Bottom up* approach, Monte Carlo Method, Kragten spreadsheet.



## ABREVIATURAS E SIGLAS

BIPM	Bureau International des Poids et Mesures
CIPM	Comité International des Poids et Mesures
IEC	International Electrotechnical Commission
ISO	International Organization for Standardization
ISO GUM	Guia para Expressão da Incerteza de Medição
JCGM	Joint Committee for Guides in Metrology
LC-MS/MS	Cromatografia líquida associada à espectrometria de massas <i>tandem</i>
MCM	Monte Carlo Method
OIML	International Organization of Legal Metrology
<i>pdf</i>	Probability density function (função densidade de probabilidade)
VIM	Vocabulário Internacional de Metrologia

## SUMÁRIO

<b>1. APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>12</b>
<b>3.1. O problema das micotoxinas .....</b>	<b>17</b>
<b>3.4. Aplicação do ISO GUM em análises químicas.....</b>	<b>18</b>
<b>3.5. Método de Monte Carlo segundo o Suplemento 1 do ISO GUM.....</b>	<b>19</b>
<b>4. ARTIGO .....</b>	<b>21</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>36</b>

## **1. APRESENTAÇÃO**

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito. Desta forma, as seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão e Referências encontram-se no próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo.

Ao término do manuscrito estão as conclusões obtidas através do referido estudo, assim como o referencial teórico utilizado para a elaboração da Revisão Bibliográfica deste trabalho.

## 2. INTRODUÇÃO

Micotoxinas são substâncias tóxicas produzidas pelo metabolismo secundário de certas espécies de fungos filamentosos, as quais ocorrem em diversos alimentos, tanto pré quanto pós-colheita. O controle efetivo das micotoxinas apoia-se basicamente na identificação inequívoca e quantificação precisa desses metabólitos em alimentos e rações (ZÖLLNER & MAYER-HELM, 2006). Uma determinação quantitativa, por sua vez, só poderá ser interpretada adequadamente se estiver acompanhada da incerteza de medição.

A incerteza de medição é a dúvida remanescente associada ao resultado da medição, estabelecida como uma medida quantitativa da confiança analítica. Já o resultado de uma medição, é considerado como a melhor estimativa do valor do mensurando (o que está sendo medido) acompanhada de todas as fontes da incerteza que contribuem para sua propagação (JCGM 100, 2008).

Em 1993, a publicação do Guia para Expressão da Incerteza de Medição (ISO GUM), pela ISO (International Organization for Standardization), padronizou a avaliação e expressão da incerteza em um amplo espectro de medições. A abordagem descrita no ISO GUM baseia-se na modelagem do sistema de medição e propagação das incertezas através da aproximação de uma série de Taylor, fornecendo uma estimativa da grandeza de saída (mensurando) e a sua incerteza (ISO GUM).

Em 2008, o JCGM (Joint Committee for Guides in Metrology) elaborou um suplemento do ISO GUM, onde o Método de Monte Carlo (MMC) foi descrito como um procedimento alternativo para estimar a incerteza em sistemas de medição. Esse método propaga as funções de densidade de probabilidade (*pdf*) ao invés de apenas as incertezas das grandezas de entrada, obtendo assim uma estimativa da *pdf* do mensurando. O MMC associado à utilização de softwares computacionais pode ser uma alternativa para validar cálculos efetuados conforme o método ISO GUM, já que a propagação de distribuições é uma generalização da lei de propagação de incertezas (BARWICK & ELLISON 2000).

Abordagens “empíricas” para estimativa da incerteza têm recebido maior atenção. Elas são baseadas em investigações de desempenho do método de ensaio, planejadas e conduzidas de maneira a compreenderem os efeitos de tantas fontes de incerteza relevantes quanto possível. Os dados utilizados nessas abordagens são tipicamente dados de precisão e

tendência, obtidos a partir de estudos de validação intralaboratorial, controle de qualidade, comparações interlaboratoriais ou ensaios de proficiência (BARWICK & ELLISON 2000; EURACHEM/CITAC, 2012). Estas abordagens são totalmente conformes com o ISO GUM, desde que os princípios do mesmo sejam observados (EUROLAB, 2006).

Um método numérico de diferenciação foi proposto por Kragten (1994). Esse método utiliza-se de uma planilha de cálculo que requer conhecimento apenas da equação utilizada para determinar o resultado final da medição, seus parâmetros numéricos e incertezas. A utilização da planilha para calcular a incerteza é proposta pelo Nordic Committee for Food Analysis (NMKL, 2003) e exemplificada no Guia Eurachem/Citac (2012).

No presente trabalho as abordagens “*Bottom up*”, baseada nos princípios do ISO GUM, e os Métodos de Monte Carlo e Kragten foram utilizados para estimar a incerteza na determinação de aflatoxinas e deoxinivalenol em milho por cromatografia líquida associada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). O objetivo foi comparar e avaliar a aplicabilidade dessas abordagens para estimar a incerteza na determinação das micotoxinas.

### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1. Contexto histórico da incerteza de medição**

Em todo processo e produto temos variações cujo entendimento é crucial para a elaboração de planos de melhoria contínua. O uso de princípios estatísticos para estudar as variações nos processos teve seu início nas primeiras décadas do século XX. Em 1930, começaram a ser dados os primeiros passos para a criação do Controle Estatístico da Qualidade. Walter Shewhart, trabalhando para a Bell System, nos Estados Unidos, desenvolveu várias técnicas de controle estatístico da qualidade, sendo a mais importante a carta de controle estatístico de processo (INMETRO, 2011).

A Segunda Guerra Mundial consagrou o controle estatístico da qualidade através dos órgãos de controle da qualidade, criados por exigência dos organismos de compra das forças armadas das grandes potências mundiais. Durante os anos 1930 e 1940, muitas companhias implementaram métodos de controle estatístico da qualidade e renomearam seus tradicionais “departamentos de inspeção” como “departamentos de controle da qualidade”(INMETRO,

2011). No decorrer da década de 1960, a análise da confiabilidade passou a ser usada de forma rotineira em, praticamente, todas as indústrias de ponta.

Com o desenvolvimento da cultura metrológica, a metrologia e a qualidade nas empresas e laboratórios tem se tornado um importante fator competitivo. Em algumas áreas, como por exemplo a automotiva, a metrologia já possui tradição, contando com inúmeras ferramentas de controle e qualidade que objetivam reduzir custos e garantir o produto ideal para o cliente. Já em outras áreas, como agricultura, meio ambiente e saúde, sugere-se um posicionamento por parte dos laboratórios de ensaios para assegurar a confiabilidade dos resultados.

A necessidade de demonstrar a confiabilidade dos resultados analíticos evidencia a importância do uso de técnicas de controle estatístico de processo nos laboratórios. Uma dessas técnicas é a incerteza de medição. Segundo Thompson et al. (2012), a incerteza é a principal característica metrológica do resultado de uma medição para se estabelecer e se verificar o atendimento ao critério de “adequação ao uso pretendido”.

Conforme o Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM, 2008), a incerteza de medição é um parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão de valores que podem ser fundamentalmente atribuídos a um mensurando. Este parâmetro pode ser, por exemplo, um desvio padrão (ou um múltiplo dele), ou a metade de um intervalo correspondente a um nível de confiança estabelecido. Uma medição, por sua vez, é um conjunto de operações que tem como objetivo determinar o valor de uma grandeza. Em geral, o resultado de uma medição é somente uma estimativa do valor do mensurando e, portanto, é completo somente quando acompanhado por uma declaração da incerteza desta estimativa (EURACHEM/CITAC, 2012). Sem a declaração sobre a incerteza, resultados não podem ser comparados entre si, com os valores de referência especificados ou com uma norma.

De um ponto de vista histórico, a questão da incerteza nem sempre foi aceita pela comunidade científica (KLIR e YUAN, 1995). Na visão tradicional da ciência, a incerteza representa um estado indesejável, o qual deve ser evitado a todo custo. Este era o estado da ciência até o final do século XIX, quando os físicos perceberam que a Física Newtoniana não abordava problemas a nível molecular. Posteriormente, métodos associados à estatística reconheceram que as médias estatísticas poderiam substituir manifestações específicas de entidades microscópicas que representam o que não era precisamente conhecido, isto é, a incerteza. Desde então, o papel da Física Newtoniana, e seu cálculo subjacente, foi substituído pela Física Estatística que pode ser descrita por uma teoria de probabilidade, uma teoria que

poderia capturar uma forma de incerteza decorrente de processos aleatórios (BOOKER e ROSS, 2011).

Após o desenvolvimento da Física Estatística, houve uma tendência gradual na ciência, ao longo do século XX, de considerar a influência da incerteza sobre os problemas. A tentativa era desenvolver modelos mais robustos, no sentido de que as soluções credíveis fossem realizáveis e ao mesmo tempo a incerteza pudesse ser quantificada.

No entanto, a expressão de incerteza usando a teoria da probabilidade foi desafiada pela primeira vez em 1937 por BLACK (1937) com seus estudos em imprecisão e em seguida, com a introdução dos conjuntos *fuzzy* por ZADEH (1965). O trabalho de Zadeh influenciou profundamente o pensamento sobre a incerteza porque ele desafiou não só a teoria da probabilidade como a única representação para a incerteza, mas os próprios fundamentos sobre os quais a teoria da probabilidade foi baseada (KLIR e YUAN, 1995).

Desde 1965, diversas teorias matemáticas sobre a incerteza tem sido desenvolvidas, tais como a Teoria das Probabilidades [5,9], Grupos Fuzzy de Zadeh [4]; Teoria da Evidência de Dempster-Shafer [5-7], Teoria das Probabilidades Imprecisas [11] e Teoria dos Intervalos Aleatórios.

Com a evolução da tecnologia a discussão sobre incerteza começou a ganhar importância para medições mais cotidianas, presentes no dia-a-dia de várias indústrias, e com isso as normas dos sistemas da qualidade começaram a apresentar indicativos sobre a necessidade do tratamento dessas incertezas. Neste cenário como não havia um consenso sobre a melhor maneira de calcular a incerteza, visto que as duas abordagens tem seus usuários preferenciais, e que existem divergências tanto na nomenclatura quanto nos conceitos básicos relativos a incerteza de medição, refletindo um desacordo entre pesquisadores e físicos experimentais sobre a melhor maneira de calcular a incerteza, iniciou-se uma discussão mais abrangente sobre a declaração das incertezas das medições buscando-se formas objetivas de introduzir o cálculo das incertezas das medições dentro das normas da qualidade (LIMA, 1999).

Nesse cenário, em 1977, a maior autoridade mundial em metrologia, o CIPM (*Comité International des Poids et Mesures*) reconhecendo a falta de consenso internacional sobre a expressão da incerteza de medição, e preocupado com as recomendações que diversas organizações estavam elaborando sobre o assunto, solicitou ao BIPM (*Bureau International des Poids et Mesures*) que estudasse a questão e procurasse chegar a uma recomendação que fosse de consenso. Mediante tal solicitação o BIPM enviou um questionário a 31 laboratórios

de metrologia nacionais e a especialistas individuais, como também a cinco organizações internacionais ligadas ao assunto. Dos questionários enviados retornaram 21 com respostas que se constituíram nos dados de entrada para a realização dos estudos do BIPM.

A responsabilidade da elaboração de uma metodologia padronizada para estimar a incerteza de medição foi conferida à ISO (*International Organization for Standardization*) e ao TAG 4 (*Technical Advisory Group on Metrology 4*). O TAG 4, por sua vez, estabeleceu o *Working Group 3 (WG3)* com especialistas designados pelo BIPM, IEC (*International Electrotechnical Commission*), ISO e OIML (*International Organization of Legal Metrology*). A primeira versão do Guia para a Expressão da Incerteza de Medição surgiu em 1993 como ISO/TAG4-WG3 1993. Este Guia foi revisado e publicado em 1995 com o título: *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*, conhecido como ISO GUM. Em 2008 foi publicada uma nova revisão do ISO GUM, na qual foram feitas algumas correções (JCGM 100, 2008).

O ISO GUM estabelece regras gerais para avaliar e expressar incerteza em medição, regras essas que podem ser seguidas em vários níveis de exatidão e em muitos campos de atuação. Segundo o guia, se todas as grandezas das quais o resultado de uma medição depende forem variadas, sua incerteza poderá ser calculada por meios estatísticos. Entretanto, uma vez que isso é raramente possível na prática, devido a tempo e recursos limitados, a incerteza de um resultado de medição é geralmente avaliada utilizando-se um modelo matemático da medição e a lei de propagação da incerteza.

### **3.2. Princípios da Estimativa da incerteza pelo ISO GUM**

A metodologia descrita no ISO GUM é baseada na Lei da Propagação das Incertezas e se resume nos seguintes passos principais: a) definição do mensurando; b) estimativas das incertezas das fontes de entrada; c) cálculo dos coeficientes de sensibilidade; d) cálculo das componentes de incerteza; e) combinação das componentes; f) cálculo dos graus de liberdade efetivos; g) determinação do fator de abrangência; h) estimativa da incerteza expandida. Dentre essas etapas, a mais importante é a definição do mensurando (JCGM 100, 2008).

O mensurando não pode ser especificado por um valor, mas somente pela descrição de uma grandeza. Entretanto, em princípio, um mensurando não pode ser completamente descrito sem um número infinito de informações. Assim, na medida em que deixa margem à interpretação, a definição incompleta do mensurando introduz, na incerteza do resultado de uma medição, um componente de incerteza que pode ou não ser significativo para a exatidão



requerida da medição (JCGM 100, 2008). Ainda, segundo o ISO GUM, o mensurando é determinado a partir de “ $n$ ” grandezas de entrada, através de uma relação funcional, conforme a Equação 1:

$$y = f(x_1, x_2 \dots x_n) \quad (1)$$

Onde  $x_1, x_2 \dots x_n$  são as grandezas cujos valores e respectivas incertezas são diretamente determinados durante a medição. Existem ainda outras grandezas cujos valores e incertezas provêm de fontes externas à medição, tais como: certificados de padrões, materiais de referência, valores de referência da literatura, etc.

O ISO GUM classifica os componentes de incerteza em duas categorias de acordo com o método utilizado para estimar seu valor numérico: incertezas Tipo A: aquelas que são avaliadas por métodos estatísticos; incertezas Tipo B: aquelas que são avaliadas por outros meios.

As incertezas avaliadas devem ser combinadas aplicando-se o método usual para a combinação de variâncias. A variância combinada, dessa forma, é vista como uma soma de termos em que cada um deles representa a variância estimada associada com a estimativa de saída  $y$  gerada pela variância estimada associada com cada estimativa de entrada  $x_i$ . Ainda, se duas grandezas de entrada  $x_i$  e  $x_k$  forem de algum modo correlacionadas, sua covariância também deverá ser levada em conta como uma contribuição à incerteza. A habilidade para levar em conta o efeito de correlações depende do conhecimento do processo de medição e do julgamento das dependências mútuas das grandezas de entrada. De modo geral, deve-se ter em mente que negligenciar correlações entre as grandezas de entrada pode levar a avaliações incorretas da incerteza padrão do mensurando (CGCRE, 2013).

Embora a incerteza combinada possa ser universalmente usada para expressar a incerteza de um resultado de medição, em algumas aplicações comerciais, industriais e regulamentadoras, e quando a saúde e a segurança estão em questão, é muitas vezes necessário fornecer uma medida de incerteza que defina um intervalo em torno do resultado da medição com o qual se espera abranger uma extensa fração da distribuição de valores que poderiam ser razoavelmente atribuídos ao mensurando (JCGM 100, 2008). Essa medida adicional é denominada *incerteza expandida*, e é obtida multiplicando-se a incerteza padrão combinada por um fator de abrangência  $k$ . O fator  $k$ , por sua vez, é estabelecido com base nos

graus de liberdade efetivos  $V_{eff}$  determinados pela equação de Welch Satterthwaite (SATTERTHWAITE, 1946).

$$V_{eff} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^n \frac{(c_i u(x_i))^4}{v_i}} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^n \frac{u_c^4(y)}{v_i}}$$

### 3.1. O problema das micotoxinas

A contaminação fúngica de culturas e cereais armazenados pode resultar na produção de micotoxinas, as quais constituem uma das principais preocupações para a segurança alimentar. A ocorrência, frequência e as implicações das micotoxinas na cadeia alimentar têm ganhado atenção mundial, especialmente na última década (KUIPER-GOODMAN, 2004; COMMISSION REGULATION, 2006). Conforme dados da Food and Agriculture Organization (FAO) estima-se que cerca de 25% das lavouras de alimentos do mundo estão contaminadas com micotoxinas (FAO, 2013).

A toxicidade das micotoxinas tem levado muitos países a elaborarem normas rígidas para o seu controle na alimentação humana e animal e à conseqüente criação de legislações para controlar os níveis de ingestão dessas substâncias pela população (JUAN et al., 2012). Os dados de ocorrência são importantes para estabelecer e regulamentar limites máximos toleráveis de micotoxinas em alimentos. A obtenção desses dados, por sua vez, requer a disponibilidade de métodos precisos para quantificação dessas toxinas.

A maioria dos métodos para análises de micotoxinas têm os seguintes passos em comum: amostragem, homogeneização, extração, separação, detecção e quantificação dos compostos. Atualmente, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas *tandem* (LC-MS/MS) é a técnica quantitativa mais seletiva e precisa para esse tipo de ensaio (PEREIRA et al., 2014). Todavia, a determinação de micotoxinas nos cereais ainda é desafiadora, pois elas estão, geralmente, presentes em baixas concentrações e em matrizes muito complexas (PEREIRA, et al., 2014). A variabilidade dos resultados obtidos para um mesmo lote de cereal é, portanto, intrínseca ao processo analítico.

### 3.4. Aplicação do ISO GUM em análises químicas

A abordagem ISO GUM é uma metodologia bem estruturada que foi desenvolvida originalmente para estimar a incerteza em medições físicas (JCGM 100, 2008). No entanto, alguns problemas importantes têm sido relatados quanto à adaptação dessa metodologia para as medições químicas (HORWITZ & ALBERT, 1977; WILLIANS, 1996; KROUWER, 2003).

Para Willians (1996) a complexidade da estimativa da incerteza em medições químicas em comparação com as medições físicas tem várias razões: a) as medições químicas são mais difíceis de modelar; b) existem mais fontes de incerteza c) frequentemente os componentes de incerteza são muito difíceis de quantificar; d) a falta de homogeneidade das amostras e, o mais importante, e) problemas relacionados à seletividade dos métodos de ensaio e separação dos analitos a serem quantificados.

Na década de 90 a EURACHEM/CITAC (1995) adotou o ISO GUM para estimar a incerteza em ensaios químicos. Porém, químicos analíticos relutaram em adotar essa abordagem. Em contrapartida, o Comitê de Métodos Analíticos (AMC, 1995) da Real Society of Chemistry adotou a proposta de Wernimont (1985), utilizando estimativas de precisão a partir de estudos interlaboratoriais de desempenho de métodos para avaliar a incerteza. Logo após, o NMKL sugeriu uma abordagem similar, baseada somente em dados provenientes de estudos intralaboratoriais. A vantagem dessas abordagens é que elas utilizam dados que geralmente já estão disponíveis na validação do método.

A segunda edição do Guia EURACHEM/CITAC (2000) sugere usar dados de validação na estimativa da incerteza. Barwick e Ellison (2000) também propuseram um protocolo para avaliar a incerteza a partir de dados de validação. A abordagem utilizada pelos autores combina dados precisão, recuperação e robustez do método.

Segundo a Federação Europeia das Associações Nacionais de Medição, Teste e Laboratórios Analíticos (EUROLAB, 2006), os princípios do ISO GUM admitem e dão suporte a essa variedade de abordagens adaptadas para os ensaios químicos, as quais denominam de “empíricas”. Uma vez que essas abordagens sejam baseadas no desempenho completo do método e as investigações sejam concebidas e realizadas de maneira a compreenderem os efeitos de tantas fontes de incerteza relevantes quanto possíveis, estas abordagens serão conformes com o ISO GUM.

### 3.5. Método de Monte Carlo segundo o Suplemento 1 do ISO GUM

Em 2008, o Grupo de Trabalho 1, "Expressão da incerteza de medição" do Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM) preparou o Suplemento 1 do Guia para Expressão da Incerteza de Medição (JCGM 101, 2008). Este suplemento fornece uma abordagem numérica geral, coerente com os princípios básicos do ISO GUM para a realização dos cálculos necessários para a avaliação da incerteza de medição e sua implementação através do Método Monte Carlo (MMC).

O MMC é descrito como uma alternativa prática ao ISO GUM quando: a) a linearização do modelo fornece uma representação inadequada, ou b) a função de densidade de probabilidade (*pdf*) para a quantidade de saída se afasta sensivelmente de uma distribuição Gaussiana, por exemplo, devido a uma marcada assimetria.

A avaliação da incerteza de medição a partir da MMC pode ser resumida nos seguintes passos: a) elaboração do modelo matemático da medição; b) seleção das fontes significativas de incerteza; c) identificação da *pdf* correspondente à cada fonte de incerteza selecionada; d) seleção do número *M* de ensaios de Monte Carlo; e) execução das simulações por meio de software apropriado e f) computação dos resultados. Em suma, o valor de cada grandeza é calculado aleatoriamente a partir da sua *pdf*, gerando um valor para a grandeza de entrada. Este procedimento se repete "n" vezes (ensaios), tipicamente  $10^4$  a  $10^6$ . Este processo produz um conjunto de resultados simulados que, em determinadas suposições, faz uma aproximação *pdf* para o valor do mensurando. A partir deste conjunto de resultados simulados, o valor médio e desvio padrão são calculados e representam, respectivamente, a estimativa do mensurando e a incerteza padrão associada a esta estimativa. A Figura 1(A) ilustra esse processo, o qual é comparado com a Figura 1(B), que descreve o processo convencional preconizado pelo ISO GUM.

A grande vantagem do MMC reside não só no fato de os seus resultados tenderem para uma solução exata, dependendo do número de simulações (*trials*) efetuadas, mas também no fato de fornecer informação muito mais completa sobre o modelo de medição analisado.

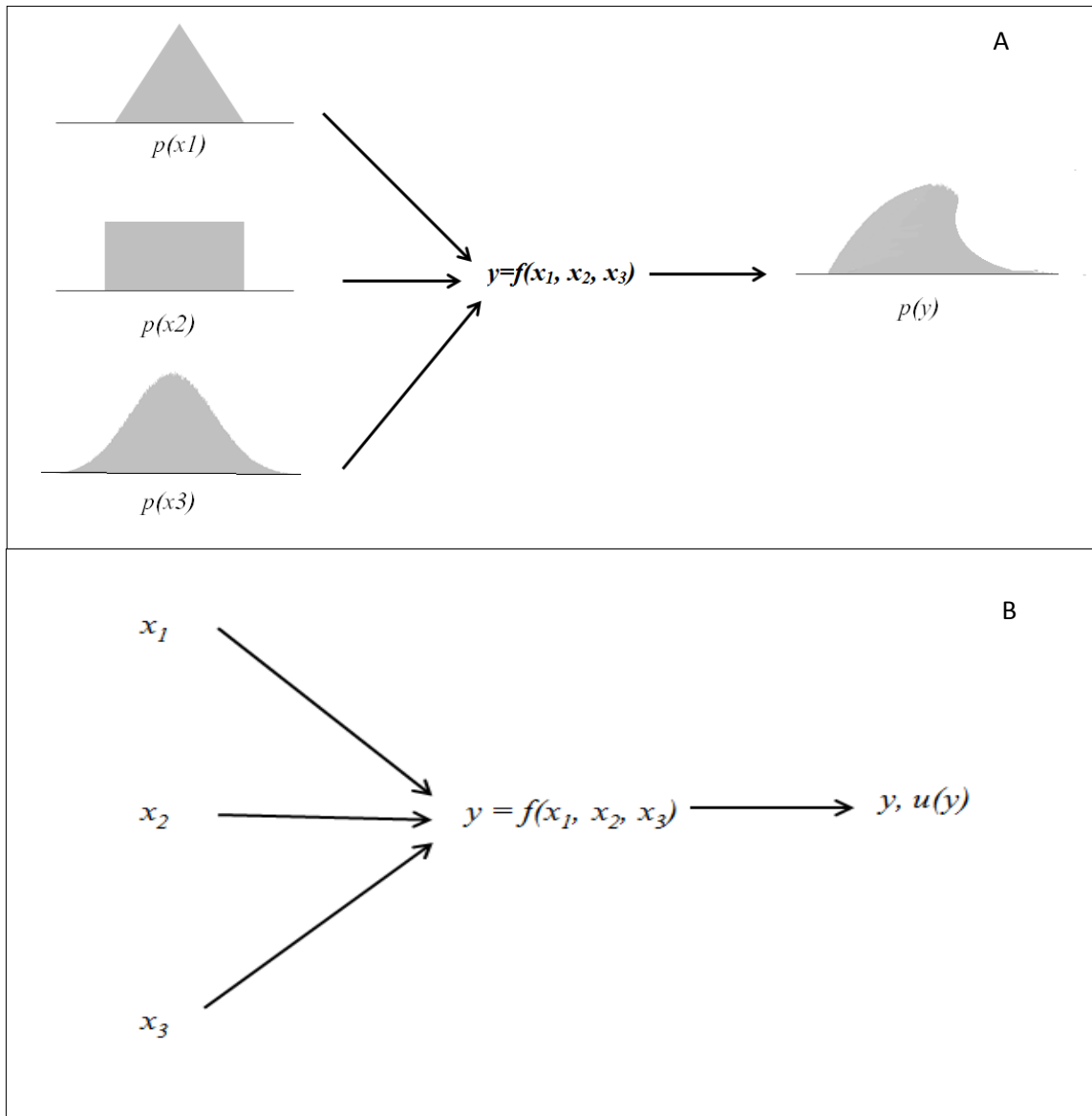


Fig. 1. A Figura (A) exemplifica a propagação das distribuições para três grandezas de entrada independentes e a Figura (B) ilustra o processo com base na propagação das incertezas.

#### 4. ARTIGO

**Evaluation of measurement uncertainty by means of *Bottom up*, Monte Carlo and Kragten approaches: application in aflatoxins and deoxynivalenol assays using LC-MS/MS method.**

Liziane Rachel da Silva Wovst<sup>a</sup>, Maurício Schneider Oliveira<sup>b</sup>, Diego Artemio Franco Sturza<sup>b</sup>, Paulo Dilkin<sup>a</sup>, Carlos Augusto Mallmann<sup>a</sup>.

(Artigo submetido ao periódico Talanta – 2015)

<sup>a</sup> Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC), CEP 97105 900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

<sup>b</sup> Instituto de Soluções Analíticas Microbiológicas e Tecnológicas (SAMITEC), CEP 97105 910, Rio Grande do Sul, Brasil.

\* Corresponding author. Tel.: +55 55 3220 8445

E-mail address: mallmann@lamic.ufsm.br (Carlos Augusto Mallmann)

**Evaluation of measurement uncertainty by means of *Bottom up*, Monte Carlo and Kragten approaches: application in aflatoxins and deoxynivalenol assays using LC-MS/MS method.**

**Abstract**

Different approaches for the estimation of the uncertainty related to measurement results are found in the literature and in published guidelines. In the present work three approaches were used to estimate the uncertainty of the determination of 4 aflatoxins (AB<sub>1</sub>, AB<sub>2</sub>, AG<sub>1</sub>, AG<sub>2</sub>) and deoxynivalenol (DON) in maize by liquid chromatography coupled to mass spectrometry tandem (LC-MS/MS): the *Bottom up* approach, adapted from the Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (ISO GUM); the Monte Carlo Method (MCM), which propagates distributions assigned to the input quantities through a numerical simulation; and the Kragten approach which calculates standard deviations and confidence intervals with a universally applicable spreadsheet technique. A measurement equation was developed for mycotoxins analysis and a cause-and-effect diagram was drafted to assist in the identification of the sources of uncertainty associated with the method. Detailed analysis of contributions of the various uncertainty sources was carried out. Measurement uncertainty was determined by the addition of the variances of the individual steps of the test procedure, according to each approach employed. The *Bottom up*, MCM and Kragten approaches produced very similar estimates to the combined uncertainty and the coefficient of variation (CV) between them was smaller than 1.0%. The main contribution to overall uncertainty is the intermediate precision with contributions over 90,0% for each mycotoxin. The results obtained with this research conclude that the three approaches are adequate for estimating the uncertainty of mycotoxin assays for quantification by LC-MS/MS. The *Bottom up* is the most appropriate approach, since it requires that the analyst performs a detailed investigation about dominant components of the measurement uncertainty, allowing for better understanding and improvement of the measurement process. Monte Carlo and Kragten methods are useful tools to validate the data generated by the *Bottom up* approach.

**Keywords:** measurement uncertainty, mycotoxins, *Bottom up* approach, Monte Carlo Method, Kragten spreadsheet.

## 1. Introduction

Mycotoxins are toxic substances produced by the secondary metabolism of some filamentous fungi strains occurring in food and feed commodities both pre-and post-harvest. Due to the low levels at which mycotoxins are usually present in foodstuffs as well as general restrictive guidelines concerning their maximum acceptable levels, robust and selective methods are required for their sensitive and accurate determination [1]. In particular, it is important to demonstrate the fitness for purpose of these methods by giving a measure of the confidence that can be placed on the result. One useful measure of this is measurement [2].

The importance of measurement uncertainty for ensuring the reliability of analytical assays is well recognized [3]. The worldwide established standard ISO/IEC 17025, specifies requirements concerning the estimation of uncertainty of measurement and how it should be stated in test reports [4].

In order to establish an international consensus for the estimation of measurement uncertainties, ISO in collaboration with BIPM, IEC, IFCC, ILAC, IUPAC, IUPAP and OIML published in 1993 the “Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement”, briefly referred to as ISO GUM [5]. The ISO GUM approach, based on the law of uncertainty propagation, estimates the overall uncertainty by identifying, estimating and combining all the sources of uncertainty associated with the measurement.

In chemical analysis, some important limitations of the ISO GUM uncertainty framework have been described [6], comprising model linearization, assumption of normality of measurand derived from the application of Central Limit Theorem and computation of the effective degrees of freedom. In order to overcome these drawbacks, a supplement to the ISO GUM was recently developed [7], where the Monte Carlo Method (MCM) is described as an alternative procedure for the estimation of uncertainties.

MCM provides a general numerical procedure for solving mathematical problems by simulating random variables. It has been applied on the evaluation of measurement uncertainty in situations where the conditions for the applicability of the ISO GUM and related concepts are not fulfilled or it is unclear whether they are fulfilled [7].

Recently alternative “empirical approaches”, based on whole-method performance investigations, have received greater attention [8-9]. The “*Bottom up*” approach is based on statistical and metrological methods where all conceivable sources of uncertainty are



systematically evaluated [10]. The method also utilizes data from precision and bias. This approach is fully compliant with the ISO GUM [2].

Another approach used to estimate uncertainty has been described by Kragten [11]. The method consists in a universally applicable spreadsheet outlined for the calculation of standard deviations based on the general formula for error propagation. By means of using spreadsheet software, standard deviations are calculated numerically without violating the condition of mutual independence, with a substantial time gain and with no risk of calculating errors. According to Kragten [11], the spreadsheet method is applicable in a standard manner to all error propagation calculations.

The Eurachem/CITAC Guide [2] has set examples to illustrate how the aforementioned methods can be applied to some typical chemical analyses. According to the Eurachem/CITAC Guide, in most cases the ISO GUM, MCM and Kragten approaches will give virtually the same value for the standard uncertainty associated with the estimate of the measurand. Differences become apparent when distributions are far from Normal and where the measurement result depends non-linearly on one or more input quantities.

The present work states a detailed description of the evaluation of uncertainty on the measurement of aflatoxins ( $AB_1$ ,  $AB_2$ ,  $AG_1$ ,  $AG_2$ ) and deoxynivalenol (DON) content in maize matrix measured by a LC-MS/MS method. Three approaches to estimate measurement uncertainty will be compared: the *Bottom up* approach, adapted from the Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (ISO GUM); the Monte Carlo Method (MCM), which propagates distributions assigned to the input quantities through a numerical simulation; and the Kragten approach which calculates standard deviations and confidence intervals with a universally applicable spreadsheet technique.

## **2. Material and methods**

### *2.1. Chemicals*

Acetonitrile, methanol and ammonium acetate (LC grade) were purchased from J. T. Baker. Ultra pure water was obtained from a Milli-Q System from Millipore.

## 2.2. Certified reference materials

Mycotoxin certified standards solutions in acetonitrile – 1,01  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), AB<sub>2</sub> (1,01  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), AG<sub>1</sub> (1,03  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), AG<sub>2</sub> (1,02  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) and deoxynivalenol (100,20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) - were purchased from Biopure. Solutions of aflatoxin M<sub>1</sub> (1,00  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and deepoxy-deoxynivalenol (100,2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) were purchased from Sigma Aldrich and Biopure and used as internal standards.

## 2.3. Sample preparation

Maize grains were ground through a 1,5 mm screen, and 5,0 g of the sample was extracted for 20 min with 10 ml of acetonitrile: water in a 50 ml flask using a multi-vortex. The extract was properly diluted in a methanol: water solution.

## 2.4. LC-MS/MS procedure

Aflatoxins and deoxynivalenol were determined using a Shimadzu liquid chromatograph coupled to an AB SCIEX Triple Quad 6500 MS/MS System. The column used for chromatographic separation was an Eclipse<sup>®</sup> XDBC<sub>8</sub>, 4,6 x 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ . An isocratic elution was performed using water (eluent A) and methanol (eluent B) both containing 5 mMol of ammonium acetate. The flow rate was set at 0,8 ml/min and the injection volume was 0,04 ml. Data were collected and recorded on Multi Quant 2.1 software.

## 2.5. Recovery and precision study

The bias and precision of the analytical procedure were measured by the analysis of 7 maize samples free of aflatoxins and deoxynivalenol contamination (blank samples) fortified with AB<sub>1</sub>, AB<sub>2</sub>, AG<sub>1</sub>, AG<sub>2</sub> at 5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  each one, and DON at 1600  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . This procedure was repeated on 3 days, varying conditions such as calibration curves, analysts, and volumetric equipments. Precision was expressed as a standard deviation. The recovery of mycotoxins was expressed as the percentage of the measured mycotoxins spiked into a blank maize sample.

## 2.6. Bottom up approach

The evaluation of the measurement uncertainty by the *Bottom up* approach was performed by identifying, estimating and combining all the sources of uncertainty associated with the measurement. Firstly, the relationship between the measurand and the input

quantities it depends was stated. The measurand was defined as the concentration of each mycotoxin in a maize sample expressed by Eq. (1):

Where  $C_{myco}$  is the amount of mycotoxin expected to be found in a fraction of maize sample ( $C_{AB_1}$ ,  $C_{AB_2}$ ,  $C_{AG_1}$ ,  $C_{AG_2}$ ,  $C_{Don}$ );  $m$  is the mass of the sample,  $V_{sol}$  is the volume of the extraction solvent,  $V_{ext}$  is the volume of the sample extract fraction to be dispensed,  $V_{dil}$  is the volume of the sample after dilution,  $S$  is the concentration of the standard in the calibration curve and  $R$  is the recovery coefficient of the method.

The second step consisted in identifying all conceivable sources of uncertainty. So, to achieve this purpose a cause and effect diagram was drafted. Based on Eq. (1), the concentration of mycotoxins was related to 5 quantities, namely *sample preparation (P)*, *mycotoxin extraction (E)*, *sample dilution (D)*, *calibration standard (S)* and *method overall performance (MOP) wich comprises data from intermediate precision and recovery*. The cause and effect diagram was established with these 5 factors as the main branches of uncertainty (Fig. 1). Further factors were added to the diagram, considering each step in the analytical procedure until the contributory factors became negligible. To avoid double counting, uncertainty sources with the same nature was arranged together under the same branch.

The standard uncertainties arising from each source were estimated by considering type A and type B evaluation. For type A evaluation, statistical information obtained from the precision study was used. In type B evaluation, uncertainty contribution was assessed by considering information from the specifications of the equipments manufacturers, calibration certificates from volumetric instruments and the certified uncertainty of reference materials utilized. The main equations for each calculation are presented in Table 1.

The calculation of the result and the associated standard uncertainty was performed by applying the model and combining the contributions into the standard uncertainty of the result. The combined uncertainty was obtained as the positive square root of the sum of the relative variances, calculated by Eq. (2).

### 2.7. Monte Carlo Method

For the design of the Monte Carlo approach we considered all the random quantities affecting the measurand. The probability distributions assumed for the different parameters are presented in Table 2. Considering these parameters, the measurement model was also expressed by Eq. (1).

We have used the statistical software package Statgraphics Centurion version XVI.II [12] for generating pseudo-random numbers and solving the integral equation for mycotoxins concentration. A number (M) of 10000 trials was selected and the extraction of M samples of the input quantities was performed. For each sample, the model expressed by Eq. (1) was evaluated and the output quantity value was generated. From the results report, the following data were quoted: mean value, coefficient of variation, standard deviation, skewness and kurtosis. The combined uncertainty was expressed by the standard deviation of the resulting simulated values.

### 2.8. Kragten spreadsheet

For uncertainty estimation, the calculation scheme presented by Kragten [11] and also demonstrated by worked examples described in EURACHEM/CITAC Guide [2] was followed. The calculation scheme was implemented by using a Microsoft Excel spreadsheet program. The Figure 2 shows the Kragten spreadsheet model used for calculate uncertainty in mycotoxins concentration.

## 3. Results and discussion

### 3.1. General discussion of the results

Table 3 presents the combined uncertainties computed for the concentration of mycotoxins with the *Bottom up*, MCM and Kragten approaches. Our study showed agreement between the uncertainties calculated by the three approaches, with coefficients of variation (CV) lower than 1,0%. This agreement is also demonstrated by the Eurachem/CITAC Guide [2], wich states some examples of the application and comparison of theses approaches to estimate uncertainty in chemical assays. Similar results are presented by Theodorou et al [3] in a study comparing the ISO GUM approach and Monte Carlo simulations to estimate the uncertainty of cadmium measurement in water by GFAAS.

In a first moment, we see that the *Bottom up* and Kragten approaches slightly overestimate the uncertainty in mycotoxins concentration in about 1,0% when compared to MCM. This difference is also consistent with Theodorou et al [3] in his aforementioned study, and Herrador et al. [6] who applied Monte Carlo and ISO GUM for the determination of clenbuterol by HPLC with a coulometric and electrode array system. Investigating the possible sources of this difference, we found that the *Bottom up*, MCM, Kragten approaches,

comprise practically the same sources of uncertainty. Thus, this difference can be corrected by the decimal rounding of the uncertainty result and be considered negligible.

In mycotoxins analysis, the identification of all relevant uncertainty components was best done by drafting a *cause and effect* diagram. The major sources taken into account were disposed in the main branches of the fishbone, as demonstrated in Figure 1. The uncertainty branch which represents the standard concentration in the calibration curve (*C*) contains uncertainty contributions from the preparation of the calibrators, whereas the uncertainty arising from sample processing (*P*, *E* and *D*) comprises the uncertainties from the measuring instruments (scales, dispensers solvents and micropipettes). The uncertainty branch represented by MOP (method overall performance) comprises the uncertainties arising intermediate precision and recovery.

It is assumed that all relevant uncertainty contributions are covered by the precision study. Fig. 3 presents an overview of the contribution of the different uncertainty sources (in terms of relative uncertainties) on the combined standard uncertainty for mycotoxins assays. The graphical evaluation of the components notes that the variance obtained during the intermediate precision study comprises the largest contribution to the combined uncertainty. A similar result has been demonstrated by Hund et al. [13] in the evaluation of uncertainty of a liquid chromatographic assay for tylosin determination. Indeed, intermediate precision is an essential component of overall uncertainty since it is determined by combining the individual variations or by studying the complete method in operation. However, as intermediate precision cannot be directly ascribed to any component of the measurement equation, we use data from recovery, which was obtained during the intermediate precision experiment. Thus the correction factor of recovery (*R*) was included in Eq. (1), and the relative standard deviation of *R* represents the uncertainty MOP.

By the Monte Carlo approach, we conclude that the distribution of the measurand is symmetric around the mean value for each mycotoxin. Statistics values for skewness and kurtosis (Table 4) are into the range of -2 to +2, which indicates a normal distribution of the measurand. A *pdf* for the example of aflatoxins concentration is illustrated graphically by Figure 4. The graphs generated state a normal (Gaussian) *pdf*, which is a bell shaped curve with a permitted range from minus infinity to plus infinity. The horizontal axis of the *pdf* graph marks off the possible values of each aflatoxin, while the vertical axis gives the probability density.

After estimating individual components of uncertainty, the combined uncertainty was calculated according to Eq. (2). This calculation step is common to *Bottom up* and Kragten approaches. The only difference is that for *Bottom up* approach we combine the values in terms of relative uncertainties while for Kragten, we use absolute values. In the *Bottom up* approach, the use of relative values instead of multiplying the standard uncertainties by their respective partial derivatives is justified by the nature of Eq. (1), which allows us to employ *the product and quotient rule*. By this rule, the fractional indeterminate uncertainty in the product or quotient of several quantities is the square root of the sum of the squares of the fractional uncertainties of the individual quantities. With MCM this calculation step is excluded and the combined uncertainty is the standard deviation of the results for  $n$  simulations.

### 3.2. Comparison of the different approaches

The ISO GUM uncertainty framework is expected to work well in many circumstances. In this study, we applied a *Bottom up* approach, which was based on ISO GUM principles. In a first moment, this approach may look intimidating since there are several uncertainty components requiring considerations. However, the *Bottom up* approach shows the advantage of helping to improve knowledge of analytical techniques and principles since all the components that contribute to uncertainty and their magnitude must be identified and estimated. Likewise, the possibility of include data from method validation is very useful. Method validation is carried out to ensure that the performance obtained during development can be achieved for a particular application but also provides relevant information for the uncertainty assessment. Of these, the method precision will always be a major source of uncertainty regardless of the approach assumed. In addition, the evaluation of method recovery is an indicative of the bias of the measurement process. Several protocols have also been developed using this kind of information to evaluate uncertainty in chemical assays [14].

However, it is not always straightforward to determine whether all the conditions for ISO GUM application hold. According to the Supplement 1 to the ISO GUM [7], since the domain of validity for MCM is broader than that for the ISO GUM uncertainty framework, it is recommended that both approaches be applied and the results compared. This study shows that MCM procedure is well applied and eminently suited for mycotoxins determination as well as practical alternative to validate the values achieved by the GUM uncertainty framework and its based approaches. One of the potential drawbacks of MCM is that a programming expertise or use of certain commercial software packages to carry out Monte

Carlo analysis is required. For our study we have used the package Statgraphics Centurion version XVI.II. This program easily enables Monte-Carlo simulations.

Finally the implementation of spreadsheet method for uncertainty calculation, as described by Kragten [11] proved to be transparent and easy to understand, since the spreadsheet allowed all the input quantities, their associated uncertainties and the equations used. Implementation of the spreadsheet also provided a considerable gain in time, since the contributions were easily calculated. We can observe in Table 3, that *Bottom up* and Kragten approaches have identical values for uncertainty. This means that Kragten Spreadsheet is a useful tool to validate the calculation step of the *Bottom up* approach.

#### 4. Conclusions

The *Bottom up*, Monte Carlo and Kragten approaches, in their essence, are fully compliant with the principles of the ISO GUM and agree among themselves, producing very approximate uncertainty estimates for mycotoxins measurements using the LC-MS/MS technique. Therefore, they all can be considered for estimating uncertainty in our analytical procedure.

The *Bottom up* should be the first choice approach to estimate uncertainty in mycotoxins assays because it supports the forces that drive the work on improving the quality of measurement procedures. The *Bottom up* approach provides a feedback to the analyst, since it requires knowledge about the whole method performance to identify the dominant components of the measurement uncertainty, allowing for better understanding, management, and improvement of the measurement process. It was possible to conclude with the *Bottom up* approach that, for mycotoxins results, the uncertainty originating from precision/recovery gives a large contribution to the combined uncertainty. Thus, any improvements to be made in the methodology must take into account these factors.

Monte Carlo and Kragten methods are important tools which can be used to validate the calculations performed with the *Bottom up* approach. The choice for one or another will depend on the purpose of the laboratory. If the aim is to obtain detailed statistic data for the uncertainty results, MCM should be the approach of choice. Therefore, if the purpose of the laboratory is to perform calculations with gain in time, easily and with low costs, Kragten approach should be applied.

## 5. References

- [1] C.I. Kralj Cigi, H. Prosen. *International Journal of Molecular Sciences* 10(1) (2009) 62-115.
- [2] EURACHEM/CITAC Guide, *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, third ed., 2012, on-line document: <http://www.vtt.fi/ket/eurachem/quam2012-pl.pdf>.
- [3] D. Theodorou, L. Meligotsidou, S. Karavoltsos, A. Burnetas, M. Dassenakis, M. Scoullou. *Talanta* 83 (2011) 1568–1574
- [4] ISO/IEC 17025, International Organization for Standardization, Geneva, 2005.
- [5] JCGM 100, BIPM Joint Committee for Guides in Metrology, Sevres, 2008.
- [6] M.A. Herrador, A.G. Asuero, A.G. Gonzalez, *Talanta* 64 (2004) 415–422.
- [7] JCGM 101, BIPM Joint Committee for Guides in Metrology, Sevres, 2008.
- [8] *Guide to the Evaluation of Measurement Uncertainty for Quantitative Test Results*, Paris, France, 2006.
- [9] *Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories*, Nordtest, Finland, 2003.
- [10] G.N.W. Leung, E.N.M. Ho, W.H. Kwok, D.K.K. Leung, F.P.W. Tang, T.S.M. Wan, A.S.Y. Wong, C.H.F. Wong, J.K.Y. Wong, N.H. Yu. *Journal of Chromatography A*, 1163 (2007) 237–246.
- [11] J. Kragten, *Analyst*, 119 (1994) 2161-2166
- [12] Statgraphics Centurion, version XI.II. Statgraphics. [http://www.statgraphics.com/statgraphics\\_centurion.htm](http://www.statgraphics.com/statgraphics_centurion.htm)
- [13] E. Hund, D. L. Massart, J. Smeyers-Verbeke. *Analytica Chimica Acta* 480 (2003) 39–52
- [14] S.L.R. Ellison, V.J. Barwick, *The Analyst* 123 (1998) 1387–1392.



Eq. (1)

$$C_{myco} = \frac{V_{sol} \times V_{dil} \times Cal}{m \times V_{ext}} \times R \quad (1)$$

Eq. (2)

$$\frac{u(C_{myco})}{C_{myco}} = \sqrt{\left(\frac{u(P)}{P}\right)^2 + \left(\frac{u(E)}{E}\right)^2 + \left(\frac{u(D)}{D}\right)^2 + \left(\frac{u(S)}{S}\right)^2 + \left(\frac{u(R)}{R}\right)^2} \quad (2)$$

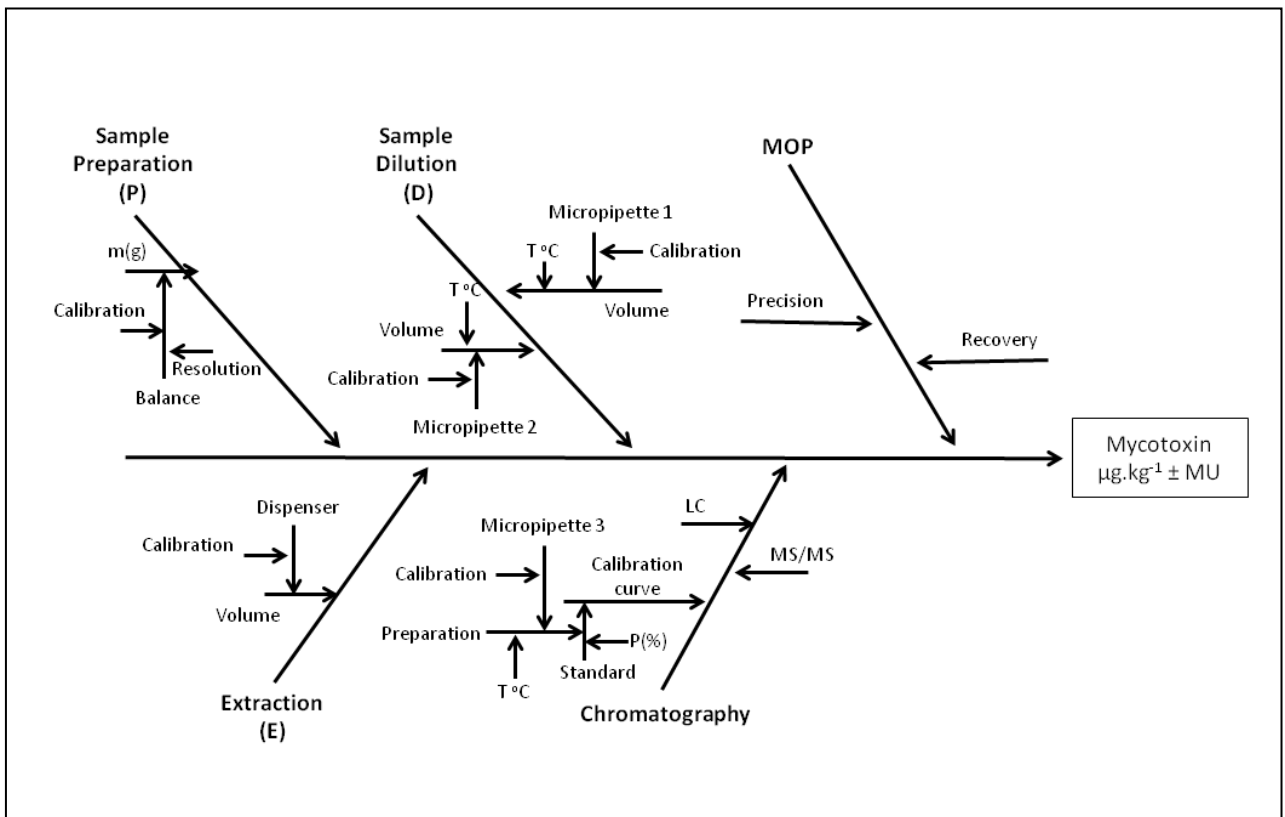


Figure 1. Cause and effect diagram.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1								
2		Value	Standard uncertainty					
3	X <sub>1</sub>	P	u(P)	P + u(P)	P	P	P	P
4	X <sub>2</sub>	E	u(E)	E	E + u(E)	E	E	E
5	X <sub>3</sub>	D	u(D)	D	D	D + u(D)	D	D
6	X <sub>4</sub>	C	u(C)	C	C	C	C + u(C)	C
7	X <sub>5</sub>	R	u(R)	R	R	R	R	R + u(R)
8								
9	y	y=f(P, E, D, C, R)	f=(P + u(P), E, D, C, R)	f=(P, E + u(E), D, C, R)	f=(P, E, D + u(D), C, R)	f=(P, E, D, C + u(C), R)	f=(P, E, D, C, R + u(R))	
10								
11				u(y, P)	u(y, E)	u(y, D)	u(y, C)	u(y, R)
12								
13		u(C <sub>myco</sub> )		u(y, P) <sup>2</sup>	u(y, E) <sup>2</sup>	u(y, D) <sup>2</sup>	u(y, C) <sup>2</sup>	u(y, R) <sup>2</sup>
14								
15								
16								

Figure 2. Illustration of a Kragten spreadsheet model for mycotoxins analysis.

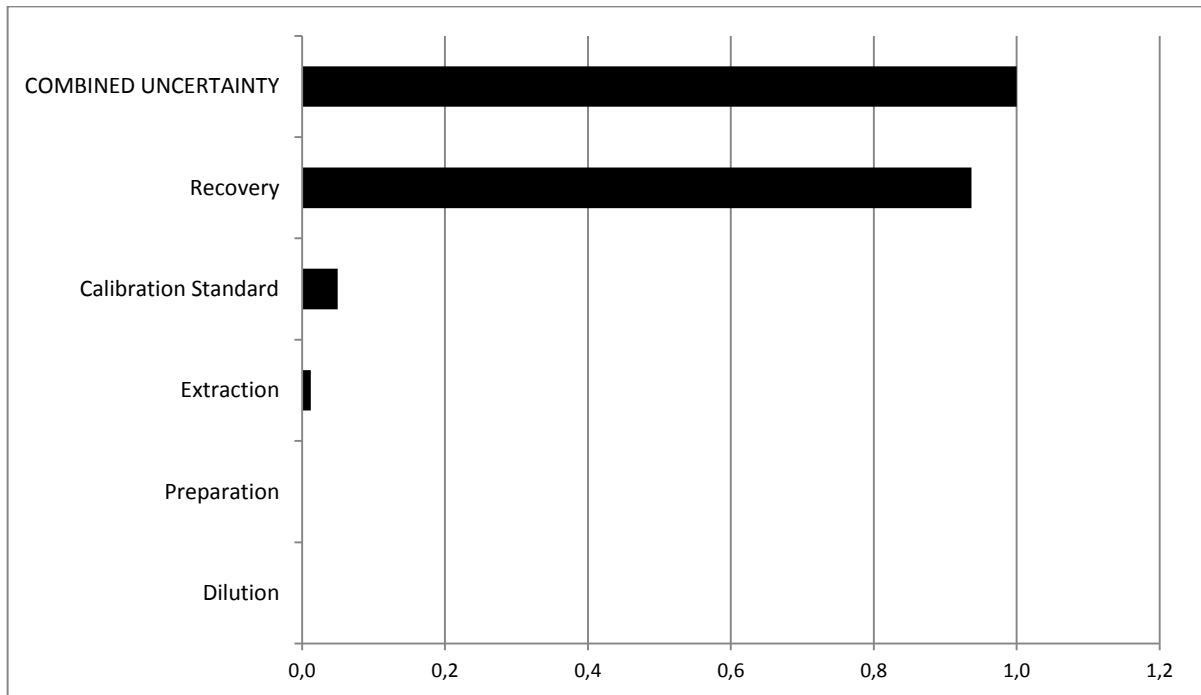


Figure 3 – Contribution of each parameter for combined uncertainty. Example for Aflatoxin B<sub>1</sub> analysis.

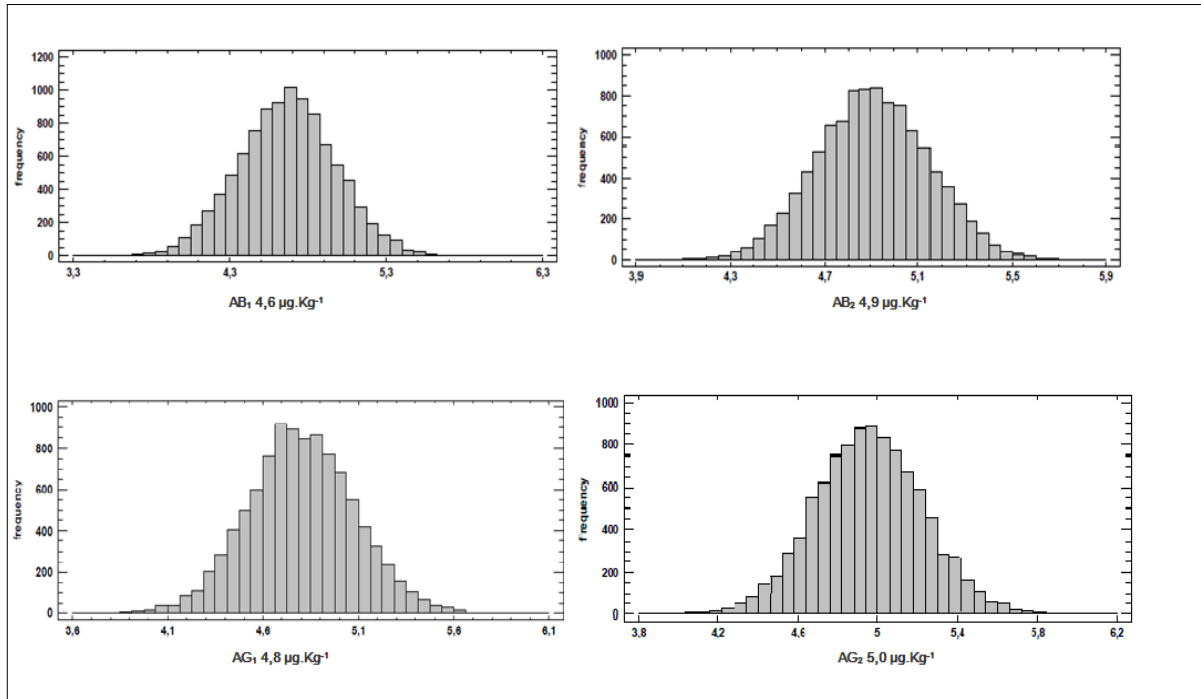


Figure 4. Probability Density Functions for the example of aflatoxins.

**Table 1**

Mathematical model equations for standard uncertainty.

Quantity	Function	Description
$u_c(P)$	$u(P) = \sqrt{m^2 + m(res)^2}$	$m$ : Certified uncertainty of the balance $m(res)$ : Resolution of the balance
$u_c(E)$	$\frac{u(E)}{E} = \sqrt{\frac{u(V)^2}{V}}$	$V$ : Certified uncertainty of the dispenser of solvent used in the extraction process
$u_c(D)$	$u(Dil) = \sqrt{Pip1^2 + Pip2^2 + Pip3^2}$	$D$ : sum of the certified uncertainties of the micropipettes (Pip1, Pip2 and Pip3)
$u_c(S)$	$\frac{u(S)}{S} = \sqrt{\frac{u(P(\%))^2}{P(\%)} + \frac{u(V_{Pip4})^2}{Pip4} + \frac{u(V_{Pip5})^2}{Pip5} + \frac{u(V_{Pip6})^2}{Pip6}}$	$P(\%)$ : certified purity of the standard solution $Pip4, Pip5, Pip6$ : sum of the certified uncertainties of the micropipettes used for the extraction process
$u_c(R)$	$\frac{u(R)}{R} = \sqrt{\frac{u(R)^2}{R}}$	$u(R)$ : uncertainty of the recovery, expressed as a standard deviation

**Table 2**

Probability density functions.

Quantity	Description	Distribution
m	Mass of the sample	t-student
m(r)	Resolution	rectangular
p (%)	Certified purity of standard solution (Pcal)	t-student
V <sub>ext</sub>	Volume of sample extract	t-student
V <sub>sol</sub>	Volume of solvent added to the sample during extraction of mycotoxins.	t-student
V <sub>dil</sub>	Final volume in vial	t-student
R	Recovery coefficient of the method	t-student

**Table 3**

Uncertainty values from different approaches

	Mean concentration $\mu\text{g.Kg}^{-1}$	Combined uncertainty $\mu\text{g.Kg}^{-1}$			CV%
		<i>Bottom up</i>	MCM	Kragten	
AB <sub>1</sub>	4,66	0,314	0,309	0,314	0,9
AB <sub>2</sub>	4,91	0,240	0,237	0,240	0,7
AG <sub>1</sub>	4,80	0,280	0,278	0,283	0,9
AG <sub>2</sub>	4,98	0,274	0,271	0,274	0,6
DON	1518,10	158,90	158,43	158,90	0,2

**Table 4**

Summary statistics from Monte Carlo simulations to mycotoxins

Count	AB <sub>1</sub>	AB <sub>2</sub>	AG <sub>1</sub>	AG <sub>2</sub>	DON
Average ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	4,66	4,90	4,80	4,95	1518,75
Standard deviation	0,31	0,24	0,28	0,27	158,43
Coeff. of variation (%)	6,62	4,80	5,81	5,48	10,43%
Minimum ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	3,50	4,01	3,74	3,97	950,52
Maximum ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	5,93	5,74	5,93	6,02	2219,93
Std. Skewness	-0,65	0,23	0,38	1,85	1,20
Std Kurtosis	-0,16	-0,33	0,98	0,69	0,28

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARWICK, V. J; ELLISON, S. L. R. The evaluation of measurement uncertainty from method validation studies. Part 1: Description of a laboratory protocol. **Accred Qual Assur.** 5: p. 47–53, 2000.

CGCRE - INMETRO. Expressão da incerteza de medição por laboratórios de calibração. **NIT-DICLA 021**, 2013.

EURACHEM/CITAC. Guide: quantifying uncertainty in analytical measurement. **EURACHEM**, 1 ed. 1995.

EURACHEM/CITAC. Guide: quantifying uncertainty in analytical measurement. **EURACHEM**, 2 ed. 2000.

EURACHEM/CITAC. Guide: quantifying uncertainty in analytical measurement. **EURACHEM** 3 ed. 2012.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation EC no01/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, L 70/12. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32006R0401:en:NOT>>. Acesso em: 09 fev. 2010.

FAO. Mycotoxins. Food Safety and Quality, 2013. Disponível em <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-zindex/mycotoxins/en/>. Acesso em Janeiro/2013.

HORWITZ, W.; ALBERT, R. **Analyst** 122, 615, 1997.

ISO, BIPM, JCGM. Evaluation of measurement data - Guide to the expression of uncertainty in measurement. **JCGM 100**, 2008.

ISO, BIPM, JCGM. Evaluation of measurement data - Supplement 1 to the Guide to the expression of uncertainty in measurement - Propagation of distributions using a Monte-Carlo method. **JCGM 101:2008**.

JCGM, BIPM, IEC, IFCC, ILAC, ISO, IUPAC, IUPAP, OIML. International vocabulary of metrology – basic and general concepts and associated terms (VIM). **JCGM 200**, 2008.

JUAN, C.; RITIENI, A.; MAÑES, J. Determination of trichothecenes and zearalenones in grain cereal, flour and bread by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 134(4), p. 2389-397, 2012.

ISO/IEC. Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. **ABNT**, 2005.

KRAGTEN J. Calculating standard deviations and confidence intervals with a universally applicable spreadsheet technique. **Analyst**. 119: p. 2161-2166, 1994.

KROUWER, J. S. Point Critique of the *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement* Method of Estimating and Reporting Uncertainty in Diagnostic Assays. **Clinical Chemistry**, 49:11, p. 1818–1821, 2003.

KUIPER-GOODMAN, T. Risk assessment and risk management of mycotoxins in food. In: MAGAN, N., OLSEN, M. (Eds.), **Mycotoxins in Food**, p. 3–31, 2004.

NMKL. Estimación y expresión de la incertidumbre de la medición en análisis químico. **Procedimiento N° 5**: p. 1-45. 2003.

PEREIRA ,V.L.; FERNANDES, J.O.; CUNHA, S.C. Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. *Trends in Food Science & Technology* xx, p. 1-41, 2014.

SATTERTHWAITE, F.E. **Psychometrika** **6**, 309-316; 1946.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis. **Pure & Appl. Chem.**, 2002.

WERNIMONT, G. T.; Use of Statistics to Develop and Evaluate Analytical Methods, **AOAC: Arlington**, 1985.

WILLIAMS, A. **Accred. Qual. Assur.** 1 14, 1996.