

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CANDIDATO A MATERIAL DE REFERÊNCIA DE FÍGADO BOVINO PARA NUTRIENTES E CONTAMINANTES INORGÂNICOS

Pós-doutoranda: Amanda Maria Dantas de Jesus Peixoto

Supervisora: Dra. Ana Rita de Araújo Nogueira

Abril de 2015

Introdução



Ministério da Agricultura
Pecuária e Abastecimento

- » O Brasil é o maior exportador de carne bovina no mundo;
- » A expectativa é que até 2020 a produção nacional de carnes suprirá 44,5% do mercado mundial;
- » Uma das maneiras de se atestar a qualidade e a segurança da carne a ser exportada é por meio das análises de nutrientes e de elementos tóxicos.



Introdução

- » Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas capazes de determinar tais elementos com precisão e exatidão adequadas;
- » Materiais de referência que apresentem propriedades semelhantes à matriz a ser analisada: avaliação de figuras de mérito para a validação do método.

MATERIAIS DE REFERÊNCIA



São comercializados a elevado custo;



Difícil encontrar MRC semelhantes as amostras em estudo (principalmente produtos agropecuários);



A produção de MRC no Brasil ainda é pequena.



A contribuição para o desenvolvimento tecnológico do país, aumentando a disponibilidade de novos materiais de referência em áreas diversas tornou-se metas de pesquisadores e instituições.



OBJETIVO PRINCIPAL

- *Produção de material candidato a referência nacional em amostra de fígado bovino*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Caracterização do material candidato a material de referência com base nos requisitos estabelecidos internacionalmente pelas ISO Guias 30 a 35;
- ✓ Distribuição aos laboratórios da Rede MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Serão avaliados os parâmetros analíticos:

Preparo do material (moagem, homogeneização, testes de estabilidade e etc.)

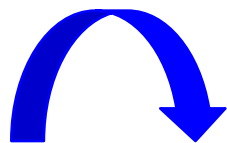
Distribuição, ensaio de proficiência e avaliação dos resultados.

Experimental

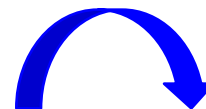
Preparo do material candidato – fígado bovino



27 bovinos



160 kg de amostra *in natura*
moído e congelado



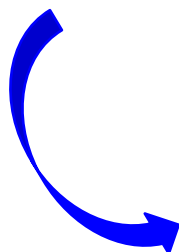
Liofilização



34 kg de amostra
liofilizada



moagem (250 μ m)



Separação dos
grânulos

Experimental

Preparo do material candidato – fígado bovino



homogeneização

- ✓ Amostra separada em 3 baldes;
- ✓ 1kg de cada balde no homogeneizador;
- ✓ Agitada por 15 min;
- ✓ Repetido 3 vezes

Esterelização com
radiação gama
(25-30 kGy) - IPEN

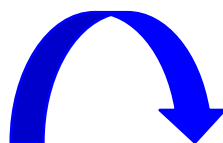


Experimental

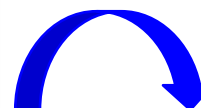
Preparo do material candidato – fígado bovino



Etiquetas adesivas
para identificação



330 frascos
com 100 g do material



Distribuição a
laboratórios
colaboradores

Teste de distribuição do tamanho de partícula

➤ Medida realizada no CENA

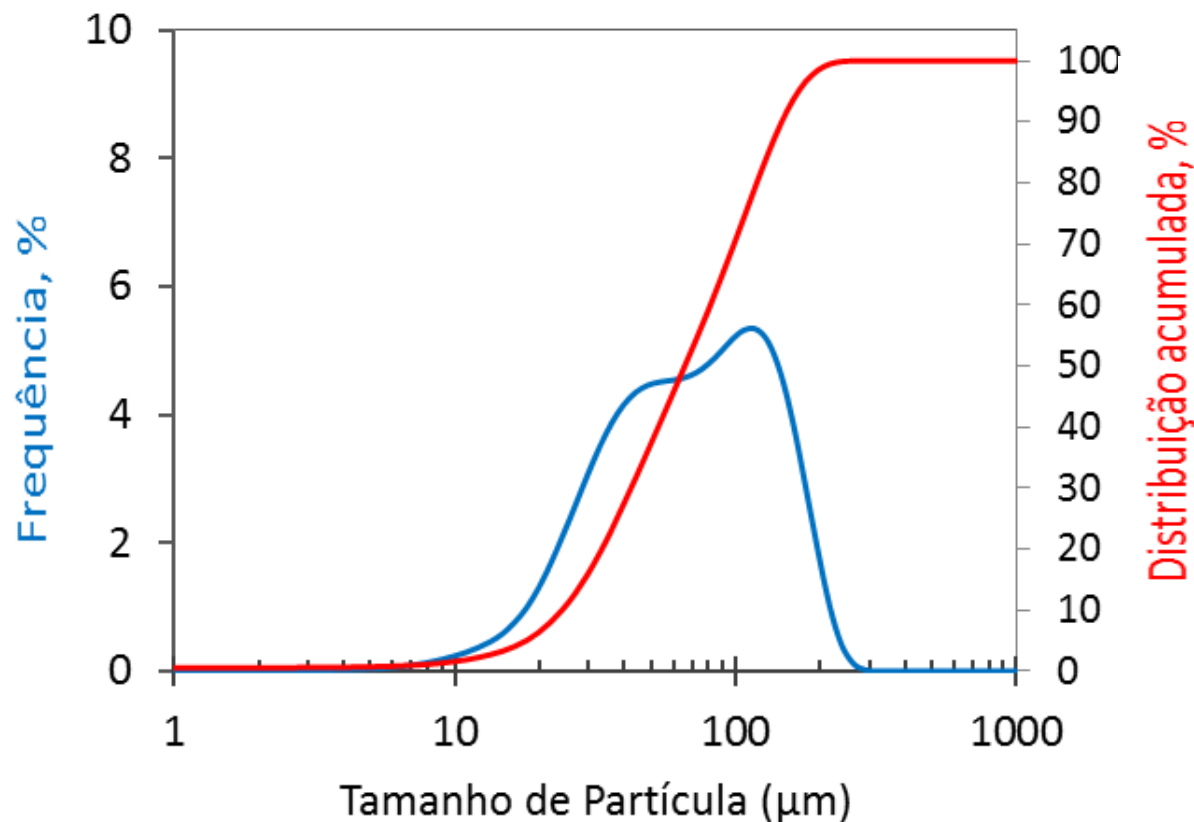
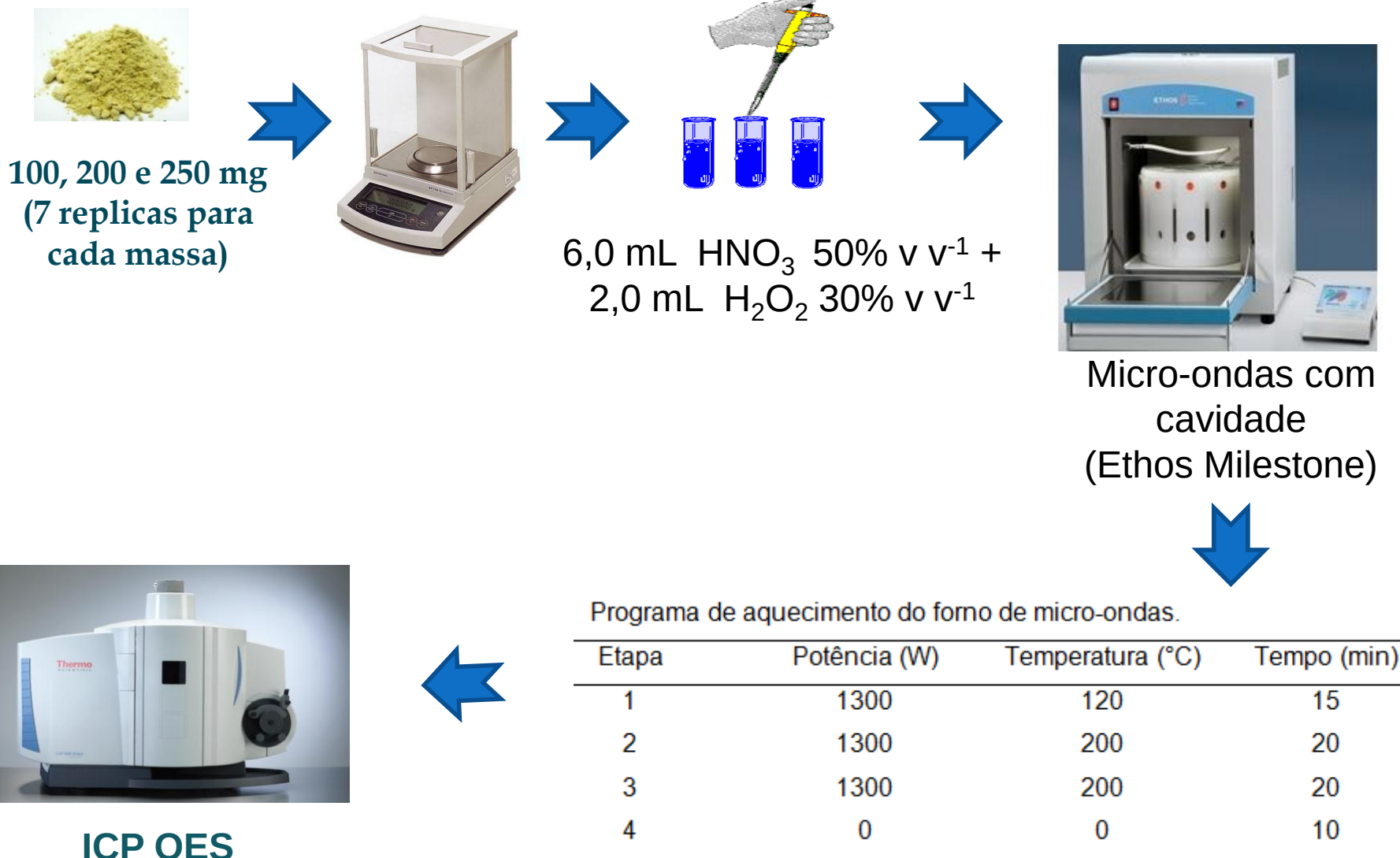


Figura 1- Curva de Distribuição Granulométrica

60% das amostras se encontram com tamanho de partícula $< 145 \mu\text{m}$

Estimativa da massa mínima

Decomposição por via úmida assistida por forno micro-ondas



Estimativa da massa mínima

Analito	m = 0,100 g		m = 0,200 g		m = 0,250g	
	Média ± Desvio	RSD %	Média ± Desvio	RSD%	Média ± Desvio	RSD%
Ca (mg kg ⁻¹)	274,7 ± 20,7	7,5	246,4 ± 11,6	4,7	250,5 ± 8,8	3,5
Fe (mg kg ⁻¹)	362,2 ± 37,5	10,4	347,0 ± 21,4	6,2	349,4 ± 20,3	5,8
K(mg kg ⁻¹)	10856,8 ± 503,8	4,6	10853,9 ± 280,4	2,6	10877,1 ± 199,5	1,8
Mg (mg kg ⁻¹)	938,1 ± 64,2	6,8	935,1 ± 38,1	4,1	936,7 ± 23,2	2,5
Na (mg kg ⁻¹)	2883,4 ± 235,2	8,2	2889,6 ± 135,3	4,7	2882,6 ± 98,5	3,4
P (mg kg ⁻¹)	224738,4 ± 18801,1	8,4	224080,5 ± 12364,3	5,5	224590,4 ± 3161,1	1,4
S(mg kg ⁻¹)	10358,2 ± 529,2	5,1	10313,4 ± 416,2	4,0	10303,1 ± 257,5	2,5
Zn(mg kg ⁻¹)	214,7 ± 8,2	3,8	213,4 ± 8,2	3,9	214,2 ± 3,9	1,8

Os resultados foram avaliados com base nos valores de desvio padrão.

Experimental

Avaliação da homogeneidade

HOMOGENEIDADE - pré-requisito para um material de referência

Testes Inter-amostal realizados de acordo com o ISO GUIA 35



10 frascos de um lote de 330 frascos foram selecionados aleatoriamente

As, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, P,
Pb, Rb, S, Se, Sr, V e Zn
ICP-MS e ICP OES

Este Teste inter-amostal tem por objetivo verificar se há variabilidade entre os frascos.

Foi realizado também o Teste intra-amostal no qual foi separado um frasco e analisado 7 replicas do mesmo frasco.

Teste de Homogeneidade

10 frascos
aleatoriamente



250 mg
Triplicata



6 mL de HNO_3 7
 mol L^{-1} e 2 mL de
 H_2O_2 (30% v v⁻¹).



ICP OES



Estudo da homogeneidade

Analito	Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F _{calculado}	Valor-p	F _{crítico}
Ca	Entre	13100,12918	9	1455,569909	2,012	0,0924	2,393
	Dentre	14462,24644	20	723,1123218			
Fe	Entre	23692,43029	9	2632,492255	2,037	0,0887	2,393
	Dentre	25836,21183	20	1291,810592			
K	Entre	24417132,02	9	2713014,669	1,985	0,0967	2,393
	Dentre	27331917,24	20	1366595,862			
Mg	Entre	366081,17	9	40675,69	2,183	0,0700	2,393
	Dentre	372572,09	20	18628,6			
Na	Entre	159234,5	9	17692,72	0,617	0,7683	2,393
	Dentre	572945,5	20	28647,28			
P	Entre	31139344	9	3459927	2,089	0,0814	2,393
	Dentre	33109726	20	1655486			
S	Entre	7,96E+08	9	88408086	1,074	0,4215	2,393
	Dentre	1,65E+09	20	82250741			
Zn	Entre	2042,342	9	226,9268	3,708	0,0070	2,393
	Dentre	1223,952	20	61,19762			

ANOVA – $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$

95% - não há diferenças estatísticas

Teste de estabilidade a curto prazo

Verifica se existe alguma alteração nas características do material sob condições de armazenamento que não sejam as ideais.



3 frascos
aleatoriamente



40 °C e 100 % UR
30 dias



Temperatura e Umidade
foram controladas
diariamente

Teste de estabilidade a curto prazo



250 mg
Triplicata



6 mL de HNO_3
7 mol L^{-1} e 2 mL de
 H_2O_2 (30% v v $^{-1}$).



ICP OES



Estudo da Estabilidade a curto prazo

Analito	Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F _{calculado}	Valor-p	F _{crítico}
Ca	Entre	5064,31	2	2532,156	2,986	0,1258	5,143
	Dentro	5087,44	6	847,9081			
Fe	Entre	1510,48	2	755,2433416	0,625	0,5666	5,143
	Dentro	7245,99	6	1207,665797			
K	Entre	6872499,73	2	3436249,869	3,556	0,0957	5,143
	Dentro	5797128,49	6	966188,0828			
Mg	Entre	19384,34	2	9692,171	0,850	0,4730	5,143
	Dentro	68401,34	6	11400,22			
Na	Entre	646971,6	2	323485,8	5,039	0,0519	5,143
	Dentro	385124,8	6	64187,46			
P	Entre	12713892	2	6356946	1,489	0,2983	5,143
	Dentro	25603175	6	4267196			
S	Entre	84343,73	2	42171,86	0,078	0,9252	5,143
	Dentro	3212698	6	535449,6			
Zn	Entre	558,41	2	279,2088	0,375	0,7018	5,143
	Dentro	4458,78	6	743,1305			

ANOVA – $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$

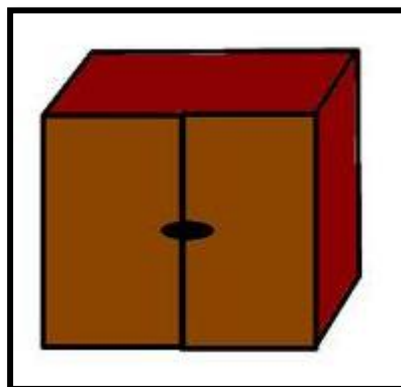
95% - não há diferenças estatísticas

Teste estabilidade a longo prazo

Esse teste irá garantir o período pelo qual os valores certificados estão garantidos, ou seja, o seu tempo de prateleira.



3 frascos
aleatoriamente



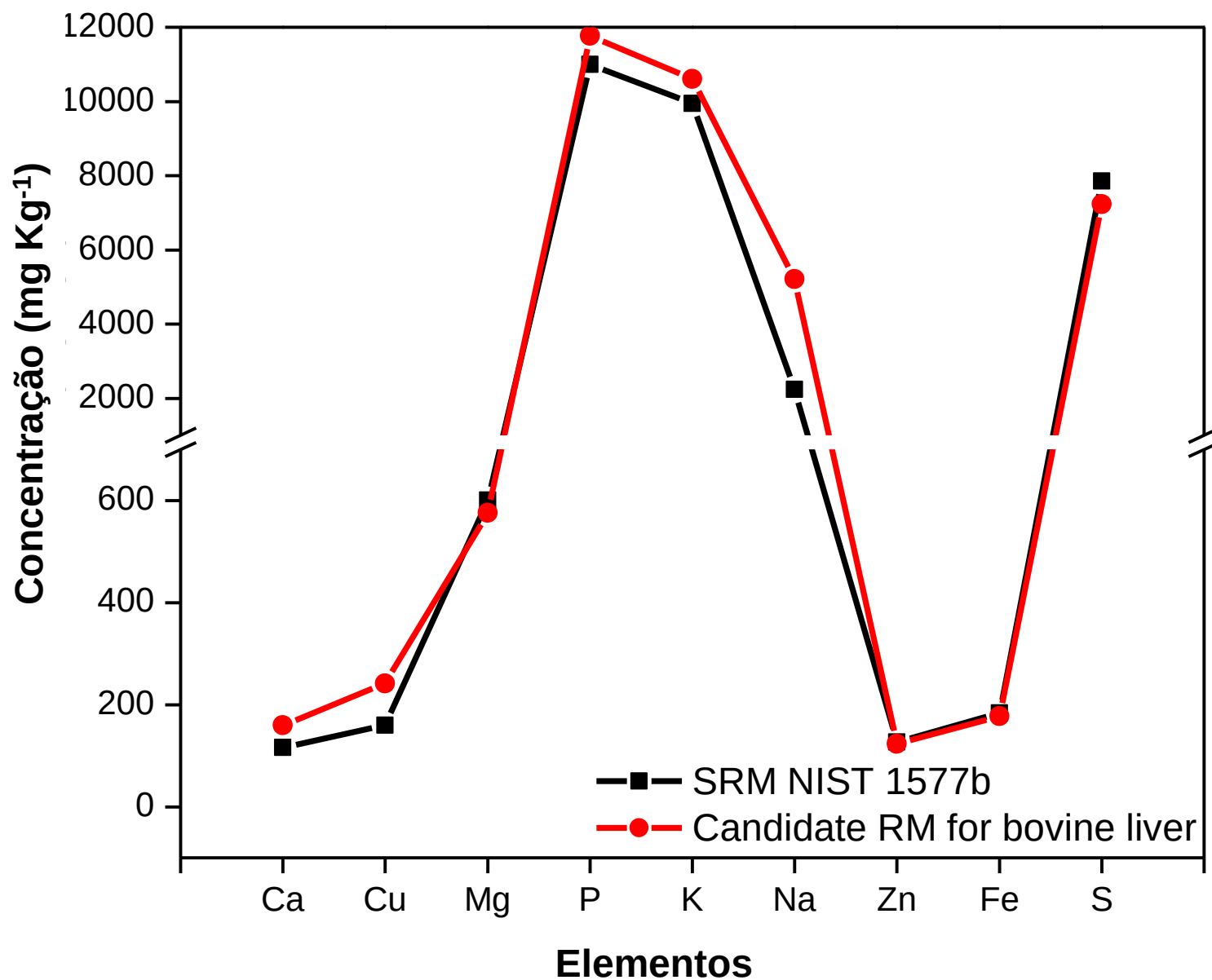
A cada mês
durante 1 ano foi
realizada uma
quantificação dos
analitos

Estudo da Estabilidade a longo prazo

Dados da ANOVA fator único para o teste de estabilidade a longo prazo

Analito	Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F _{calculado}	Valor-p	F _{crítico}
Ca	grupos	222,4985	2	111,2493	0,0857	0,9182	3,682
	Dentro	19456,67	15	1297,111			
Fe	Entre	51,19499	2	25,59749	0,0240	0,9762	3,682
	Dentro	15942,92	15	1062,862			
K	Entre	275871,5	2	137935,8	0,1067	0,8994	3,682
	Dentro	19377023	15	1291802			
Mg	Entre	3217,787	2	1608,894	0,1762	0,8401	3,682
	Dentro	136942,7	15	9129,516			
Na	Entre	21384,33	2	10692,17	0,0795	0,9239	3,682
	Dentro	2016568	15	134437,8			
P	Entre	556459,1	2	278229,6	0,1927	0,8267	3,682
	Dentro	21658796	15	1443920			
S	Entre	50318,12	2	25159,06	0,0220	0,9782	3,682
	Dentro	17145020	15	1143001			
Zn	Entre	23,74792	2	11,87396	0,0277	0,9726	3,682
	Dentro	6417,487	15	427,8325			

Comparação entre o Material Candidato e o CRM da NIST Bovine liver



Ensaio Colaborativo

- ✓ Foram distribuídos até o momento para 12 laboratórios
- ✓ 4 laboratórios já enviaram os resultados
- ✓ O material candidato a material de referência de fígado está sendo distribuído para quem estiver interesse em participar do ensaio colaborativo

Conclusões

- » A verificação da homogeneidade é uma etapa importante na produção de material de referência pois confere confiabilidade e qualidade a esses materiais.
- » De acordo com a avaliação estatística realizada, conclui-se que o fígado bovino candidato a material de referência é homogêneo para todos os analitos estudados, exceto o Zn.
- » O material de referência preparado, possui teores de alguns dos analitos semelhantes ao CRM NIST 1577b.

Agradecimentos

Dra. Ana Rita de Araújo Nogueira

Dr. Gilberto Batista de Souza

Dra. Silmara Rossana Bianchi

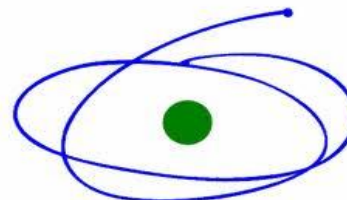
Dra. Poliana Macedo dos Santos



Pecuária Sudeste



*Grupo de Análise
Instrumental Aplicada*



C A P E S