

Produção e certificação de material de referência de metabólitos de nitrofuranos em músculo de frango

Production and certification of reference material for nitrofurantol metabolites in chicken muscle

F G M Violante¹, N O C Zúniga², E F Guimarães¹ and F R A Neto²

¹ Laboratório de Análise Orgânica, Inmetro, Duque de Caxias, 25250-020, Brasil

² LAB RES – LADETEC, UFRJ, Rio de Janeiro, 21941-598, Brasil

fmviolante@inmetro.gov.br

Resumo. Os Materiais de Referência Certificados (MRC) contribuem para a rastreabilidade dos resultados das medições ao Sistema Internacional de Unidades (SI) e, conseqüentemente, para a sua comparabilidade e confiabilidade. Os resultados das etapas de desenvolvimento e certificação de um MR para fração mássica de metabólitos de nitrofuranos em músculos de frango são apresentados neste trabalho. Um lote de candidato a MRC foi produzido a partir de músculo de frango contendo os metabólitos AOZ, AMOZ, SEM e AHD, naturalmente incorporados. Todas as abordagens estatísticas para avaliações de homogeneidade e estabilidade foram realizadas com base nos princípios do ABNT ISO Guia 35. As propriedades estudadas apresentaram homogeneidade suficiente e estabilidade na temperatura de -20°C por 360 dias. Nos estudos de estabilidade em condições de transporte (curta duração) o teor de umidade residual apresentou instabilidade a 20°C e a 50°C e o metabólito AOZ apresentou instabilidade a 50°C. A caracterização do candidato a MRC foi realizada por CLAE-EM/EM, com calibração por *exact matching*. Os valores finais atribuídos para os metabólitos, com suas respectivas incertezas expandidas ($k=2$), foram $(5,4 \pm 1,2)$ ng.g⁻¹, $(5,49 \pm 0,85)$ ng.g⁻¹, $(5,1 \pm 1,2)$ ng.g⁻¹ e $(6,01 \pm 0,85)$ ng.g⁻¹, para os metabólitos AOZ, AMOZ, AHD e SEM, respectivamente.

Abstract. Certified Reference Materials (CRM) contribute to the traceability of measurement results to the International System of Units (SI) and, consequently, to their comparability and reliability. The results of the development and certification stages of a RM for the mass fraction of nitrofurantol metabolites in chicken breast muscle are presented in this work. A batch of a CRM candidate was produced from chicken breast muscle containing incurred metabolites AOZ, AMOZ, SEM and AHD. All statistical approaches for homogeneity and stability assessments were carried out based on the principles of ABNT ISO Guide 35. The properties studied showed sufficient homogeneity and stability at -20°C for 360 days. In stability studies under transport conditions (short term) the residual moisture content showed instability at 20°C and 50°C and the AOZ metabolite showed instability at 50°C. The characterization of the CRM candidate was carried out by HPLC-MS/MS, using exact matching as calibration approach. The final values assigned to the metabolites, with their respective expanded uncertainties ($k=2$), were (5.4 ± 1.2) ng.g⁻¹, (5.49 ± 0.85) ng.g⁻¹, (5.1 ± 1.2) ng.g⁻¹ and (6.01 ± 0.85) ng.g⁻¹, for the metabolites AOZ, AMOZ, AHD and SEM, respectively.

1. Introdução

As questões relacionadas à segurança alimentar, bem como a busca de melhoria pelo aprimoramento das relações comerciais internacionais, têm estimulado as nações na busca da qualidade das medições na área de alimentos. Os Materiais de Referência Certificados (MRC) desempenham um papel fundamental nessa melhoria porque dão a essas medidas a rastreabilidade ao Sistema Internacional (SI) [1, 2]. Na área de drogas veterinárias em produtos de origem animal, cabe destacar o papel importante dos MRCs diante dos problemas de restrições comerciais de alguns países. Os nitrofuranos são medicamentos veterinários utilizados para tratar infecções no trato gastrointestinal de animais, como porcos e aves. Devido às suas características carcinogênicas e mutagênicas, estas estão incluídas no Anexo IV do Regulamento da União Europeia 2377/90 [3], em que as substâncias cuja utilização não é permitida estão listadas. No Brasil, a Instrução Normativa nº 9 de 27 de junho de 2003 [4] também proíbe seu uso. Quando administrados, os nitrofuranos são facilmente metabolizados nos seus principais metabólitos: 3-amino-2-oxazolidinona (AOZ), 3-amino-5-morfolinometil-2-oxazolidinona (AMOZ), semicarbazida (SEM) e 1-aminoidantoína (AHD) [5]. Assim, estes metabólitos são utilizados como marcadores para fins de detecção no monitoramento de resíduos destes compostos em produtos de origem animal. O processo de certificação de um MR consiste na realização da caracterização e das avaliações da homogeneidade e da estabilidade de um lote preparado desse material, bem como na atribuição dos valores de propriedade e das incertezas associadas a esses valores. Com base nos estudos de caracterização e nas avaliações da homogeneidade e estabilidade, o objetivo dessa certificação é estabelecer os valores das propriedades do Material de Referência Certificado dos metabólitos de nitrofuranos em músculo de frango bem como as incertezas associadas a esses valores.

2. Materiais e Métodos

2.1. Origem das amostras de peito de frango

A produção do lote candidato a MRC, utilizou peitos de frango oriundos de animais tratados com os antibióticos da classe dos nitrofuranos. A criação dos animais até o abate foi realizada na Escola Técnica Agrícola Ildefonso Bastos Borges (CTAIBB), localizado no município de Bom Jesus do Itabapoana, Rio de Janeiro, Brasil [6].

2.2. Preparo do lote candidato a MRC

O procedimento de preparo/envase do lote de candidato a MRC foi estabelecido com base nos resultados do estudo de viabilidade [7], e envolveu várias etapas como: análise prévia dos tecidos, liofilização, trituração, peneiração, mistura e homogeneização dos tecidos contaminados com os diferentes metabólitos, envase, liofilização no frasco, e irradiação a 7 kGy.

2.3. Reagentes, padrões e soluções

Os padrões sólidos dos metabólitos de nitrofuranos AOZ (pureza 99,71% ± 0,17%), AMOZ (pureza 98,62% ± 0,25%) foram adquiridos da Riedel-de Haën (Sleeze, Alemanha). O padrão de AHD (pureza 99,82% ± 0,64%) foi adquirido de Dr Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemanha) e o SEM·HCl (pureza 99,54% ± 1,5%), da Witega Laboratorien Berlin-Adlershof GmbH (Berlim, Alemanha). Os valores de pureza apresentados entre parênteses foram determinados pelo Inmetro [8]. Os compostos isotopicamente marcados usados como padrões internos (AOZ-D₄, pureza 99,4%; AMOZ-D₅, pureza 99,8%; AHD-¹³C₃, pureza 99,3% e SEM-[¹³C,¹⁵N₂], pureza 98,7%) foram obtidos da Witega Laboratorien Berlin-Adlershof GmbH (Berlim, Alemanha). Metanol grau HPLC (Tedia, Fairfield, EUA) foi utilizado para o preparo das soluções de padrão e como fase móvel na cromatografia líquida. A água Tipo I (Gradient A10, Millipore, Billerica, EUA) foi utilizada para preparar a fase móvel. Outros reagentes e solventes foram usados nas etapas de hidrólise/derivatização e extração como segue: acetato de etila (grau HPLC) e acetato de amônio (p.a.) (Merck, Darmstadt, Alemanha); e dimetilsulfóxido, ácido clorídrico (37%), hidróxido de sódio, 2-nitrobenzaldeído (2-NBA) e fosfato de hidrogênio dibásico tri-hidratado (grau p.a.,Sigma-Aldrich, Seelze, Alemanha). A solução de Karl Fischer

HYDRANAL®-Coulomat AG (Sigma-Aldrich, Seelze, Alemanha) foi utilizada na titulação coulométrica das amostras para determinar o teor de umidade residual.

2.4. Quantificação dos metabólitos

2.4.1. *Preparo das soluções de trabalho.* Soluções estoque dos padrões naturais e dos PIs foram preparadas individualmente para cada analito na fração mássica de aproximadamente $0,1 \text{ mg.g}^{-1}$ a $0,3 \text{ mg.g}^{-1}$. Uma solução intermediária contendo todos os analitos ou PIs foi preparada a $1 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$, e a solução de trabalho final a 10 ng.g^{-1} . A solução de trabalho foi utilizada no preparo dos calibrantes. Todas as soluções foram preparadas em metanol e armazenadas em frascos de vidro âmbar a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ e na ausência de luz.

2.4.2. *Extração.* Em tubos de Falcon de polipropileno de 50 mL, foram pesados $0,25 \text{ g} \pm 0,01 \text{ g}$ de amostra, que foram reconstituídas em seguida com $0,75 \text{ g} \pm 0,01 \text{ g}$ de água ultrapura e fortificadas com a solução de trabalho de PI. Foram adicionados, na sequência, 4 mL de água ultrapura, 500 μL de solução de ácido clorídrico 1 mol.L^{-1} e 150 μL de 2-NBA para as etapas simultâneas de hidrólise e derivatização. As amostras foram agitadas durante 16 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ em uma incubadora “shaker” (NT 712, Nova Técnica, Piracicaba, Brasil). Após resfriamento a temperatura ambiente, o pH das amostras foi ajustado para 7 pela adição de 5 mL de solução $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de fosfato de potássio dibásico e 400 μL de solução de hidróxido de sódio 1 mol.L^{-1} . Foram adicionados 5 mL de solução de NaCl $0,2 \text{ g.mL}^{-1}$ e os resíduos de metabólitos livres foram extraídos duas vezes por adição de 5 mL de acetato de etila, agitando-se durante 20 min e centrifugando-se a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ e 2000 rpm por 15 min (Z300 K, Hermle Wehingen, Alemanha). As fases orgânicas oriundas das duas extrações foram combinadas em tubos de vidro de 15 mL e evaporadas sob fluxo de nitrogênio (Hurricane-Eagle, Younglin Instrument, Coreia do Sul). Os extratos foram reconstituídos em 300 μL de água: metanol (50:50 v/v) e transferidos para tubos eppendorf e centrifugados a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ e 10.000 rpm, durante 15 min. Os extratos reconstituídos foram filtrados através de filtros PVDF $0,22 \text{ } \mu\text{m}$ (Merck Millipore Ltd., Irlanda) e transferidos para frascos de 2 mL com redutor de volume (*insert vial*), e analisados por CLAE-EM/EM.

2.4.3. *Calibração.* A técnica CLAE-EM/EM foi empregada com o método de Espectrometria de Massas por Diluição Isotópica (EMDI) como estratégia de quantificação, onde utiliza-se os padrões internos análogos, isotopicamente marcados. Porém, as abordagens de calibração empregadas nas etapas de caracterização e nos estudos de homogeneidade e estabilidade do candidato a MRC foram distintas.

Nos estudos de homogeneidade e estabilidade, utilizou-se a curva de calibração em matriz. Brancos de matriz liofilizados e reconstituídos foram fortificados com a solução de trabalho a $0,5 \text{ ng.g}^{-1}$; $1,0 \text{ ng.g}^{-1}$; $1,5 \text{ ng.g}^{-1}$; $2,0 \text{ ng.g}^{-1}$ e $3,0 \text{ ng.g}^{-1}$. A fração mássica dos PIs foi de $1,5 \text{ ng.g}^{-1}$.

Para a caracterização do material utilizou-se o método de calibração por correspondência exata de sinais entre calibrante, PI e amostra (*exact matching calibration*). Somente um nível de calibração foi preparado de forma que a área correspondente ao analito no calibrante correspondesse o mais próximo possível à área do mesmo analito na amostra; e a área do padrão interno também correspondesse à do analito na amostra e no calibrante.

2.4.4. *CLAE-EM/EM.* Todas as análises foram realizadas em um sistema binário de Cromatografia Líquida Agilent 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA) acoplado a um espectrômetro de massas de sistema híbrido triploquadropolo-LIT (“linear ion trap”), modelo 4000 QTRAP® (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Esse equipamento encontra-se nas instalações do LADETEC / IQ-UFRJ.

A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Zorbax Eclipse Plus C18 ($3,5 \text{ } \mu\text{m} \times 4,6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) e gradiente de eluição utilizando acetato de amônio $0,5 \text{ mM}$ e metanol na proporção de 80:20 v/v como eluente A, e metanol como eluente B, com fluxo constante de $0,8 \text{ mL.min}^{-1}$. O volume de injeção foi de 20 μL .

A análise por espectrometria de massas foi realizada por electrospray operando no modo positivo (ESI+). O Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM) foi empregado para análise quantitativa usando as seguintes transições para os metabólitos derivatizados: m/z 236 > 134 (AOZ), m/z 335 > 291 (AMoz), m/z 249 > 104 (AHD) e m/z 209 > 192 (SEM); e seus respectivos padrões internos marcados: m/z 240 > 134 (AOZ-D₄), m/z 340 > 296 (AMoz-D₅), m/z 252 > 104 (AHD-¹³C₃) e m/z 212 > 195 (SEM-¹³C-¹⁵N₂).

2.5. Etapas para certificação

As etapas da certificação do candidato a MRC foram os estudos de homogeneidade, estabilidade de transporte (curta duração) e estabilidade de armazenamento (estudo de longa duração). Todo o processo de certificação, incluindo os planejamentos e procedimentos estatísticos, foi realizado conforme o ISO GUIDE 35 [9] e o guia para a expressão de incerteza de medição [10]. Para dar suporte ao valor de caracterização, foi realizada uma comparação interlaboratorial, para a qual utilizou-se o guia para estimativa para valor de consenso, KCRV, do CCQM, como referência [11].

3. Resultados e discussão

3.1. Preparo do lote candidato a MRC

Foram produzidos no total 255 frascos do lote de candidato a MRC. Devido à capacidade pequena do liofilizador utilizado, o lote foi dividido em duas partes para a realização da etapa final de liofilização no frasco. De forma a avaliar e minimizar uma possível diferença nos valores das propriedades entre amostras oriundas de etapas de liofilização diferentes, nas etapas de caracterização e estudos de estabilidade, do processo de certificação, foi feita uma seleção aleatória simples de amostras do grupo liofilizado na primeira etapa, e outra seleção aleatória do grupo liofilizado na segunda etapa. O ensaio para contagem padrão de placas [12] em amostras do candidato a MRC irradiadas e não irradiadas, foi realizado com o objetivo de comprovar a eficiência do tratamento por irradiação a 7 kGy, conforme otimizado no estudo de viabilidade. O valor médio de UFC.g⁻¹ encontrado para as amostras irradiadas do candidato a MRC foi de $1,7 \times 10^2$ e foi considerado eficiente, pois reduziu a uma quantidade residual de colônias, o que não afetará a integridade da amostra pelo processo de deterioração.

3.2. Homogeneidade

A homogeneidade do lote de candidato a MRC foi avaliada, quanto à umidade residual e às frações mássicas dos metabólitos AOZ, AMoz, AHD e SEM. Para isso, onze amostras do lote produzido foram selecionadas aleatoriamente e analisadas em duplicata para a avaliação da homogeneidade. No tratamento dos dados foi utilizada a Análise de Variâncias de Fator Único (ANOVA). Antes de prosseguir com a ANOVA, o conjunto de dados foi submetido ao Cochran para verificar a possível existência de variâncias discrepantes dos resultados dentro de um mesmo frasco. Como critério para a homogeneidade dos parâmetros avaliados foi estabelecido um limite de 10% para a incerteza relativa da homogeneidade (contribuição da heterogeneidade do material). Esse critério foi estabelecido com base em uma contribuição aceitável para incerteza alvo do candidato da MRC, que é de 15%.

A homogeneidade do teor de umidade residual foi avaliada para os mesmos frascos utilizados na avaliação da homogeneidade das frações mássicas dos metabólitos. A Figura 1 apresenta a distribuição dos resultados das duas replicatas (A e B) do estudo de homogeneidade para a umidade residual.

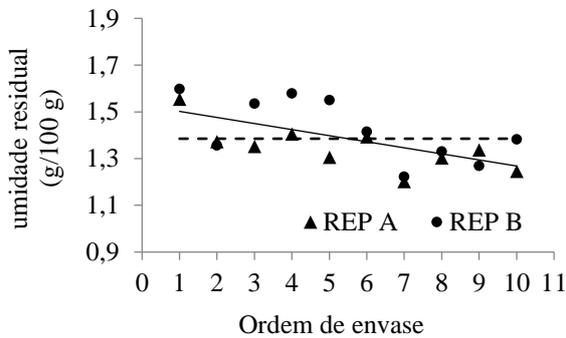


Figura 1. Distribuição dos resultados do estudo de homogeneidade para a umidade residual do candidato a MRC, em ordem de envase. A linha contínua representa a regressão linear dos dados para verificação de eventual tendência para o teor de umidade residual e, a linha tracejada no valor igual a 1,39 g/100g, representa a ausência de tendência no valor médio.

O teor médio de umidade residual do lote candidato a MRC obtido nesse estudo de homogeneidade foi de 1,39 g/100 g, com incerteza (u_{homo}) de 0,086 g/100 g calculada considerando os dados de ANOVA. A incerteza relativa, u_r (%), da homogeneidade, foi de 6,21%. Esse valor está dentro do limite estabelecido de 10%, portanto, o material foi considerado homogêneo para o teor de umidade residual. A linha contínua, que pode ser observada na Figura 1, sugeriu uma possível tendência ao longo da ordem de envase para o parâmetro umidade residual, que se comprovou através da análise de regressão linear.

A Figura 2 apresenta a distribuição dos resultados das duas replicatas (A e B) do estudo de homogeneidade para os metabólitos de nitrofuranos AOX, AMOZ, AHD e SEM, e a Tabela 1, o resumo dos resultados da avaliação estatística para esse estudo.

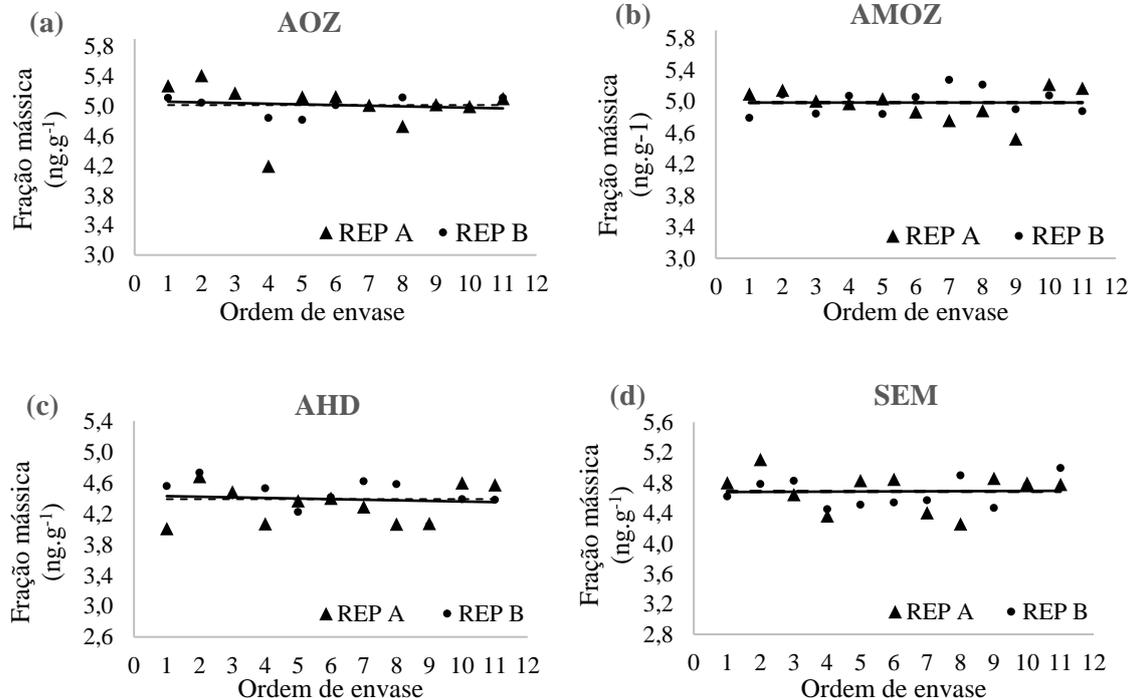


Figura 2. Distribuição dos resultados do estudo de homogeneidade para os metabólitos AOX (a), AMOZ (b), AHD (c) e SEM (d) no candidato a MRC, em ordem de envase. A linha contínua representa a regressão linear dos dados para verificação de eventual tendência, e a linha tracejada no valor médio de fração mássica, representa a ausência de tendência.

Tabela 1. Resumo dos resultados do estudo de homogeneidade para os metabólitos de nitrofuranos.

Parâmetro		AOZ	AMOZ	AHD	SEM
Média (ng.g ⁻¹)		5,01	4,98	4,39	4,69
Teste de Cochran	C _{calc}	0,50	0,32	0,37	0,41
	C _{crítico}	0,57	0,57	0,57	0,57
ANOVA	MQ _{entre} (ng.g ⁻¹) ²	0,0683	0,0268	0,0524	0,0501
	MQ _{dentro} (ng.g ⁻¹) ²	0,0367	0,0374	0,0327	0,0462
Incerteza	u _{homo} (ng.g ⁻¹)	0,13	0,09	0,10	0,04
	u _r (%)	2,51	1,79	2,25	0,94

O lote de candidato à MRC produzido foi considerado homogêneo para as frações mássicas dos metabólitos de nitrofuranos uma vez que todos os parâmetros apresentaram incertezas relativas da homogeneidade, u_r (%), inferiores a 10%, conforme estabelecido como adequado ao propósito. Apesar da tendência ao longo da ordem de envase observada para o teor de umidade residual, não foi observada essa tendência para as frações mássicas dos metabólitos, que são as propriedades de maior interesse. Como pode ser observado nas **Figuras 2 (a, b, c e d)**, as linhas contínuas estão bem próximas às linhas tracejadas, sugerindo que não há tendência, o que foi confirmado por análise de regressão linear.

3.3. Estabilidade de armazenamento

Os estudos a temperatura de armazenamento (estudos de longa duração) para o teor de umidade residual e para os metabólitos de nitrofuranos foram realizados a -20 °C por 360 dias, com temperatura de referência de -80 °C. Foram analisados dois frascos do MRC em cada dia do estudo (dias 0, 28, 81, 136, 189, 252 e 360). A análise estatística foi realizada e o critério de aceitação definido com base em análise de regressão linear. A Tabela 2 apresenta um resumo dos resultados de regressão linear para os dados desse estudo de longa duração.

Tabela 2. Resumo dos resultados de regressão linear para os dados dos estudos de estabilidade de armazenamento (-20 °C), realizados por 360 dias.

Parâmetro	b ₁	s(b ₁)	Valor de p	Incerteza	u _r (%)	Conclusão
Umidade residual	-0,0000520	0,000244	0,833	0,088 g/100 g	1,7	estável
AOZ	0,000205	0,000709	0,775	0,26 ng.g ⁻¹	5,0	estável
AMOZ	0,000183	0,000477	0,704	0,17 ng.g ⁻¹	3,4	estável
AHD	0,000267	0,000528	0,617	0,19 ng.g ⁻¹	4,3	estável
SEM	0,000492	0,000512	0,345	0,18 ng.g ⁻¹	3,8	estável

A análise dos dados por regressão linear apresentou valores de *p* maiores do que 0,05 para todos os parâmetros. Isso significa que, no teste estatístico *t* para a inclinação da curva não excedeu o valor crítico bicaudal do *t* de Student para *n* - 2 graus de liberdade e nível de confiança de 95%. Portanto, as inclinações podem ser consideradas significativamente iguais a zero ao nível de confiança de 95%, e os parâmetros avaliados considerados estáveis durante o período estudado. Os valores apresentados na Tabela 2 para a incerteza devido à instabilidade dos parâmetros estudados, foram calculados a partir do desvio padrão da inclinação [s(b₁) x *t* (dias)], e correspondem ao tempo total de estudo, de 360 dias.

3.4. Estabilidade de transporte

O estudo em condições de transporte (estudo de curta duração) foi conduzido durante um período de 63 dias e realizado conforme o planejamento isócrono, nas temperaturas de 50 °C e 20 °C. As amostras foram mantidas a -80 °C e retiradas periodicamente para as temperaturas de estudo, de forma a permanecerem 0, 5, 13, 32, 48, 54 e 63 dias nessas temperaturas até que fossem analisadas em condições de repetibilidade. A Tabela 3 apresenta o resumo dos resultados de regressão linear para os dados dos estudos de estabilidade de curta duração.

Tabela 3. Resumo dos resultados de regressão linear para os dados dos estudos de estabilidade a 20 °C e a 50 °C, realizados por 63 dias, para os metabólitos de nitrofuranos.

Parâmetro	Temp. (°C)	b ₁	s(b ₁)	Valor de p	Incerteza (ng.g ⁻¹)	u _r (%)	Conclusão
Umidade residual	20	0,00239	0,000920	0,0234	0,058 g/100 g	4,2	instável
	50	0,0102	0,00170	0,0000628	0,11 g/100 g	7,7	instável
AOZ	20	-0,00318	0,00178	0,103	0,11	2,2	estável
	50	-0,001149	0,00295	0,002	0,19	3,8	instável
AMOZ	20	-0,00399	0,00516	0,462	0,33	6,6	estável
	50	-0,00596	0,00402	0,163	0,25	5,0	estável
AHD	20	-0,00329	0,00282	0,282	0,18	4,1	estável
	50	-0,00630	0,00395	0,144	0,25	5,7	estável
SEM	20	0,000245	0,00272	0,937	0,17	3,6	estável
	50	0,000011	0,00351	1,000	0,22	4,7	estável

A umidade residual do candidato a MRC não apresentou estabilidade a 20 °C ou 50 °C por 63 dias. O metabólito AOZ também não foi estável a 50 °C, no período do estudo. Nesses casos, as propriedades apresentaram valores de *p* menores do que 0,05.

3.5. Caracterização

Para a caracterização do candidato a MRC de metabólitos de nitrofuranos em músculo de frango, foi utilizado um “único procedimento de medição de referência em um único laboratório”, que é umas das abordagens de caracterização apresentadas na ISO 17034 [13].

A técnica CLAE-EM/EM utilizando o método de Espectrometria de Massas por Diluição Isotópica (EMDI) foi empregada, e foram analisados 3 frascos, sendo 2 alíquotas de cada frasco. A Tabela 4 apresenta os resultados médios da caracterização, e as incertezas-padrão e expandida, obtidos pelo Inmetro para a caracterização de cada valor de propriedade do candidato a MRC.

Tabela 4. Resultados por replicata, resultado médio, e incertezas-padrão e expandida, obtidos pelo Inmetro para a caracterização do candidato a MRC.

Frasco	Replicata	AOZ (ng.g ⁻¹)	AMOZ (ng.g ⁻¹)	AHD (ng.g ⁻¹)	SEM (ng.g ⁻¹)
média		5,40	5,49	5,08	6,01
Incerteza-padrão (u _{car})		0,28	0,23	0,45	0,20
incerteza expandida (U _{car} , k=2)		0,56	0,45	0,90	0,40

A caracterização do candidato a MRC foi realizada com subsídio dos resultados de uma comparação interlaboratorial (CI), que foi conduzida para reforçar a confiabilidade ao valor atribuído pelo Inmetro cujos resultados podem ser consultados em <https://www.gov.br/inmetro/pt-br/assuntos/metrologia-cientifica/servicos/ensaios-de-proficiencia/alimentos-e-bebidas/frango>.

3.6. Atribuição dos valores de propriedade e das suas incertezas

Apenas as frações mássicas dos metabólitos de nitrofuranos foram certificadas. O teor de umidade residual no candidato a MRC não apresentou boa estabilidade a 20°C e a 50°C, além da tendência observada ao longo da ordem de envase que foi posteriormente atribuída à diferença entre os grupos de frascos liofilizados em bateladas diferentes. Contudo, esse comportamento observado para a umidade residual não impactou os resultados para os metabólitos de nitrofuranos.

No estudo de curta duração, o metabólito AOZ apresentou instabilidade a 50 °C e, por esse motivo, a temperatura de transporte teria que ser abaixo de 20°C. Contudo, decidiu-se por transportar o material mantendo-o abaixo da temperatura de armazenamento (- 20 °C), o que é viável pela utilização de gelo seco (- 80°C). Dessa forma, a equação para cálculo das incertezas dos valores das propriedades do MRC (u_{MRC}), considerou a contribuição apenas das incertezas da caracterização (u_{car}), da homogeneidade (u_{homo}) e da estabilidade de armazenamento (u_{est}), conforme as equações 1 e 2.

$$u_{MRC} = \sqrt{u_{homo}^2 + u_{est}^2 + u_{car}^2} \quad (1) \quad U_{MRC} = k \times u_{MRC} \quad (2)$$

Após a combinação das fontes de incertezas conforme as equações apresentadas, os valores atribuídos para as frações mássicas dos metabólitos **AOZ**, **AMAZ**, **AHD** e **SEM**, com suas respectivas incertezas expandidas ($k=2$) foram respectivamente: **(5,4 ± 1,2) ng.g⁻¹**, **(5,49 ± 0,85) ng.g⁻¹**, **(5,1 ± 1,2) ng.g⁻¹** e **(6,01 ± 0,85) ng.g⁻¹**.

Como uma medida conservadora, a incerteza da estabilidade de longa duração contempla um tempo extrapolado para 730 dias (dois anos). Porém, o tempo de validade declarado no certificado é de 600 dias a partir da venda.

4. Conclusões

O lote de candidato a MRC contendo 255 frascos foi produzido contendo os metabólitos AOZ, AMAZ, AHD e SEM. Os graus de heterogeneidade dos metabólitos alcançaram valores na faixa de 0,94% a 2,66%, abaixo do máximo estabelecido de 10%. Foi observada uma tendência ao longo na ordem de envase para a umidade residual devido supostamente ao processo de liofilização em duas etapas, contudo, esse comportamento não influenciou as frações mássicas dos metabólitos. Todas as propriedades estudadas apresentaram estabilidade em condições de armazenamento a -20 °C por 360 dias. Os estudos de curta duração revelaram a instabilidade da umidade residual a 20 °C e a 50 °C, e do metabólito AOZ a 50 °C, por 63 dias. Os demais metabólitos apresentaram estabilidade a 20 °C e a 50 °C. Foi definido que o material deverá ser transportado abaixo de -20 °C, em gelo seco. Quanto ao teor de umidade residual, decidiu-se pela não certificação desse parâmetro como uma medida conservadora.

O MRC desenvolvido para metabólitos de nitrofuranos em frango está disponível para venda através do site http://www.inmetro.gov.br/metcientifica/formularios/form_mrc.asp. A utilização dos MRC consiste em uma ferramenta muito importante para demonstrar a confiabilidade e rastreabilidade metrológica dos resultados, auxiliando também no processo de acreditação e manutenção de acreditação pela norma ISO 17025.

Referências

- [1] De Bièvre P, Dybkaer R, Fajgelj A, Hibbert D B. Metrological traceability of measurement results in chemistry: Concepts and implementation. Pure Appl. Chem., 2011, 83, 1873.
- [2] Frota M N, Müller T H, Semerjian H G. Metrology in chemistry: Proceedings of the First Interamerican Workshop on Metrology in Chemistry, 1997, Rio de Janeiro.
- [3] European Commission. Council Regulation 2901/93 of 18 October 1993. Official Journal of the European Communities, L264, 1993.
- [4] Brasil: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 9 de 27 de junho de 2003. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2003.

- [5] Hoogenboom L A P, Van Kammen M, Berghmans M C J. The use of pig hepatocytes to study the nature of protein-bound metabolites of furazolidone: a new analytical method for their detection. *Food Chem. Toxicol.*, 1991, 29(5): 321-328.
- [6] Zúniga N O C. Desenvolvimento de criação experimental de frango de corte para viabilização de estudo de metabolização de nitrofuranos. 2010. 211 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química. Rio de Janeiro, RJ, 2010.
- [7] Violante F G M, Rosas C O, Guimarães E F, Vital H C, Zúniga N O C, Aquino Neto F R. Feasibility study for the development of a certified reference material of nitrofurantoin metabolites in chicken breast muscle from incurred samples. *Measurement*, 2018, 129, p. 368–374.
- [8] Violante F G M, Wollinger W, Guimarães E F, Garrido B C, Aquino Neto F R. Use of quantitative ^1H and ^{13}C NMR to determine the purity of organic compound reference materials: a case study of standards for nitrofurantoin metabolites. *Anal. Bioanal. Chem.* 2021, 413(6):1701-1714.
- [9] ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. ABNT ISO GUIA 35: Materiais de referência – Princípios gerais e estatísticos para certificação. Rio de Janeiro, 2012, 73 p.
- [10] JCGM. Avaliação dos dados de medição: guia para a expressão de incerteza de medição (GUM 100:2008). Rio de Janeiro: Inmetro, 2008, 126 p.
- [11] CCQM Guidance note: Estimation of a consensus KCRV and associated degrees of equivalence. Version 10, 2013.
- [12] Maturin L. & Peeler J T Chapter 3: Aerobic Plate Count, In: Food and Drug Administration (FDA), *Bacteriological Analytical Manual Online*, 8. ed., Silver Spring, Berlin, 1998.
- [13] ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. ABNT NBR ISO 17034:2017: Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência. Rio de Janeiro, 2017, 27 p.