

TC
repassa
OK

**PRODUÇÃO TÉCNICO CIENTÍFICA
DO IPEN
DEVOLVER NO BALCÃO DE
EMPRÉSTIMO**

*METROLOGIA 2003 – Metrology for the Quality of Life
Brazilian Society for Metrology (SBM)
September 01–05, 2003, Recife, Pernambuco - BRAZIL*

**ESTUDO INTERLABORATORIAL: MATERIAL DE REFERÊNCIA
SECUNDÁRIO FÍGADO BOVINO**

V.A. Maihara¹, D.I.T. Fávoro¹, M.B.A. Vasconcellos¹, I.M. Sato², V.L.R. Salvador²; D.M.B. Mantovani³, M.A. Morgano³, F.D. Maio⁴, C.S. Kira⁴, M.I. Cantagallo², C. Sisti², E.S.K. Dantas², H.M. Shihomatsu².

- 1- Laboratório de Análise por Ativação Neutrônica -LAN -IPEN-CNEN/SP
- 2- Centro de Química e Meio Ambiente – CQMA - IPEN-CNEN/SP
- 3- Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada - ITAL-Campinas/SP
- 4- Divisão de Bromatologia e Química- Instituto Adolfo Lutz-SP

Resumo: A finalidade do presente trabalho foi preparar um material de referência secundário, fígado bovino, para ser usado em estudos nutricionais. Participaram do estudo colaborativo seis laboratórios de três instituições de pesquisas do estado de São Paulo. Sete técnicas analíticas foram empregadas para determinar a concentração dos elementos Ca, Cd, Cl, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, P, Pb, Rb, S, Se e Zn na amostra de fígado bovino e em dois materiais de referência certificados Bovine Liver (SRM 1577b) e Typical Diet (SRM 1548a). Os resultados obtidos foram avaliados conforme procedimentos utilizados pela AIEA em seus exercícios de intercomparação e testes de proficiência. A avaliação estatística dos dados revelou resultados concordantes para 13 elementos (Cl, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, P, Rb, S, Se and Zn), e resultados insatisfatórios para Ca, Cd, Co e Pb. O material de fígado bovino mostrou-se adequado para ser utilizado como material de referência secundário para um grande número de elementos nutricionalmente importantes.

Palavras-chave: material de referência secundário; exercício interlaboratorial; análise de elemento traço .

1. INTRODUÇÃO:

O uso crescente de técnicas analíticas sensíveis tem levado a uma necessidade cada vez maior de se utilizar materiais de referência, de matrizes semelhantes às amostras em estudo, para verificar a exatidão e precisão das metodologias empregadas. Os materiais de referência são indispensáveis para a confiabilidade dos resultados de análise e na implantação de sistemas de qualidade nos laboratórios analíticos (1-3).

Embora seja possível adquirir um grande número de materiais de referência de vários fornecedores, seus custos são ainda muito elevados por se tratar de material importado, o que faz com que a maioria dos laboratórios brasileiros não possam utilizá-los rotineiramente. Em vista disso, no presente trabalho preparou-se uma amostra de

fígado bovino, para ser utilizado como um material de referência secundário ("in-house") na análise de materiais biológicos como alimentos e dietas. Este estudo fez parte de um projeto de pesquisa Fapesp, com a participação de laboratórios nacionais com experiência de análise nestes tipos de materiais.

Neste estudo colaborativo, foram distribuídos dois materiais de referência (MR) certificados do National Institute of Standard & Technology (NIST), SRM 1548a Typical Diet e NIST 1577b Bovine Liver, juntamente com a amostra de fígado bovino, para avaliar as metodologias empregadas. Um total de seis laboratórios de três institutos de pesquisas (IPEN, IAL e ITAL) participaram deste exercício de intercomparação.

As amostras foram analisadas pelas seguintes técnicas analíticas: Análise por ativação neutrônica (INAA), Espectrometria de emissão atômica com plasma de argônio (ICP OES), Fluorescência de raios-X com dispersão de comprimento de onda (WD-XRFS), Voltametria de redissolução anódica por pulso diferencial (DP ASV), Espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS), Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (ETAAS) e Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

A primeira etapa da avaliação dos resultados consistiu na aplicação de um teste de proficiência, onde foram avaliados os resultados de materiais de referência, que foram analisados como amostras desconhecidas. Os resultados foram avaliados conforme os procedimentos utilizados para os exercícios de comparação interlaboratorial na preparação e certificação de novos materiais de referência da AIEA (Agência Internacional de Energia Atômica)(4). Na segunda etapa, os resultados obtidos para a amostra de fígado bovino foram avaliados pelo critério de zscore (5), onde o valor médio de concentração final, calculado para cada elemento foi considerado como valor "target".

9189

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Preparação da Amostra de Fígado Bovino :

Cerca de 15 kg de fígado bovino, adquirido em mercado local da cidade de São Paulo, foram homogeneizados num moinho industrial de facas. Este moinho foi previamente lavado e enxaguado com água deionizada e destilada, antes de sua utilização para a moagem da amostra.

Após a etapa de moagem, a amostra foi congelada e em seguida liofilizada em um liofilizador marca Atlas Mark, com capacidade para 500 L, na indústria Liotécnica de alimentos liofilizados. Finalmente, o fígado liofilizado foi homogeneizado num multiprocessador doméstico adaptado com facas de titânio, para evitar contaminação por metais. Em seguida, a amostra foi armazenada em sacos de polietileno desmineralizados (Whirl-Paki) e conservada em freezer, antes de ser distribuída para os laboratórios para análise.

Foram feitos testes de homogeneidade em 5 lotes diferentes da amostra utilizando-se a técnica de INAA, por meio da determinação dos elementos Na, K, Fe e Zn (6). Os resultados obtidos permitiram concluir que a amostra de fígado bovino, preparada conforme descrição acima, se encontrava homogênea e adequada para a análise.

2.2. Teste de proficiência - 1ª etapa:

Inicialmente, para cada material de referência (MR) analisado, foi aplicado o Teste de Dixon (7) para a eliminação de valores dispersos (outliers) nos resultados de análise obtidos pelas diferentes técnicas analíticas. Em seguida, foram calculados a média e o desvio padrão da concentração dos elementos determinados por cada um dos laboratórios. Finalmente, foi calculado o valor de zscore (5) para os elementos com valores de concentração certificados, conforme a seguinte relação:

$$z_{score} = \frac{Valor_{lab.} - Valor_{cert.}}{\sigma} \quad (1)$$

onde: v_{lab} é o valor médio da concentração do elemento obtido pelo laboratório

v_{cert} é o valor certificado de concentração para o elemento no MR

σ é a incerteza do valor certificado para o elemento no MR

Foi adotado este critério, considerando como resultado satisfatório, os valores de $|z| < 3$, o que significa que os resultados da amostra de referência (MR) devem estar no intervalo de confiança de 95% do valor verdadeiro.

Critério de Exatidão: Em seguida, foi realizada a avaliação da exatidão dos resultados analíticos obtidos, adotando-se o teste do μ -estatístico (4), calculado segundo a equação:

$$\mu_{estatístico} = \frac{Valor_{cert.} - Valor_{lab.}}{\sqrt{\sigma^2 + DP_{lab.}^2}} \quad (2)$$

onde: $DP_{lab.}$ desvio padrão da média obtida pelo laboratório

O valor de $\mu_{estat.}$ calculado foi comparado com valores críticos na Tabela de t de Student (7), para determinar se o valor reportado diferia significativamente do valor certificado, a um nível de significância de 95%. Para esta avaliação, estabeleceu-se a condição de $\mu < 2,58$, para que o valor médio de concentração, para cada elemento determinado, pudesse ser considerado aceitável.

Critério de Precisão: Os resultados foram considerados satisfatórios em relação à precisão, se a seguinte condição fosse mantida:

$$\sqrt{\left(\frac{\sigma}{Valor_{cert.}}\right)^2 + \left(\frac{DP_{lab.}}{Valor_{lab.}}\right)^2} * 100\% \leq \frac{\sigma}{0,3} \% \quad (3)$$

Portanto, para que os resultados obtidos para cada elemento determinados na análise dos materiais de referência fossem considerados satisfatórios ou aprovados, deveriam ser aceitos tanto pelo critério de exatidão quanto pelo critério de precisão.

2.3. Análise do Material Fígado Bovino - 2ª etapa

Foi aplicado o teste de Dixon, para a eliminação dos outliers, para cada conjunto de médias obtidas dos elementos individuais em cada laboratório. Após a eliminação dos "outliers", foram calculados novamente a média e o desvio padrão da concentração dos elementos determinados, para cada laboratório. Os resultados dos laboratórios foram avaliados aplicando-se o teste zscore, onde o valor médio de concentração final calculado para cada elemento, foi considerado como valor "target" e o valor de S_L , estimado como:

$$S_L = [\sum (Valor_{lab} - Valor_{médio})^2 / n - 1]^{1/2} \quad (4)$$

$$z-score = (Valor_{lab} - Valor_{target}) / S_L \quad (5)$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Foram obtidos valores médios para 17 elementos, por 6 diferentes técnicas analíticas nos três materiais distribuídos. Para cada elemento foram realizadas de 5 a 10 determinações individuais.

Os resultados obtidos da análise do material de referência NIST 1577b Bovine Liver, obtidos pelas diferentes técnicas analíticas, pelo critério do Zscore, permitiu concluir que todos os elementos analisados se encontraram dentro do intervalo de (+3, -3), com exceção dos elementos cálcio determinado por WD-XRFS, chumbo determinado por DP ASV e potássio, determinado por todas as técnicas analíticas. Já para o material Typical Diet, praticamente

todos os elementos analisados se encontraram dentro do intervalo de (+3,-3), com exceção dos elementos potássio e manganês determinados por INAA.

Em geral, todos os laboratórios foram aprovados nos critérios de exatidão e precisão para todos os elementos determinados no material NIST 1577b Bovine Liver (Tabela 1). O elemento potássio foi aprovado pelo critério de exatidão e rejeitado pelo critério de precisão, para todas as técnicas analíticas. Novamente, os elementos cálcio e chumbo, determinados por WD-XRFS e DP-ASV, respectivamente, foram rejeitados nos critérios de exatidão e precisão. O fato do elemento potássio não ter sido aprovado pelos dois critérios, no material NIST1577b, para todas as técnicas analíticas utilizadas, pode ser atribuído ao valor do desvio padrão pequeno (DP relativo = 0,2%) associado ao seu valor certificado ($0,994 \pm 0,002 \text{ mg kg}^{-1}$).

Para o material NIST 1548a Typical Diet (Tabela 2) todos os laboratórios foram aprovados nos critérios de exatidão e precisão para maioria dos elementos determinados. O elemento cádmio, determinado pela técnica de DP-ASV, foi rejeitado no critério de precisão. Na análise do material Typical Diet, praticamente todas as técnicas foram aprovadas para a análise de potássio, com exceção da INAA. O valor do desvio padrão para esse elemento é: DP relativo = 1,8%, bem maior do que para o material de referência Bovine Liver.

A verificação dos critérios de Zscore, de exatidão e de precisão, na análise dos materiais de referência, demonstrou a validade das metodologias empregadas pelos laboratórios participantes na determinação dos elementos de interesse, com exceções apontadas na análise do material Bovine Liver.

Os resultados de concentração final com os valores de desvio padrão e o intervalo de confiança determinados para os elementos presentes na amostra de Fígado Bovino são apresentados na Tabela 3.

De um modo geral, pode-se considerar que a precisão dos resultados foi muito boa. Os valores de desvio padrão relativo estiveram ao redor de 4%, para a maioria dos elementos, com exceção dos valores obtidos na determinação de Cd (26%) e Pb (16,5%) por DP-AVS, e de Cd (16%) obtido por ICP-OES (laboratório 1), que embora acima de 10%, podem ser considerados satisfatórios uma vez que esses elementos estão presentes em baixas concentrações ($\mu\text{g kg}^{-1}$). Os elementos Pb, S e Se foram determinados por somente uma técnica analítica DP-AVS, WD-XRFS e INAA, respectivamente.

Foi aplicado o teste de z-score para cada elemento, considerando o valor "target" como a média final dos resultados e foi observado que todos os laboratórios apresentaram valores médios de concentração considerados satisfatórios, com valores entre $-2 < z < 2$, como mostrado na Figuras 1.

Tabela 3: Valores de concentração final dos elementos determinados no fígado bovino

Elemento	Fígado Bovino		
	Média \pm DP (valor target)	DP rel %	Intervalo de confiança
Ca mg Kg^{-1}	136 ± 22	16	82 - 190
Cd mg Kg^{-1}	$0,09 \pm 0,03$	33	0,046 - 0,132
Cl %	$0,2970 \pm 0,0007$	0,2	0,2911 - 0,3029
Co mg Kg^{-1}	$0,34 \pm 0,08$	24	0,130 - 0,548
Cu mg Kg^{-1}	209 ± 16	7,7	194 - 224
Fe mg Kg^{-1}	227 ± 16	7,0	202 - 251
K %	$1,11 \pm 0,04$	3,6	1,04 - 1,18
Mg mg Kg^{-1}	612 ± 27	4,4	570 - 654
Mn mg Kg^{-1}	$9,1 \pm 1,3$	14	7,4 - 10,7
Mo mg Kg^{-1}	$3,6 \pm 0,2$	5,6	2,18 - 4,98
Na %	$0,25 \pm 0,02$	8,0	0,211 - 0,283
P %	$1,20 \pm 0,04$	3,3	1,09 - 1,31
Pb mg Kg^{-1}	$0,31 \pm 0,05$	16	-
Rb mg Kg^{-1}	$37,6 \pm 0,5$	1,3	33,1 - 42,0
S %	$0,768 \pm 0,009$	1,2	-
Se mg Kg^{-1}	$0,311 \pm 0,008$	2,6	-
Zn mg Kg^{-1}	139 ± 8	5,8	131 - 147

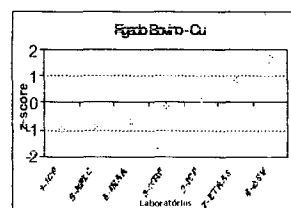
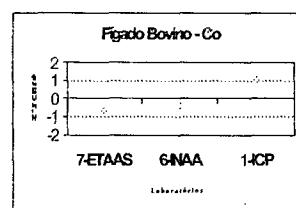
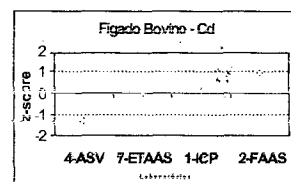
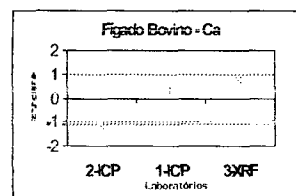


Tabela 1: Avaliação dos resultados obtidos para o material NIST 1577b Bovine Liver

Elemento	Técnica - Lab ^a	Média ± DP ^b mg kg ⁻¹	Valor certificado	Monostático	Critério de Aceitação ^c	
					Exatidão	Precisão
Ca	ICP OES -1	120 ± 4	116 ± 4	0,661	aprovado	aprovado
	ICP OES -2	128 ± 5		1,75	aprovado	aprovado
	FRX -3	135,3 ± 0,7		4,75	rejeitado	aprovado
Cd	ICP OES -1	0,47 ± 0,06	0,50 ± 0,03	0,447	aprovado	aprovado
	FGAAS -2	0,51 ± 0,02		0,277	aprovado	aprovado
	DP ASV -4	0,48 ± 0,05		0,343	aprovado	aprovado
	FGAAS -2	0,48 ± 0,06		0,277	aprovado	aprovado
Cl	INAA -6	0,27 ± 0,01		0,686	aprovado	aprovado
Co	ICP OES -1	0,23 ± 0,05	(0,25)	-	-	-
	INAA -6	0,25 ± 0,02		-	-	-
Cu	ICP OES -1	158 ± 10	160 ± 8	0,156	aprovado	aprovado
	ICP OES -2	159 ± 4		0,112	aprovado	aprovado
	FRX -3	162,0 ± 0,9		0,248	aprovado	aprovado
	DP ASV -4	166 ± 5		0,636	aprovado	aprovado
	HPLC -5	168 ± 2		0,970	aprovado	aprovado
	INAA -6	154 ± 7		0,564	aprovado	aprovado
	FGAAS -7	183 ± 13			aprovado	aprovado
Fe	ICP OES -1	178 ± 5	184 ± 15	0,379	aprovado	aprovado
	ICP OES -2	174 ± 10		0,555	aprovado	aprovado
	FRX -3	185 ± 2		0,066	aprovado	aprovado
	INAA -6	171 ± 21		0,504	aprovado	aprovado
K	ICP OES -1	0,917 ± 0,033	0,994 ± 0,002	2,33	aprovado	rejeitado
	ICP OES -2	0,959 ± 0,052		0,673	aprovado	rejeitado
	FRX -3	0,974 ± 0,009		2,17	rejeitado	rejeitado
	INAA -6	1,012 ± 0,032		0,561	rejeitado	rejeitado
Mg	ICP OES -1	577 ± 29	601 ± 28	0,595	aprovado	aprovado
	ICP OES -2	573 ± 15		0,881	aprovado	aprovado
	FRX -3	618 ± 10		0,572	aprovado	aprovado
	INAA -6	568 ± 33		0,763	aprovado	aprovado
Mn	ICP OES -1	9,91 ± 0,73	10,5 ± 1,7	0,319	aprovado	aprovado
	ICP OES -2	9,82 ± 0,31		0,394	aprovado	aprovado
	FRX -3	11,5 ± 0,6		0,555	aprovado	aprovado
	HPLC -5	10,1 ± 1,0		0,203	aprovado	aprovado
	INAA -6	11,1 ± 0,5		0,339	aprovado	aprovado
Mo	ICP OES -1	3,5 ± 0,2	3,5 ± 0,3	0,343	aprovado	aprovado
	INAA -6	3,7 ± 0,5		0,343	aprovado	aprovado
Na	ICP OES -1	0,226 ± 0,016	0,242 ± 0,006	0,936	aprovado	aprovado
	ICP OES -2	0,238 ± 0,006		0,471	aprovado	aprovado
	FRX -3	0,241 ± 0,012		0,075	aprovado	aprovado
	INAA -6	0,248 ± 0,010		0,514	aprovado	aprovado
P	ICP OES -1	1,12 ± 0,03	1,10 ± 0,03	0,471	aprovado	aprovado
	ICP OES -2	1,05 ± 0,05		0,857	aprovado	aprovado
	FRX -3	1,148 ± 0,008		1,55	aprovado	aprovado
Pb	DP ASV -4	0,223 ± 0,031		3,01	rejeitado	rejeitado
Rb	FRX -3	12,6 ± 0,2		0,984	aprovado	aprovado
	INAA -6	11,9 ± 1,1		1,16	aprovado	aprovado
S	FRX -3	0,798 ± 0,003		1,94	aprovado	aprovado
Se	INAA -6	0,676 ± 0,029		0,810	aprovado	aprovado
Zn	ICP OES -1	120 ± 5	127 ± 16	0,418	aprovado	aprovado
	ICP OES -2	119 ± 5		0,477	aprovado	aprovado
	FRX -3	124 ± 2		0,477	aprovado	aprovado
	DP ASV -4	132 ± 2		0,310	aprovado	aprovado
	HPLC -5	128 ± 2		0,062	aprovado	aprovado
	INAA -6	112 ± 11		0,773	aprovado	aprovado

Tabela 2: Avaliação dos resultados obtidos para o material NIST 1548a Typical Diet.

Elemento	Técnica - Lab ^a	Média ± DP ^b mg kg ⁻¹	Valor certificado	μestatístico	Critério de Aceitação ^c	
					Exatidão	Precisão
Ca	ICP OES -1	1973 ± 118	1967 ± 113	0,037	aprovado	aprovado
	FRX-3	1988 ± 24		0,182	aprovado	aprovado
	INAA -6	1908 ± 120		0,358	aprovado	aprovado
Cd	ICP OES -1	0,035 ± 0,001	0,035 ± 0,0015	0,000	aprovado	aprovado
	DP ASV -4	0,031 ± 0,008		0,491	aprovado	rejeitado
	FGASS-7	0,036 ± 0,002			aprovado	aprovado
Cl	FRX-3	12157 ± 165	-	0,201	aprovado	aprovado
	INAA -6	11765 ± 957		0,307	aprovado	aprovado
Co	ICP OES -1	0,0240 ± 0,0057	-	-	-	-
	INAA -6	0,0255 ± 0,0043		-	-	-
Cu	ICP OES -1	2,42 ± 0,12	2,32 ± 0,16	1,00	aprovado	aprovado
	FRX-3	2,45 ± 0,23		0,464	aprovado	aprovado
	DP ASV -4	2,15 ± 0,20		0,664	aprovado	aprovado
	HPLC-5	2,31 ± 0,05		0,060	aprovado	aprovado
Fe	ICP OES -1	31,2 ± 1,6	35,3 ± 3,77	1,00	aprovado	aprovado
	FRX-3	33,5 ± 3,6		0,345	aprovado	aprovado
	INAA -6	29,9 ± 3,1		1,11	aprovado	aprovado
K	ICP OES -1	6629 ± 593	6970 ± 125	0,563	aprovado	rejeitado
	FRX-3	6927 ± 100		0,269	aprovado	rejeitado
	INAA -6	6136 ± 517		1,57	aprovado	rejeitado
Mg	ICP OES -1	539 ± 21	580 ± 26,7	1,21	aprovado	aprovado
	FRX-3	612 ± 18		0,994	aprovado	aprovado
	INAA -6	550 ± 36		0,669	aprovado	aprovado
Mn	ICP OES -1	5,44 ± 0,29	5,75 ± 0,17	0,922	aprovado	aprovado
	FRX-3	5,66 ± 0,22		0,324	aprovado	aprovado
	HPLC-5	5,59 ± 0,13		0,748	aprovado	aprovado
	INAA -6	6,58 ± 0,57		1,395	aprovado	aprovado
Mo	ICP OES -1	0,26 ± 0,01	0,260 ± 0,017	0,000	aprovado	aprovado
Na	ICP OES -1	7700 ± 205	8132 ± 942	0,448	aprovado	aprovado
	FRX-3	8173 ± 96		0,043	aprovado	aprovado
	INAA -6	8260 ± 557		0,117	aprovado	aprovado
P	ICP OES -1	3316 ± 53	3486 ± 245	0,678	aprovado	aprovado
	FRX-3	3473 ± 103		0,049	aprovado	aprovado
Rb	FRX-3	5,33 ± 0,28	-	-	-	-
	INAA -6	3,57 ± 0,35		-	-	-
S	ICP OES -1	2006 ± 200	1928 ± 150	0,312	aprovado	aprovado
	FRX-3	2056 ± 46		0,816	aprovado	aprovado
Se	ICP-1	0,274 ± 0,033	0,245 ± 0,028	0,670	aprovado	aprovado
	INAA -6	0,225 ± 0,013		0,648	aprovado	aprovado
Zn	ICP OES -1	23,7 ± 0,5	24,6 ± 1,79	0,484	aprovado	aprovado
	FRX-3	25,5 ± 0,2		0,500	aprovado	aprovado
	DP ASV -4	24,1 ± 1,6		0,208	aprovado	aprovado
	HPLC-5	23,8 ± 0,3		0,441	aprovado	aprovado
	INAA -6	20,6 ± 1,0		1,95	aprovado	aprovado

a: técnica analítica e número do laboratório

b: média e desvio padrão do elemento calculada após eliminação de outliers

c: critério de aceitação de acordo com os cálculos obtidos a partir das equações (2) e (3)

IPEN/CNEN-SP
BIBLIOTECA
"TEREZINE ARANTES FERRAZ"

Formulário de envio de trabalhos produzidos pelos pesquisadores do IPEN para inclusão na
Produção Técnico Científica

AUTOR(ES) DO TRABALHO:

Vera A Maihara e outros

LOTAÇÃO: CQMA

RAMAL: 9338

TIPO DE REGISTRO:

art. / periód.:

Publ. IPEN

resumo

cap. de livro

Art. conf

outros

(folheto, relatório, etc...)

TITULO DO TRABALHO:

Estudo Interlaboratorial: Material de Referência Secundário Fígado Bovino

APRESENTADO EM: (informar os dados completos - no caso de artigos de conf., informar o título
da conferência, local, data, organizador, etc..)

III Congresso Brasileiro de Metrologia - 2003, Recife-PE, 01 a 05 de setembro de 2003

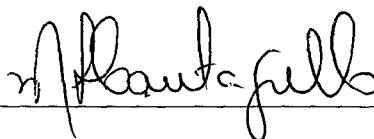
Sociedade Brasileira de Metrologia

PALAVRAS CHAVES PARA IDENTIFICAR O TRABALHO:

Material de referência secundário, exercício interlaboratorial.

Análise de elemento traço

ASSINATURA:



DATA: 10/09/2003



11 SET 2003