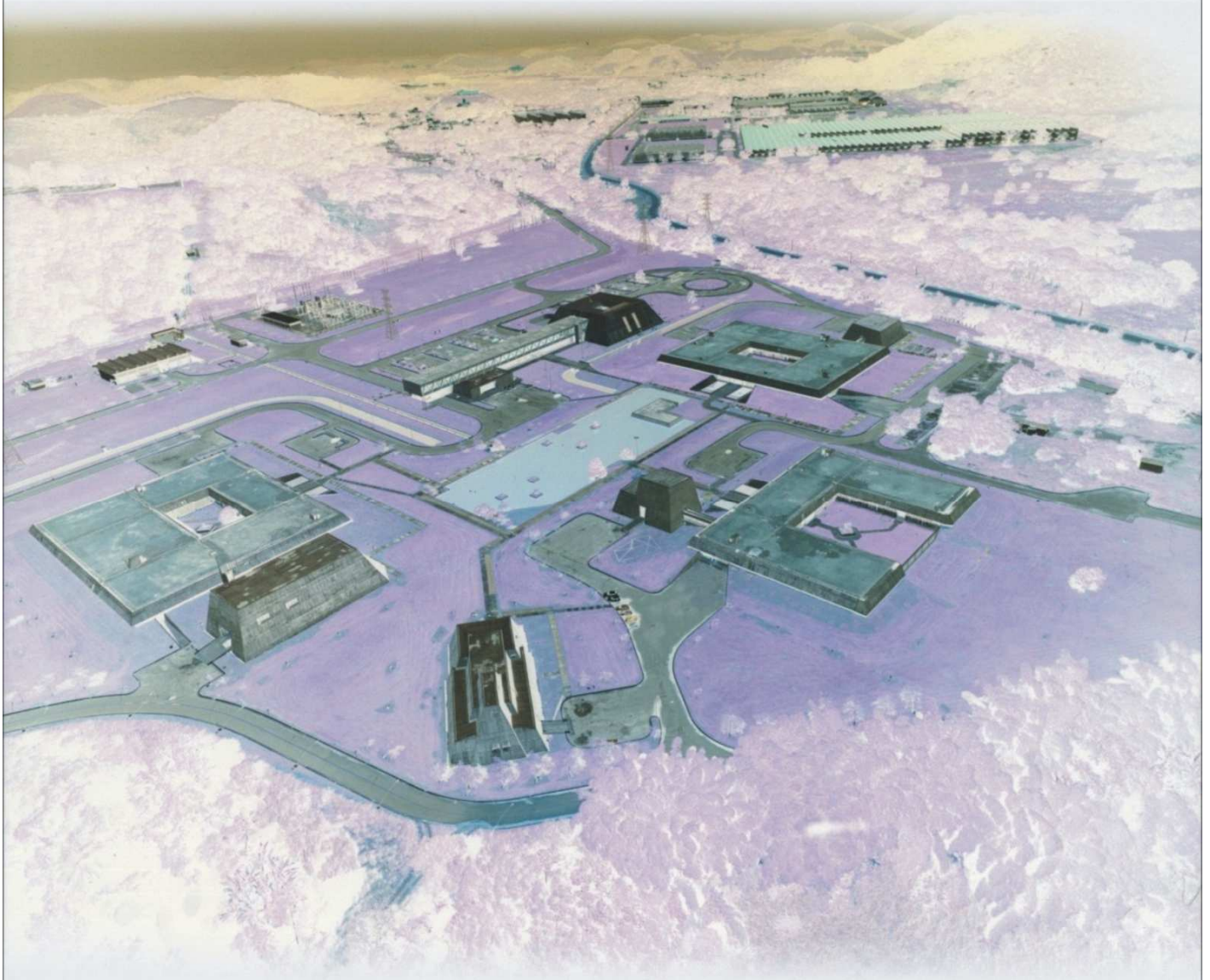


**Relatório Final da Comparação
Interlaboratorial para Caracterizar um
Candidato a Material de Referência Certificado
de Metabólitos de Nitrofuranos em Frango**



Inmetro
Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

PEP-Inmetro

Programa de Ensaios de Proficiência do Inmetro

COMPARAÇÃO INTERLABORATORIAL PARA CARACTERIZAR UM CANDIDATO A MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO DE METABÓLITOS DE NITROFURANOS EM FRANGO

Período de realização: 01/11/18 a 07/08/19

RELATÓRIO FINAL Nº 006/2019

ORGANIZAÇÃO PROMOTORA DO ENSAIO DE PROFICIÊNCIA



Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - Inmetro.

Diretoria de Metrologia Científica e Tecnologia - Dimci

Endereço: Av. Nossa Senhora das Graças, 50 - Xerém - Duque de Caxias

RJ - Brasil - CEP: 25250-020

E-mail para contato: pep-inmetro@inmetro.gov.br

COMITÊ DE ORGANIZAÇÃO

Adelcio Rena Lemos (Inmetro/Dimci/GT-PEP)

Bruno Carius Garrido (Inmetro/Dimci/Dimqt)

Carla Thereza Coelho (Inmetro/Dimci/GT-PEP)

Eliane Cristina Pires do Rego (Inmetro/Dimci/Dimqt)

Fernando Gustavo Marques Violante (Inmetro/Dimci/Dimqt)

Jose Ricardo Bardellini da Silva (Inmetro/Dimci/GT-PEP) - Coordenador PEP-Inmetro

Lucas Dias Barros (Inmetro/Dimci/GT-PEP)*

Paulo Roberto da Fonseca Santos (Inmetro/Dimci/GT-PEP)

Valnei Smarçaro da Cunha (Inmetro/Dimci/Dimqt)

*Sob supervisão

COMITÊ TÉCNICO

Eliane Cristina Pires do Rego (Inmetro/Dimci/Dimqt)

Fernando Gustavo Marques Violante (Inmetro/Dimci/Dimqt)

Janaína Marques Rodrigues (Inmetro/Dimci/Dimqt)

Evelyn de Freitas Guimarães (Inmetro/Dimci/Dimqt)

Gabriel Fonseca Sarmanho (Inmetro/Dimci/Dimqt)

SUMÁRIO

1. Introdução	3
2. Materiais e Métodos	4
2.1. Preparação dos Itens de Comparação	4
2.2. Homogeneidade do Item da CI.....	6
2.3. Estabilidade do Item da CI	7
2.4. Caracterização do Item da Comparação pelo Inmetro	9
2.5. Orientações aos participantes.....	10
2.6. Tratamento dos resultados dos participantes	11
2.7. Análise Estatística dos Resultados dos Participantes	12
3. Resultados e Discussão	13
3.1. Caracterização realizada pelo Inmetro	13
3.2. Resultados dos Participantes	14
3.3. Valores de consenso	20
4. Confidencialidade	25
5. Conclusões	26
6. Participantes	27
7. Referências Bibliográficas	27

1. Introdução

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 [1], em que as substâncias cuja utilização não é permitida estão listadas. No Brasil, a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos nitrofuranos e dos produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos foi proibida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) através da Instrução Normativa nº. 09 de 27 de junho 2003 [2]. Quando administrados, os nitrofuranos são facilmente metabolizados, e seus principais metabolitos são: 3-amino-2-oxazolidinona (AOZ), 3-amino-5-morfolinometil-2-oxazolidinona (AMOZ), semicarbazida (SEM) e 1-aminoidantoína (AHD). Assim, estes metabolitos são utilizados como marcadores para fins de detecção no monitoramento de resíduos destes compostos em produtos de origem animal [3].

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). Cabe destacar ainda o papel importante dos MRC diante dos problemas de restrições comerciais de alguns países, como as medidas adotadas pela União Europeia com a Diretiva 96/23/CE [4], para controle de resíduos na área de drogas veterinárias em produtos de origem animal. Em abril de 2002 uma nova metodologia de testes detectou a presença de resíduos de nitrofuranos em lotes de carne avícola exportada pelo Brasil, proibido na UE. Estimativas indicavam um prejuízo da ordem de US\$ 40 milhões por ano só com os controles adicionais [5]. Segundo dados do *United States Department of Agriculture* (USDA), em 2017 o Brasil passou a ser o segundo maior produtor mundial de carne de frango e se manteve como maior exportador.

Diante desse cenário, é necessário manter e aprimorar medidas que garantam a qualidade desse produto, visto que o seu embargo por parte de outros países comprometeria a balança comercial brasileira. Para que se possa realizar o controle, é preciso utilizar métodos de análise que sejam aplicáveis e que atendam às determinações nacionais e internacionais. O uso de MRC é recomendado em guias de desempenho de métodos analíticos para detecção inequívoca de resíduos de contaminantes em produtos de origem animal, como o *Commission Decision 2002/657/EC* [6], da União Europeia e o Manual de garantia da qualidade analítica do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [7].

Esta CI teve como objetivo geral dar suporte ao valor de caracterização de um candidato a Material de Referência Certificado (MRC) de metabólitos de nitrofuranos em músculo de frango liofilizado. Foram determinados os valores das frações mássicas desses metabólitos e suas respectivas incertezas, e as medições de teor de umidade residual do material liofilizado foram facultativas.

2. Materiais e Métodos

2.1. Preparação dos Itens de Comparação

O candidato a MRC foi produzido a partir da mistura de branco de matriz com amostras de peito de frango naturalmente contaminadas com os metabólitos de nitrofuranos. As amostras de branco de matriz foram obtidas a partir de peitos de frango adquiridos no comércio, cuja ausência de metabólitos foi comprovada pela análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas em Tandem (CLAE-EM/EM). As amostras de frango contaminado com os metabólitos de nitrofuranos, AOZ, AMOZ, SEM e AHD, foram obtidas em um trabalho previamente realizado. Nesse trabalho, os metabólitos foram incorporados à matriz através do processo metabólico dos medicamentos precursores administrados aos animais. A criação dos animais até o abate foi realizada no Colégio Técnico Agrícola Ildefonso Bastos Borges (CTAIBB), localizado no município de Bom Jesus do Itabapoana, Rio de Janeiro, Brasil [8].

O processo a seguir foi realizado individualmente para cada grupo de tecido (peito de frango) contaminado com os metabólitos e para o branco de matriz. Os peitos de frango foram cortados em pequenos cubos e triturados em misturador de bateladas com copo de aço inoxidável (*blender*, 7011S, Waring, Torrington, EUA) e espalhados em bandejas, em quantidades de aproximadamente 150 g em cada bandeja. As amostras foram congeladas na temperatura a -80 °C por 24 h, sendo posteriormente levadas para liofilização (marca LIOTOP, Modelo L101). A massa de material em cada bandeja foi determinada antes e depois do processo de liofilização. Os peitos de frango liofilizados foram triturados em um moinho de facas durante 3 min a 10.000 RPM, peneirados a 420 µm, com o auxílio de um agitador de peneiras (Bertel, CIAL158) e armazenados separadamente em frascos de vidro âmbar borossilicato a -20 °C. Cada grupo de material de partida (peitos de frango), já liofilizado, foi analisado individualmente por CLAE-EM/EM com intuito de saber em que concentração os metabólitos se encontravam em cada um desses materiais.

Com base nos resultados obtidos para cada tecido contaminado com seus respectivos metabólitos de nitrofuranos, foi calculada a quantidade necessária de cada um desses tecidos juntamente com o branco para se obter a fração mássica alvo dos referidos metabólitos (AOZ, AMOZ, SEM e AHD) no candidato a MRC. A mistura dos tecidos com cada metabólito e do branco de matriz foi realizada em um

homogeneizador de pós em Y por 2 h. O material obtido foi envasado em frascos de vidro âmbar borossilicato de 10 mL, contendo $(1,30 \pm 0,05)$ g de músculo de frango em cada unidade, totalizado 256 frascos de candidato a MRC. Após o envase, todo o lote passou por etapa de liofilização direta nos frascos, que foram selados sob atmosfera inerte, com gás N₂. Para isso, ao término da secagem, antes da retirada dos frascos da câmara do liofilizador, um balão contendo gás N₂ foi conectado à entrada de ar desta câmara, para que durante o rompimento do vácuo ocorresse a entrada deste gás inerte no lugar do ar.

Posteriormente o lote foi submetido a um tratamento com irradiação gama a 7 kGy, realizado no Centro de Tecnologia do Exército (CTEx, Guaratiba, Rio de Janeiro). Esse tratamento é importante para a redução da carga microbológica, o que deve garantir uma estabilidade maior ao produto. O lote foi também submetido à análise microbológica antes e depois da irradiação.

O procedimento de preparo do material foi desenvolvido com base em um estudo de viabilidade realizado previamente para os analitos AOZ e AMOZ na mesma matriz [9].

O item da CI consiste em músculo de peito de frango liofilizado, contendo os 4 metabólitos de nitrofuranos que foram naturalmente incorporados à matriz: 3-amino-2-oxazolidinona (AOZ), 3-amino-5-morfolinometil-2-oxazolidinona (AMOZ), semicarbazida (SEM), 1-aminoidantoína (AHD). O material está em frascos de vidro âmbar com tampa de borracha e lacre de alumínio com *Flip-off*. Cada frasco contém aproximadamente 1,3 g de material liofilizado.

As propriedades a serem analisadas, bem como as faixas de fração mássica indicativas para cada uma delas estão apresentados na tabela 1. As faixas de valores de fração mássica de metabólitos de nitrofuranos estão apresentadas em base úmida (no material reconstituído). A determinação da umidade residual foi facultativa para os participantes que tiverem condições de realizar esta análise de acordo com as instruções fornecidas no protocolo.

Tabela 1 – Propriedades a serem analisadas e frações mássicas indicativas.

Propriedade	Faixas de fração mássica
Teor de umidade residual (opcional)	0,5 g/100 g a 10 g/100 g
Fração mássica de AOZ	0,5 µg/kg a 10 µg/kg
Fração mássica de AMOZ	0,5 µg/kg a 10 µg/kg
Fração mássica de AHD	0,5 µg/kg a 10 µg/kg
Fração mássica de SEM	0,5 µg/kg a 10 µg/kg

2.2. Homogeneidade do Item da CI

Para o estudo de homogeneidade, onze amostras foram aleatoriamente selecionadas e analisadas em duplicata para teor de umidade residual e para a fração mássica dos metabólitos de nitrofuranos.

A fração mássica dos quatro metabólitos de nitrofuranos, AOZ, AMOZ, SEM e AHD foi determinada por espectrometria de massas por diluição isotópica (EMDI) utilizando a técnica de CLAE-EM/EM. O procedimento de extração envolveu a hidrólise ácida dos metabólitos com solução de HCl 1M, derivatização por 16 h a 37 °C com solução de 2-nitrobenzaldeído 50 nM, e duas etapas de extração líquido-líquido com acetato de etila. Um sistema binário de cromatografia líquida Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) acoplado a um espectrômetro de massas triploquadrupolo (model 4000TM QTrap LC-MS/MS System, Applied Biosystems, Foster City, USA) foi utilizado. Esse mesmo sistema foi utilizado nos estudos de estabilidade e na caracterização do candidato a MRC.

Para a determinação da umidade residual utilizou-se titulador automático Karl Fischer Coulométrico (modelo 831, Metrohm, Herisau, Suíça) equipado com um eletrodo gerador sem diafragma e um forno para aquecimento das amostras (modelo 774, Metrohm, Herisau, Suíça).

Os procedimentos estatísticos foram realizados conforme os requisitos do ABNT ISO Guia 35 [10], utilizando análise de variâncias de fator único (ANOVA). Antes de prosseguir com a ANOVA, foi verificada pelo teste de Cochran a possível existência de variâncias discrepantes dos resultados dentro de um mesmo frasco. A incerteza da heterogeneidade do material obtida a partir desse estudo de homogeneidade (u_{hom}), bem como o grau de heterogeneidade (%) foram calculados a partir dos dados de ANOVA, em função dos valores da média quadrática entre as unidades (MQ_{entre}) e dentro das unidades (MQ_{dentro}).

Os resultados do estudo de homogeneidade para os parâmetros estudados no lote candidato à MRC estão descritos na tabela 2, incluindo dados da ANOVA (valores de F).

Tabela 2 - Resultados do estudo de homogeneidade da umidade residual e das frações mássicas dos metabólitos de nitrofuranos, AOZ, AMOZ, SEM e AHD, no lote candidato a MRC.

Parâmetro	F _{calc}	F _{tab}	u_{hom}	Grau de heterogeneidade (%)
Umidade residual	2,96	3,02	0,086 g/100 g	6,21
AOZ	1,93	2,85	0,14 µg/kg	2,66
AMOZ	0,72	2,85	0,092 µg/kg	1,79
AHD	1,18	2,85	0,065 µg/kg	1,47
SEM	1,08	2,85	0,046 µg/kg	0,94

O teor de umidade residual no lote candidato a MRC apresentou grau de heterogeneidade de 6,21 %, enquanto as frações mássicas dos metabólitos apresentaram entre 0,94 % e 2,66 % de heterogeneidade. Com base nas incertezas alvo dos valores de propriedade do MRC estabelecidas na etapa de planejamento, um grau de heterogeneidade máximo de 10 % foi considerado como aceitável para o propósito. Dessa forma, todos os valores de propriedade foram considerados homogêneos.

2.3. Estabilidade do Item da CI

Os métodos de análise utilizados nos estudos de estabilidades foram os mesmos que foram utilizados nos estudos de homogeneidade. A análise estatística dos resultados foi realizada por regressão linear, seguindo os princípios do ABNT ISO Guia 35 [10]. O estudo de estabilidade de curta duração (condições de transporte) foi realizado para a umidade residual do material e para a fração mássica dos metabólitos de nitrofuranos, em duas temperaturas: 20 °C (temperatura ambiente) e 50 °C (temperatura em que um material pode chegar em um transporte terrestre). O tempo de estudo foi de 63 dias divididos em 6 períodos (05, 13, 32, 48, 54 e 63 dias). Duas amostras foram analisadas em cada um dos dias. A tabela 3 apresenta o resumo dos resultados dos estudos de estabilidade de curta duração para o lote candidato à MRC.

Tabela 3 - Resultados do estudo de homogeneidade da umidade residual e das frações mássicas dos metabólitos de nitrofuranos, AOZ, AMOZ, SEM e AHD, no lote candidato à MRC.

Parâmetro	Temp. (°C)	b ₁	s(b ₁)	*Valor de p	Incerteza	Conclusão
Umidade residual	20	0,00239	0,000920	0,0234	0,058 g/100 g	instável
	50	0,0102	0,00170	0,0000628	0,11 µg/kg	instável
AOZ	20	-0,00255	0,00168	0,157	0,11 µg/kg	estável
	50	-0,00971	0,00305	0,00785	0,19 µg/kg	instável
AMOZ	20	-0,00399	0,00516	0,456	0,33 µg/kg	estável
	50	-0,00516	0,004599	0,283	0,29 µg/kg	estável
AHD	20	-0,00328	0,00282	0,274	0,18 µg/kg	estável
	50	-0,00511	0,00435	0,267	0,27 µg/kg	estável
SEM	20	0,000245	0,00272	0,930	0,17 µg/kg	estável
	50	0,000856	0,00390	0,830	0,25 µg/kg	estável

*A propriedade é considerada estável quando o valor de $p > 0,05$.

Nos resultados apresentados, deve ser observado o valor de p do coeficiente linear (b_1) da curva plotada para a fração mássica da propriedade estudada em função do tempo. Valores de p maiores do que 0,05 significam que, no teste estatístico t para a inclinação da curva, o valor de t de Student calculado não excedeu o valor crítico bicaudal para $n - 2$ graus de liberdade e nível de confiança de 95%. Nesse caso, as inclinações podem ser consideradas significativamente iguais a zero par um nível de confiança de 95 % e os parâmetros avaliados considerados estáveis durante o período estudado. Para o teor de umidade residual,

os valores de p encontrados nos estudos em ambas as temperaturas foram menores do que 0,05 e, portanto, considerados instáveis nessas temperaturas, no período estudado. Quanto à fração mássica dos metabólitos de nitrofuranos, apenas o AOZ apresentou instabilidade à temperatura de estudo de 50 °C, com valor de p menor do que 0,05. Os demais analitos foram considerados estáveis em ambas as temperaturas estudadas.

O estudo de estabilidade de longa duração (condições de armazenamento) também foi realizado para a umidade residual do material e para a fração mássica dos metabólitos de nitrofuranos, na temperatura de armazenamento de -20 °C. O tempo de estudo foi de 360 dias divididos em 6 períodos (28, 81, 136, 189, 252 e 360 dias). Amostras de referência foram mantidas -80 °C e analisadas juntamente com as amostras armazenadas a -20 °C. Duas amostras foram analisadas em cada um dos dias, cada uma em duplicata. A tabela 4 apresenta o resumo do estudo de estabilidade de longa duração (a -20 °C) para o lote candidato à MRC.

Tabela 4 - Resultados para o estudo de estabilidade a - 20 °C por 360 dias, da umidade residual e das frações mássicas dos metabólitos de nitrofuranos, AOZ, AMOZ, AHD e SEM, no lote de candidato a MRC.

Parâmetro	b_1	$s(b_1)$	Valor de p	Incerteza	Conclusão
Umidade residual	-0,0000520	0,000244	0,833	0,088 g/100 g	estável
AOZ	0,000168	0,000705	0,813	0,25 µg/kg	estável
AMOZ	0,000183	0,000477	0,704	0,17 µg/kg	estável
AHD	0,000267	0,000527	0,617	0,19 µg/kg	estável
SEM	0,000492	0,000512	0,345	0,18 µg/kg	estável

Todas as propriedades estudadas apresentaram estabilidade a -20 °C por 360 dias, segundo os dados da regressão linear, pois todos os valores de p foram maiores do que 0,05.

Apesar dos resultados apresentarem instabilidade para o teor de umidade residual nas condições do estudo de estabilidade de curta duração, na grande maioria dos casos as frações mássicas dos metabólitos não foram influenciadas em decorrência disso. Por exemplo, a 20 °C por 63 dias o teor de umidade residual apresentou instabilidade enquanto que as frações mássicas de todos os metabólitos permaneceram estáveis.

2.4. Caracterização do Item da Comparação pelo Inmetro

Devido aos resultados dos estudos de curta duração para o teor de umidade residual, decidiu-se por não caracterizar este parâmetro. Contudo, de forma a adotar um procedimento mais conservador, decidiu-se por transportar o material em gelo seco para garantir que a temperatura não ultrapassasse -20°C , onde todas as propriedades são estáveis, inclusive o teor de umidade residual.

Para a caracterização do candidato a MRC de metabólitos de nitrofuranos em músculo de frango, foi utilizado pelo Inmetro um “único procedimento de medição de referência (conforme definido no ABNT ISO/IEC Guia 99) em um único laboratório”, que é umas das abordagens de caracterização apresentadas na ABNT NBR ISO 17034 [11].

Para a extração dos metabólitos, primeiramente, $0,25\text{ g} \pm 0,01\text{ g}$ das amostras liofilizadas foram reconstituídas com $0,75\text{ g} \pm 0,01\text{ g}$ de água ultrapura e fortificadas com a solução de trabalho de PI. Nas etapas de hidrólise e derivatização foram adicionados, na sequência, 4 mL de água ultrapura, 500 μL de solução de ácido clorídrico 1 mol.L^{-1} e 150 μL de solução de 2-NBA 50 mM em DMSO. As amostras foram agitadas durante 16 h a 37°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°C , 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°C e 10.000 rpm, durante 15 min. Os extratos reconstituídos foram filtrados através de um filtro 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.

A técnica CLAE-EM/EM foi empregada com o método de Espectrometria de Massas por Diluição Isotópica (EMDI), utilizando os padrões internos análogos, isotopicamente marcados. O método de calibração por correspondência exata de sinais entre calibrante, PI e amostra (*exact matching calibration*) foi utilizado.

O cálculo das frações mássicas dos metabólitos de nitrofuranos (w_x) por *exact matching calibration* foi realizado através da equação 1.

$$w_x = w_z \times \frac{m_z}{m_{yc}} \times \frac{m_y}{m_x} \times \frac{R_B}{R_{BC}} \quad (1)$$

Onde,

w_x é a fração mássica do analito no candidato a MRC; w_z é a fração mássica do analito na solução de trabalho; m_z é a massa de solução de analito adicionada ao calibrante; m_{yc} é a massa de solução de PI adicionada ao calibrante; m_y é a massa de solução de PI adicionada à amostra; m_x é a massa de amostra; R_B é a razão entre as intensidades dos sinais analito/PI na amostra; e R_{BC} é a razão entre as intensidades dos sinais analito/PI no calibrante.

Quanto ao teor de umidade residual no frango liofilizado, devido aos resultados obtidos nos estudos de homogeneidade e estabilidade, o candidato a MRC não foi caracterizado para esse parâmetro.

Apesar do método de análise utilizado pelo Inmetro ser considerado um método de referência, com potencial para ser um método primário, não há nenhum MRC em matriz similar disponível para verificar o nível de exatidão do mesmo. Por se tratar de uma matriz complexa (músculo de frango), onde a presença de interferentes é muito comum, a caracterização desse candidato a MRC foi realizada com subsídio dos resultados desta comparação interlaboratorial (CI) cujos resultados estão apresentados no presente relatório.

2.5. Orientações aos participantes

Os participantes foram orientados sobre a forma de armazenamento, manuseio e reconstituição das amostras, bem como sobre o número de replicatas e resultados a serem reportados.

Cada laboratório participante recebeu quatro (4) itens de comparação, ou seja, quatro (4) frascos de vidro âmbar de 10 mL, contendo 1,3 g de material na forma liofilizada. As determinações da fração mássica dos metabólitos de nitrofuranos foram realizadas para 3 (três) dos 4 (quatro) frascos recebidos, sendo duas alíquotas retiradas de cada frasco (duas replicatas verdadeiras de cada frasco), totalizando 6 (seis) medições. A quantidade mínima de amostra analisada por alíquota foi de 250 mg de material liofilizado, de forma a garantir que uma possível heterogeneidade do material, em alíquotas menores do que as estudadas, não influenciasse nos resultados. Um frasco além do necessário para as análises, foi fornecido para utilização em testes iniciais. As determinações foram realizadas pelo método de análise implementado na rotina do laboratório participante.

Os participantes foram orientados a reportar todos os resultados das medições de frações mássicas dos metabólitos de nitrofuranos, em termos de massa da amostra reconstituída. Os resultados individuais para cada replicata, de cada frasco analisado, foram reportados em um formulário de registro de resultados, bem como o resultado final combinado, a incerteza-padrão e a incerteza expandida (com 95 % de nível de confiança), as principais fontes dessa incerteza e detalhes do método de análise e dos padrões empregados.

A medição do teor de umidade residual da amostra liofilizada foi facultativa nesta CI. Quando realizada, os participantes foram orientados a utilizar a técnica de titulação de Karl Fischer coulométrico. A quantidade mínima de amostra para a determinação de umidade residual foi de 100 mg.

2.6. Tratamento dos resultados dos participantes

Os laboratórios participantes foram solicitados a reportarem os seus resultados em base úmida, isto é, para a fração mássica dos metabólitos na amostra reconstituída. Foram reportados os resultados por alíquota analisada, as massas das alíquotas e de água da reconstituição, bem como o resultado final médio em base úmida, a incerteza associada a esse resultado e o fator de abrangência “*k*” para conversão em incerteza expandida.

O procedimento de reconstituição foi contemplado no protocolo da comparação, que continha todas as informações relevantes para os participantes, tais como a forma de armazenamento e manuseio das amostras, a forma de reportar os resultados e as instruções de preenchimento dos formulários. Conforme o procedimento de reconstituição, os participantes foram orientados a utilizarem uma quantidade de água determinada com exatidão (cinco casas decimais), em função da massa da alíquota da amostra utilizada, conforme a equação 2:

$$m_w = 2,9 \times m_s \quad (2)$$

Onde, m_w é a massa de água a ser adicionada e m_s a massa da alíquota de material liofilizado retirada para análise.

Porém, devido às diferenças nas quantidades de água utilizadas, os resultados reportados para massa de amostra reconstituída não são comparáveis, pois a fração mássica do metabólito varia em função da massa de água que o laboratório utilizou para reconstituição. Por esse motivo, os resultados reportados foram normalizados para uma proporção única de água de 74 %, utilizando as massas das alíquotas e as massas de água de reconstituição. Essa proporção de 74 % foi estipulada com base em uma aproximação dos resultados de experimentos onde foi calculada a quantidade de água nas amostras reais de peito de frango utilizadas na produção do MR.

Para fazer essa normalização dos resultados reportados por cada laboratório, inicialmente converteu-se o resultado de cada alíquota, reportado em base úmida pelo laboratório “i”, em fração mássica do metabólito no material liofilizado (conforme fornecido), utilizando a equação 3. Esses resultados já são comparáveis, pois as frações mássicas estão expressas para a massa do material na forma em que foi fornecido.

$$x_{i_L} = x_{i_R} \times \frac{(m_{aliquota} + m_{água})}{m_{aliquota}} \quad (3)$$

Onde, x_{i_L} é a fração mássica do metabólito no material liofilizado, calculada para a alíquota analisada pelo laboratório “i”; x_{i_R} é a fração mássica do metabólito no material em base úmida, conforme reportado para a alíquota analisada pelo laboratório “i”; $m_{aliquota}$ é a massa da alíquota; e, $m_{água}$ a massa de água de reconstituição.

Cada resultado por alíquota foi então convertido em resultado expresso em base úmida normalizada, multiplicando esses resultados por 0,26 (equação 4), que corresponde a um teor de água de 74 %.

$$x_{i_N} = x_{i_L} \times 0,26 \quad (4)$$

Onde, x_{i_N} é a fração mássica do metabólito em base úmida normalizada, calculada para a alíquota analisada pelo laboratório “i”.

Após essa conversão, que foi realizada para o resultado de cada alíquota, o resultado médio do laboratório expresso em base úmida normalizada foi calculado. As incertezas reportadas também foram convertidas em base úmida normalizada.

Dessa forma, o tratamento estatístico dos resultados dos participantes para o cálculo do valor de consenso, foi realizado para os resultados e incertezas dos participantes, já transformados para base úmida normalizada.

2.7. Análise Estatística dos Resultados dos Participantes

A análise estatística dos resultados foi realizada conforme o Guia CCQM para estimativa de valor de consenso: “CCQM Guidance note: *Estimation of a consensus KCRV and associated Degrees of Equivalence*”[12]. Nela foi englobada uma análise descritiva dos resultados, desde a representação e a

avaliação da consistência dos resultados, além da uma análise inferencial, com a estimação de valores de consenso via combinação de resultados e o cálculo da incerteza de medição dos estimadores.

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização realizada pelo Inmetro

Nas análises para caracterização, um maior rigor metrológico em comparação com as análises dos estudos de homogeneidade e estabilidade foi adotado para a obtenção de resultados com maior grau de exatidão, contemplando todas as possíveis fontes de incerteza. Além do procedimento de calibração por exact matching, que tende a fornecer resultados com incertezas menores, foram preparadas duas soluções calibrantes totalmente independentes com relação ao preparo. Essas soluções foram utilizadas no preparo de duas amostras fortificadas para calibração (CB1 e CB2) também independentes, ou seja, brancos de peito de frango fortificados com essas soluções, que foram usados para calibração. A média final dos resultados obtidos a partir de apenas um dos calibrantes foi considerada como resultado final. Porém, os resultados obtidos a partir dos dois calibrantes foram comparados através do teste de t de Student de comparação de médias, com nível de confiança de 95 %. Todos os analitos, com exceção da semicarbazida (SEM), apresentaram médias iguais de seus resultados obtidos pelos dois calibrantes CB1 e CB2. No caso da SEM, em que houve diferença entre as médias, essa variação de resultados obtidos “entre calibrantes”, foi incluída como fonte adicional de incerteza.

A tabela 5 apresenta os resultados por replicata, o resultado médio e as incertezas-padrão e expandida, obtidos pelo Inmetro para a caracterização de cada valor de propriedade do candidato a MRC.

Tabela 5 - Resultados por replicata, resultado médio, e incertezas-padrão e expandida, obtidos pelo Inmetro para a caracterização do candidato a MRC.

Frasco	Replicata	AOZ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	AMAZ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	AHD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	SEM ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1	1	5,07	5,29	4,97	6,02
	2	5,61	5,53	5,12	6,01
2	1	5,49	5,81	5,67	5,98
	2	5,28	5,44	5,30	6,04
3	1	5,28	5,38	4,41	5,97
	2	5,65	5,47	5,01	6,06
média		5,40	5,49	5,08	6,01
incerteza padrão (u)		0,28	0,23	0,45	0,19
incerteza expandida (U, $k=2$)		0,56	0,45	0,90	0,37

A rastreabilidade metrológica dos resultados obtidos foi alcançada pela utilização do método de EMDI, que é um procedimento de medição potencialmente primário de razão, associado ao método de gravimetria para o preparo das soluções calibrantes. Além disso, a pureza dos padrões dos analitos

utilizados no preparo das soluções calibrantes foi determinada por RMNq de ^1H e ^{13}C , utilizando MRC de tereftalato de dimetila (TraceCERT®, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) como padrão interno.

A figura 1 apresenta um gráfico de colunas com as contribuições das principais fontes de incerteza associadas aos valores das medições do Inmetro, para cada analito, na caracterização do candidato a MRC.

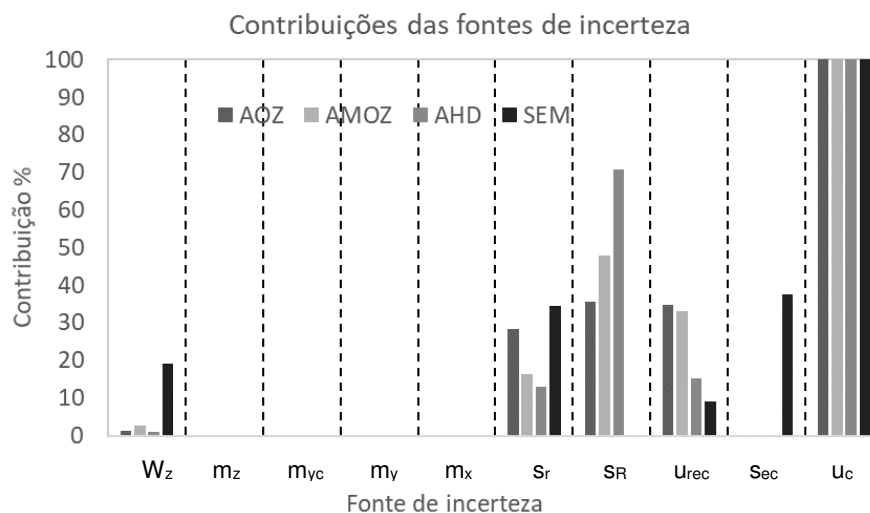


Figura 1 - Gráfico de colunas mostrando a contribuição (%) das principais fontes de incerteza na caracterização do candidato a MRC, para os metabólitos AOZ, AMOZ, AHD e SEM.

Na figura 1, u_{rec} é a incerteza da recuperação; s_R é o desvio padrão entre alíquotas analisadas; s_r é o desvio padrão de repetibilidade; s_{ec} é o desvio padrão que corresponde à variação dos resultados obtidos a partir de calibrantes diferentes; e m_y , m_{yc} , m_z , m_x e w_z , são as fontes de incerteza oriundas da equação 1, de *exact matching*. A fonte w_z é composta pelas massas usadas no preparo da solução de calibração e inclui também a pureza do padrão.

3.2. Resultados dos Participantes

Apenas um participante reportou o resultado para o teor de umidade residual das amostras fornecidas. Diante disso e das questões de instabilidade desse parâmetro em algumas temperaturas estudadas, o material não foi caracterizado para o teor de umidade residual e os resultados não serão apresentados neste relatório.

Quanto à fração mássica dos metabólitos, conforme já mencionado, os laboratórios foram orientados a reportarem os valores em base úmida, ou seja, para o material reconstituído. Porém, como as proporções entre massa de amostra e massa de água de reconstituição utilizadas por cada participante são diferentes, então os resultados não podem ser comparados diretamente. Portanto, os resultados foram previamente

convertidos em base úmida normalizada, conforme o item 2.6, para que pudessem ser tratados. As tabelas 6, 7, 8 e 9 apresentam os resultados conforme reportados pelos participantes e os mesmos resultados após a conversão para base úmida normalizada.

Tabela 6 - Resultados dos participantes para a fração mássica do Aoz, conforme reportados, e resultados em base úmida, normalizados.

Código do Laboratório	frasco	Resultados conforme reportados				Resultados em base úmida, normalizados			
		Resultado por alíquota (µg/kg)	Média (µg/kg)	k	U (µg/kg)	Resultado por alíquota (µg/kg)	Média (µg/kg)	U (µg/kg)	u (µg/kg)
16	237	3,84	4,247*	2	0,12	3,88	4,29	0,12	0,06
		4,12				4,18			
	098	4,04				4,08			
		4,62				4,66			
	028	4,09				4,12			
		4,77				4,79			
06	52	1,899	1,914	2	0,107	1,91	1,93	0,11	0,05
		1,95				1,96			
	114	1,874				1,88			
		1,918				1,93			
	216	1,94				1,96			
		1,906				1,91			
26	131	1,58	1,6	2	0,12	1,60	1,62	0,12	0,06
		1,54				1,56			
	159	1,65				1,68			
		1,59				1,62			
	194	1,66				1,69			
		1,58				1,60			
56	89	1,773	1,87	0,99**	0,3	1,36	1,42	0,23	0,09
		1,869				1,39			
	177	1,923				1,47			
		1,918				1,42			
	228	1,872				1,42			
		1,856				1,48			
Inmetro	62	-	-	-	-	1,32	1,40	0,15	0,07
		-				1,46			
	136	-				1,43			
		-				1,37			
	233	-				1,37			
		-				1,47			

*O valor informado pelo laboratório 16 não corresponde à média dos valores reportados por replicata (4,78 µg/kg). Portanto, a média foi recalculada.

**O laboratório 56 reportou o valor de k de 0,99 que foi considerado como um nível de confiança de 99 %. O valor de k foi, portanto, calculado com base nesse nível de confiança.

Tabela 7 - Resultados dos participantes para a fração mássica do AMOZ, conforme reportados, e resultados em base úmida, normalizados.

Código do Laboratório	frasco	Resultados conforme reportados				Resultados em base úmida, normalizados			
		Resultado por alíquota (µg/kg)	Média (µg/kg)	k	U (µg/kg)	Resultado por alíquota (µg/kg)	Média (µg/kg)	U (µg/kg)	u (µg/kg)
41*	237	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
		NR				NR			
	098	NR				NR			
		NR				NR			
	028	NR				NR			
		NR				NR			
39	52	2,216	2,136	2	0,15	2,23	2,15	0,15	0,08
		2,218				2,23			
	114	2,105				2,12			
		2,119				2,13			
	216	2,046				2,06			
		2,115				2,12			
11	131	1,57	1,61	2	0,11	1,58	1,63	0,11	0,06
		1,55				1,57			
	159	1,53				1,56			
		1,58				1,61			
	194	1,74				1,77			
		1,67				1,69			
32	89	2,033	2,12	0,99*	0,3	1,55	1,62	0,23	0,09
		2,179				1,63			
	177	2,043				1,56			
		2,24				1,65			
	228	2,131				1,61			
		2,12				1,69			
Inmetro	62	-	-	-	-	1,37	1,43	0,12	0,06
		-				1,44			
	136	-				1,51			
		-				1,41			
	233	-				1,40			
		-				1,42			

*O laboratório 32 reportou o valor de k de 0,99 que foi considerado como um nível de confiança de 99 %. O valor de k foi, portanto, calculado com base nesse nível de confiança.

Tabela 8 - Resultados dos participantes para a fração mássica do AHD, conforme reportados, e resultados em base úmida, normalizados.

Código do Laboratório	frasco	Resultados conforme reportados				Resultados em base úmida, normalizados			
		Resultado por alíquota (µg/kg)	Média (µg/kg)	<i>k</i>	U (µg/kg)	Resultado por alíquota (µg/kg)	Média (µg/kg)	U (µg/kg)	u (µg/kg)
10	237	2,46	1,97	2	0,12	2,48	1,99	0,12	0,06
		2,29				2,32			
	098	1,75				1,77			
		2,08				2,10			
	028	1,66				1,67			
		1,6				1,61			
18	52	1,875	1,875	2	0,116	1,89	1,89	0,12	0,06
		1,896				1,90			
	114	1,823				1,83			
		1,874				1,89			
	216	1,882				1,90			
		1,897				1,90			
42	131	1,4	1,36	2	0,16	1,41	1,38	0,16	0,08
		1,24				1,26			
	159	1,41				1,43			
		1,38				1,40			
	194	1,33				1,35			
		1,4				1,42			
53	89	1,823	1,51	99*	0,45	1,39	1,14	0,34	0,13
		1,32				0,98			
	177	1,57				1,20			
		1,621				1,20			
	228	1,161				0,88			
		1,509				1,20			
Inmetro	62	-	-	-	-	1,29	1,32	0,24	0,12
		-				1,33			
	136	-				1,47			
		-				1,38			
	233	-				1,15			
		-				1,30			

*O laboratório 53 reportou o valor de *k* de 99 que foi considerado como um nível de confiança de 99 %. O valor de *k* foi, portanto, calculado com base nesse nível de confiança.

Tabela 9 - Resultados dos participantes para a fração mássica da SEM, conforme reportados, e resultados em base úmida, normalizados.

Código do Laboratório	frasco	Resultados conforme reportados				Resultados em base úmida, normalizados			
		Resultado por alíquota (µg/kg)	Média (µg/kg)	<i>k</i>	U (µg/kg)	Resultado por alíquota (µg/kg)	Média (µg/kg)	U (µg/kg)	u (µg/kg)
01	237	6,4	4,78	2	0,12	6,46	4,82	0,12	0,06
		5,06				5,14			
	098	3,86				3,90			
		4,7				4,74			
	028	4,24				4,27			
		4,42				4,44			
38	52	2,016	1,999	2	0,131	2,03	2,06	0,14	0,07
		2,079				2,09			
	114	2,068				2,13			
		2,111				2,06			
	216	2,039				2,00			
		1,999							
08	131	1,65	1,56	2	0,13	1,68	1,59	0,13	0,07
		1,49				1,51			
	159	1,59				1,62			
		1,54				1,56			
	194	1,62				1,64			
		1,49				1,51			
50	89	2,552	2,4	99*	0,5	1,95	1,83	0,38	0,15
		2,173				1,62			
	177	2,267				1,73			
		2,596				1,92			
	228	2,414				1,83			
		2,397				1,91			
Inmetro	62	-	-	-	-	1,57	1,56	0,10	0,05
		-				1,56			
	136	-				1,56			
		-				1,57			
	233	-				1,55			
		-				1,58			

*O laboratório 50 reportou o valor de *k* de 99 que foi considerado como um nível de confiança de 99 %. O valor de *k* foi, portanto, calculado com base nesse nível de confiança.

Além dos resultados quantitativos, os participantes reportaram também informações sobre os procedimentos de extração e *clean-up* das amostras, e sobre os padrões e padrões internos utilizados nas análises, conforme mostrado na tabela 10.

Tabela 10 - Informações dos participantes sobre técnicas analíticas, métodos de extração e *clean-up*, padrões e padrões internos utilizados na CI.

Técnica analítica e de calibração	Procedimentos de extração e <i>clean-up</i> *	Padrões (fornecedor, pureza)	Origem do valor da pureza	Padrões internos (fornecedor, pureza)
CLAE-EM/EM, padronização interna	<ul style="list-style-type: none"> • Adição de PI e repouso por 15 min; • Hidrólise ácida e derivatização com NBA por 16 h a 37 ± 2 °C; • Ajuste para pH $7 \pm 0,5$; • Extração com acetato de etila (2x); • Evaporação com fluxo de N₂; • Solubilização com 200 µL de metanol e 800 µL de água ultrapura; • Filtração do extrato com membrana de 0,45 µm. 	<p>AOZ (Dr Ehrenstorfer, 99,3 %)</p> <p>AHD (Dr Ehrenstorfer, 99,38 %)</p> <p>SEM (Dr Ehrenstorfer, 99,5 %)</p>	Certificado do fornecedor	AOZ-D ₄ (Sigma-Aldrich, 99,3 %)
CLAE-EM/EM, padronização interna com matriz fortificada	<ul style="list-style-type: none"> • Hidrólise ácida e derivatização com 2-NBA; • Extração com acetato de etila; • Evaporação; • Solubilização dos extratos com ACN/água. 	<p>AOZ (Witega, 99,7%);</p> <p>AMAZ (Witega, 99,4 %);</p> <p>AHD (Witega, 99,3 %);</p> <p>SEM·HCl (Sigma-Aldrich, 99 %)</p>	Certificado do fornecedor	<p>AOZ-D₄ (Witega, > 99,3 %)</p> <p>AMAZ-D₅ (Witega, > 99,1 %)</p> <p>AHD-¹³C (Witega, > 99 %)</p> <p>cloridrato de SEM-[¹³C, ¹⁵N₂] (Witega, > 99 %)</p>
CLAE-EM/EM, padronização interna com matriz fortificada	<ul style="list-style-type: none"> • Hidrólise ácida e derivatização simultânea com 2-NBA durante a noite; • Ajuste de pH; • Extração com acetato de etila; • Solubilização dos extratos com metanol:água; • limpeza com n-hexano (2x). 	<p>AOZ (Dr. Ehrenstorfer, 99,32 %)</p> <p>AMAZ (Sigma-Aldrich, 99,5 %)</p> <p>AHD (Dr. Ehrenstorfer, 99,38 %)</p> <p>SEM·HCl (Dr. Ehrenstorfer, 99,80 %)</p>	Certificado do fornecedor	<p>AOZ-D₄ (Dr. Ehrenstorfer, 97,92 %)</p> <p>AMAZ-D₅ (Dr. Ehrenstorfer, 97,59%)</p> <p>AHD-¹³C (Sigma-Aldrich, 99,0%)</p> <p>cloridrato de SEM-[¹³C, ¹⁵N₂] (Sigma-Aldrich, 99,0 %)</p>
CLAE-EM/EM, padronização interna com matriz fortificada	<ul style="list-style-type: none"> • Adição PI e tempo para equilíbrio; • Hidrólise ácida e derivatização simultânea com 2-NBA durante a noite; • Ajuste para pH 7; • Extração com acetato de etila (2x); • Evaporação; • Solubilização com metanol/amfo (?) (15:85); • Extração com hexano (2x). 	<p>AOZ (Sigma, 99,7 %)</p> <p>AMAZ (Witega, 99,6 %);</p> <p>AHD (Witega, 99,6 %);</p> <p>SEM·HCl (Witega, 99,0 %)</p>	Certificado do fornecedor	<p>AOZ-D₄ (Witega, > 99,3 %)</p> <p>AMAZ-D₅ (Witega, > 99 %)</p> <p>AHD-¹³C (Witega, > 99 %)</p> <p>Cloridrato de SEM-[¹³C, ¹⁵N₂] (Witega, > 99 %)</p>

*As informações sobre os métodos de extração encontram-se resumidas, e algumas etapas podem ter sido omitidas pelo próprio participante. Portanto, essas informações não retratam a totalidade do procedimento, mas fornecem apenas uma noção geral sobre o princípio do método utilizado para a extração dos analitos.

As informações apresentadas na tabela não se encontram necessariamente na mesma ordem que os resultados quantitativos apresentados nas tabelas anteriores. Sobre as informações apresentadas, cabe destacar que um dos participantes informou que utilizou apenas um dos analitos isotopicamente marcados (AOZ-D₄) como padrão interno. O mesmo participante não informou se utilizou calibração em solução ou em matriz fortificada. Todos os laboratórios utilizaram a técnica de CLAE-EM/EM.

3.3. Valores de consenso

Os resultados médios das frações mássicas dos metabólitos de nitrofuranos obtidos por cada laboratório, convertidos em base úmida normalizada, bem como as suas incertezas associadas, foram utilizados no cálculo do valor de consenso pelo método estatístico *MM-estimation* [13]. Esse estimador consiste em um método de regressão robusta que é recomendado pelo CCQM para o cálculo de um valor de consenso quando não há consistência mútua entre os resultados e as incertezas também se diferenciam significativamente [12].

As tabelas 11 a 14 apresentam de forma resumida os resultados médios dos laboratórios participantes e do Inmetro para as frações mássicas dos metabólitos de nitrofuranos AOZ, AMOZ, AHD e SEM, no candidato a MRC, expressos em base úmida normalizada. Os resultados dos valores de consenso para cada analito e suas respectivas incertezas-padrão e expandidas também são apresentados.

Tabela 11 - Resultados de fração mássica de AOZ no candidato a MRC, valor de consenso e incertezas dos resultados e do valor de consenso, expressos em base úmida normalizada.

AOZ				
Código do laboratório	x_i (µg/kg)	$u(x_i)$ (µg/kg)	k	$U(x_i)$ (µg/kg)
16	4,29	0,061	2,00	0,12
06	1,93	0,054	2,00	0,11
26	1,62	0,061	2,00	0,12
56	1,42	0,089	2,58*	0,23
Inmetro	1,40	0,073	2,00	0,15
Valor de consenso, X			1,66	
u(X)			0,13	
k (gl=4; 95 %)			2,78	
U(X)			0,37	

*Valor de k calculado com base em um nível de confiança de 99 %.

Tabela 12 - Resultados de fração mássica de AMOZ no candidato a MRC, valor de consenso e incertezas dos resultados e do valor de consenso, expressos em base úmida normalizada.

AMOZ				
Código do laboratório	x_i ($\mu\text{g/kg}$)	$u(x_i)$ ($\mu\text{g/kg}$)	k	$U(x_i)$ ($\mu\text{g/kg}$)
41	NR	NR	NR	NR
39	2,15	0,075	2,00	0,15
11	1,63	0,056	2,00	0,11
32	1,62	0,089	2,58*	0,23
Inmetro	1,43	0,059	2,00	0,12
Valor de consenso, \bar{X}	1,65			
$u(\bar{X})$	0,16			
k ($gl=3$; 95 %)	3,18			
$U(\bar{X})$	0,51			

*Valor de k calculado com base em um nível de confiança de 99 %.

Tabela 13 - Resultados de fração mássica de AHD no candidato a MRC, valor de consenso e incertezas dos resultados e do valor de consenso, expressos em base úmida normalizada.

AHD				
Código do laboratório	x_i ($\mu\text{g/kg}$)	$u(x_i)$ ($\mu\text{g/kg}$)	k	$U(x_i)$ ($\mu\text{g/kg}$)
10	1,99	0,061	2,00	0,12
18	1,89	0,058	2,00	0,12
42	1,38	0,081	2,00	0,16
53	1,14	0,13	2,58*	0,34
Inmetro	1,32	0,12	2,00	0,24
Valor de consenso, \bar{X}	1,73			
$u(\bar{X})$	0,16			
k ($gl=4$; 95 %)	2,78			
$U(\bar{X})$	0,45			

*Valor de k calculado com base em um nível de confiança de 99 %.

Tabela 14 - Resultados de fração mássica de SEM no candidato a MRC, valor de consenso e incertezas dos resultados e do valor de consenso, expressos em base úmida normalizada.

SEM				
Código do laboratório	x_i ($\mu\text{g/kg}$)	$u(x_i)$ ($\mu\text{g/kg}$)	k	$U(x_i)$ ($\mu\text{g/kg}$)
01	4,82	0,061	2,00	0,12
38	2,06	0,068	2,00	0,14
08	1,59	0,066	2,00	0,13
50	1,83	0,15	2,58*	0,38
Inmetro	1,56	0,048	2,00	0,10
Valor de consenso, X			1,70	
u(X)			0,13	
k ($gl=4$; 95 %)			2,78	
U(X)			0,35	

*Valor de k calculado com base em um nível de confiança de 99 %.

As figuras 2 a 5 apresentam os resultados dos laboratórios participantes da CI para a caracterização do candidato a MRC de metabólitos de nitrofuranos em músculo de frango, para cada valor de propriedade.

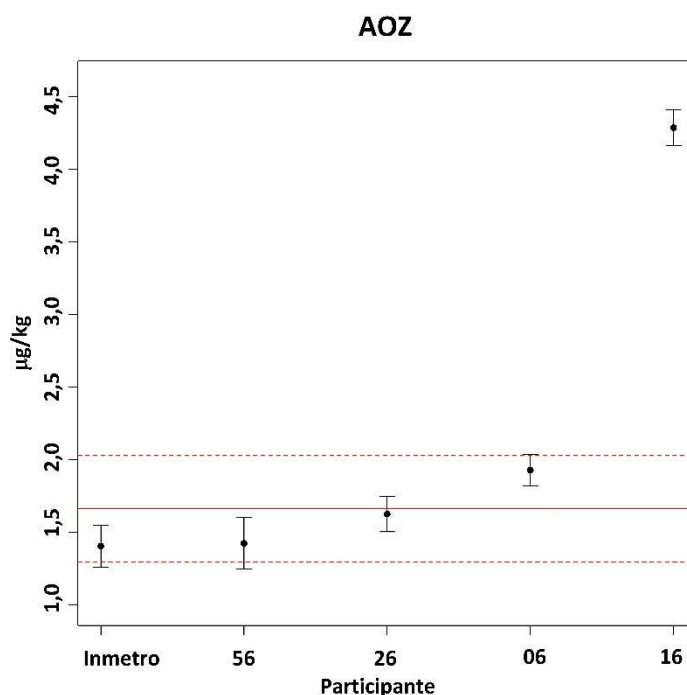


Figura 2 - Gráfico de resultados dos participantes para fração mássica de AOZ com suas incertezas expandidas e valor de estimativa MM (valor de consenso) representado pela linha contínua. A linha tracejada representa a incerteza expandida do valor de consenso.

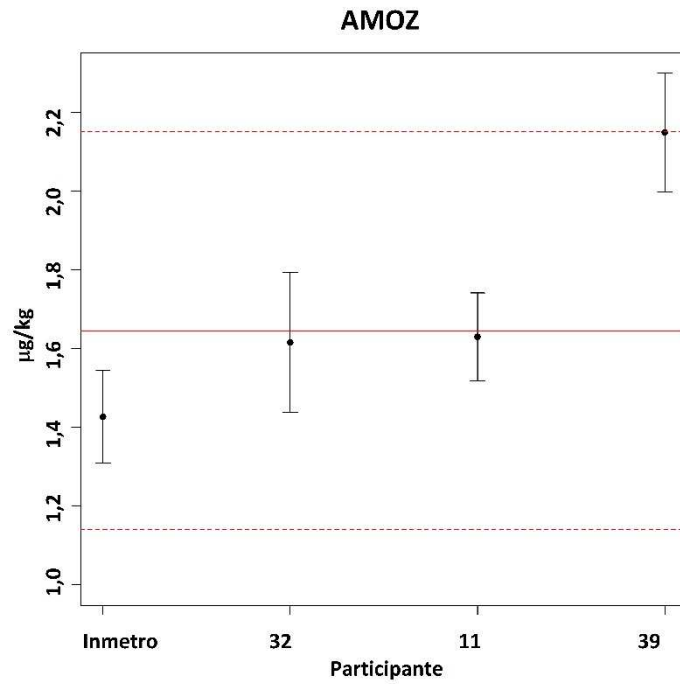


Figura 3 - Gráfico de resultados dos participantes para fração mássica de AMTZ com suas incertezas expandidas e valor de estimativa MM (valor de consenso) representado pela linha contínua. A linha tracejada representa a incerteza expandida do valor de consenso.

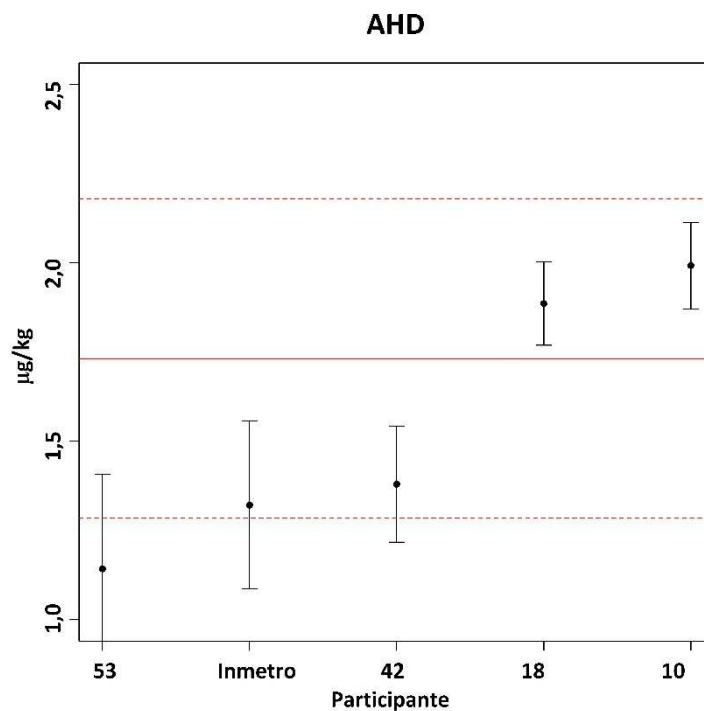


Figura 4 - Gráfico de resultados dos participantes para fração mássica de AHD com suas incertezas expandidas e valor de estimativa MM (valor de consenso) representado pela linha contínua. A linha tracejada representa a incerteza expandida do valor de consenso.

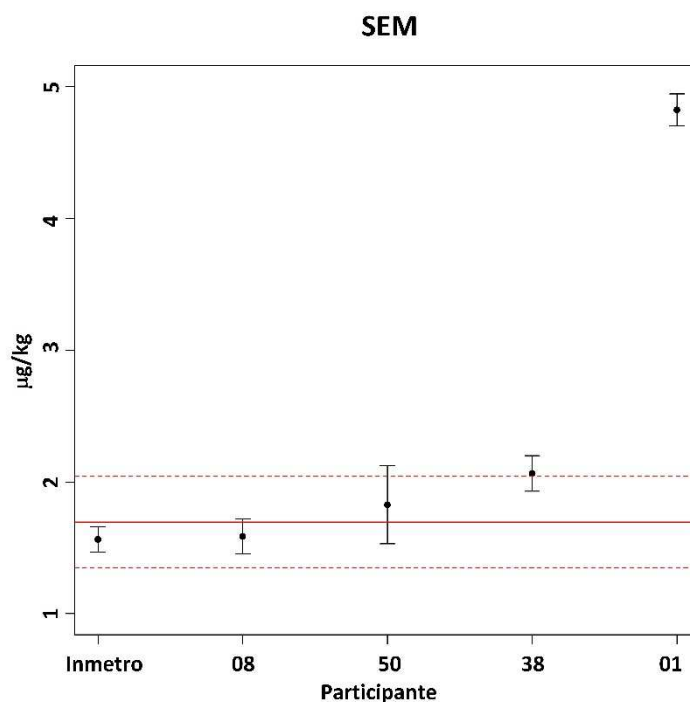


Figura 5 - Gráfico de resultados dos participantes para fração mássica de SEM com suas incertezas expandidas e valor de estimativa MM (valor de consenso) representado pela linha contínua. A linha tracejada representa a incerteza expandida do valor de consenso.

Quando as incertezas expandidas dos laboratórios participantes estiverem contidas no intervalo do valor de consenso, não há evidência estatística de diferença entre tais medições. Neste sentido, os resultados dos laboratórios codificados como 56, 06 e 26 (AOZ); 32, 11 e 39 (AMOZ); 53, 42, 18 e 10 (AHD); e, 08, 50 e 38 (SEM), são equivalentes estatisticamente ao valor de consenso representado pela linha contínua nas figuras pois suas incertezas expandidas cruzam o intervalo de confiança desse valor, delimitado pelas linhas pontilhadas.

Os intervalos de confiança correspondem às incertezas expandidas, $U(X)$, para $k=2$ e um nível de confiança de 95 %. Os resultados de códigos **16** para o AOZ e **01** para a SEM ficaram fora do intervalo de confiança e, portanto, não são compatíveis com o valor de consenso. Esses resultados foram considerados suspeitos de serem aberrantes pela análise visual das Figuras 2 e 5, pois encontram-se muito acima dos demais resultados e do intervalo de confiança. A suspeita desses valores aberrantes foi confirmada pelo teste de Grubbs. No entanto, esses resultados aberrantes não foram removidos do conjunto de dados, uma vez que o método estatístico empregado para o cálculo do valor de consenso (*MM-estimation*) é um método robusto. Os métodos robustos são baseados em cálculos de medidas de posição e por esse motivo não sofrem influência de valores extremos e usualmente esses valores não são removidos do conjunto de dados para o tratamento estatístico.

Os resultados do Inmetro podem ser considerados equivalentes aos valores de consenso para todos os analitos, uma vez que se encontram dentro do intervalo de confiança, ou a sua incerteza cruza o intervalo de confiança, como no caso do AHD.

O Inmetro é um Instituto Nacional de Metrologia (INM) e é o produtor do candidato a MRC em questão. Para que as medições e os valores fornecidos por um Instituto Nacional de Metrologia (INM) ou um Instituto Designado (ID) tenham reconhecimento do BIPM (Bureau Internacional de Pesos e Medidas) e, conseqüentemente, o Instituto tenha as suas Capacidades de Medição e Calibração (CMC) publicadas na Base de Dados de Comparações Chave (*Key Comparison Database*, KCDB) do CIPM [14], a rastreabilidade metrológica ao SI precisa ser estabelecida, ou via a realização primária ou representação da unidade de medição em questão, ou via um outro INM ou ID que tenha uma CMC relevante com incerteza apropriada publicada no KCDB. Portanto, o Inmetro, como produtor deste MRC e Instituto Nacional de Metrologia, necessita seguir este critério adicional.

Nessa comparação interlaboratorial, o Inmetro poderia combinar os seus resultados apenas com outro INM ou Instituto Designado, com CMC publicada no KCDB. Contudo, nem todos os participantes atendiam a esses requisitos para que o valor de consenso fosse utilizado como o valor da caracterização. Além disso, a maior parte dos participantes não forneceu informações solicitadas as fontes de incerteza de seus resultados, e suas respectivas contribuições. Nenhum dos participantes forneceu informações sobre a origem dos valores da pureza dos padrões utilizados de forma que evidenciasse minimamente a rastreabilidade metrológica desses valores ao SI.

Portanto, o valor final da caracterização do candidato a MRC foi estabelecido como sendo o valor fornecido apenas pelo Inmetro e o valor de consenso da CI foi comparado a esse valor de caracterização com o objetivo de reforçar a sua confiabilidade.

4. Confidencialidade

Cada participante foi identificado por código individual que é conhecido somente pelo próprio participante e pela coordenação da CI. Conforme estabelecido na ficha de inscrição, a identificação dos laboratórios acreditados e em fase de acreditação será enviada para conhecimento da Coordenação Geral de Acreditação (Cgcre). O participante recebeu, via e-mail, o seu código de identificação correspondente à sua participação na CI. Este código foi utilizado como identificação do participante no preenchimento do formulário de registro de resultados. Os resultados poderão ser utilizados em trabalhos e publicações pelo Inmetro respeitando-se a confidencialidade de cada participante.

Conforme estabelecido no item 4.10.4 da ABNT ISO/IEC 17043:2011, em circunstâncias excepcionais, uma autoridade reguladora pode requerer os resultados e a identificação dos participantes da CI ao provedor. Se isto ocorrer, o provedor da CI notificará esta ação aos participantes.

5. Conclusões

Esta comparação interlaboratorial atingiu o seu propósito de estabelecer valores de consenso para as frações mássicas dos metabólitos AOZ, AMOZ, AHD e SEM no candidato a MRC em músculo de frango.

A maioria dos resultados reportados apresentaram concordância com os valores de consenso. Os resultados de caracterização do Inmetro foram todos considerados compatíveis com os valores de consenso e serão utilizados como valores de caracterização do candidato a MRC para as frações mássicas dos quatro metabólitos de nitrofuranos.

É importante ressaltar que não foi possível estabelecer a rastreabilidade metrológica do valor de consenso, uma vez que não há como comprovar a rastreabilidade metrológica do resultado de cada participante. Portanto, a rastreabilidade do valor de caracterização do Inmetro foi estabelecida, não pela comparação com o valor de consenso, mas pelo uso de procedimentos de medição potencialmente primários, pela utilização de padrões com pureza determinada com rastreabilidade e pela inclusão das possíveis fontes de erro como fontes de incerteza.

Os laboratórios convidados a participar dessa CI são, de alguma forma, laboratórios reconhecidamente competentes nas análises de nitrofuranos em matrizes alimentares. Contudo, resultados com erros sistemáticos podem ocorrer pontualmente. O propósito desta CI não foi avaliar o desempenho dos laboratórios, contudo, cabe a cada um dos participantes que obtiveram resultados não compatíveis com o valor de consenso, realizar uma avaliação crítica desses resultados de forma a buscar um melhor entendimento sobre possíveis fontes de erro dos seus métodos de análise e implementar medidas de melhoria.

Finalizando, o Inmetro, na figura do comitê técnico e de organização desta CI, agradece aos laboratórios que participaram desta comparação interlaboratorial, o que tornou possível a conclusão da etapa de caracterização do projeto de certificação deste candidato a MRC.

6. Participantes

Recebemos quatro (4) inscrições na Comparação Interlaboratorial para Caracterizar um Candidato a Materiais de Referência Certificado de Metabólitos de Nitrofuranos em Frango e todos enviaram seus resultados. A lista dos participantes que enviaram os resultados à coordenação desta CI é apresentada na Tabela 15. É importante ressaltar que a numeração da tabela é apenas indicativa do número de participantes na CI, não estando, em hipótese alguma, associada à identificação dos participantes na apresentação dos resultados.

Tabela 15 – Participantes.

Organização	
1.	Agência Federal de Proteção ao Consumidor e Segurança Alimentar, <i>Bundesamt für Verbraucherschutz</i> (BVL), Alemanha.
2.	Autoridade Alimentar Finlandesa, <i>Finnish Food Authority</i> , Finlândia.
3.	Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de São Paulo (LFDA/SP), Brasil.
4.	NSF Bioensaios, Brasil.

Total de participantes: 4.

7. Referências Bibliográficas

[1] EUROPEAN COMMISSION. Council Regulation 2901/93 of 18 October 1993, amending Annexes I, II, III and IV to Regulation (EEC) No 2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Communities*, L264, 1993.

[2] BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 9 de 27 de junho de 2003. Proíbe a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol e nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos.

Diário Oficial da União, Brasília, DF, 30 de junho de 2003, Seção 1, p. 4.

[3] McCracken, R. J.; Spence, D. E.; Floyd, S. D.; Kennedy, D. G. Evaluation of the residues of furazolidone and its metabolite, 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), in eggs. *Food Addit Contam*, v. 18, n. 11, p. 954-959, 2001.

[4] EUROPEAN COMMISSION. Diretiva 96/23/CE. Relativa às medidas de controlo aplicar a certas substâncias e aos seus resíduos nos animais vivos e respectivos produtos e que revoga as Directivas 85/358/CEE e 86/469/CEE e as Decisões 89/187/CEE e 91/664/CEE. *Jornal Oficial*. nº L 125 de 23/05/1996 p. 0010 – 0032.

- [5] CONTINI, E.; TALAMINI, D. J. D. Barreiras da União Européia para a importação de produtos de suínos e aves do Brasil. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE AVES E SUÍNOS, Florianópolis, SC. Anais eletrônicos...Florianópolis, 2004. Disponível em <http://www.cnpsa.embrapa.br/down.php?tipo=artigos&cod_artigo=28>. Acesso em junho de 2008.
- [6] EUROPEAN COMMISSION. European Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002, implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Communities, L22, 2002a.
- [7] Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Manual de garantia da qualidade analítica. / Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA/ACS, 2011. 227 p.
- [8] 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.
- [9] VIOLANTE, F. G. M. et al. Feasibility study for the development of a certified reference material of nitrofurans metabolites in chicken breast muscle from incurred samples. *Measurement*, v. 129, p. 368–374, 2018.
- [10] ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT ISO GUIA 35: Materiais de referência – Princípios gerais e estatísticos para certificação. Rio de Janeiro, 2012.
- [11] ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR ISO 17034:2017: requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência: São Paulo, 2017a. 28 p.
- [12] CCQM Guidance note: Estimation of a consensus KCRV and associated Degrees of Equivalence. Version 10, 2013. Disponível em: <https://www.bipm.org/cc/CCQM/Allowed/19/CCQM13-22_Consensus_KCRV_v10.pdf>. Acesso em: 09 jan. 2019.
- [13] SUSANTI, Y. et al. M estimation, S estimation, and MM estimation in robust regression. *International Journal of Pure and Applied Mathematics*, v. 91, n. 3, p. 349-360, 2014.
- [14] CIPM. *Decision CIPM/2009-24*. Traceability in the CIPM MRA. Sèvres: BIPM, 2009. Disponível em: https://www.bipm.org/cc/CIPM/Allowed/98/CIPM2009_24_TRAC_MRA_REV_13_OCT_2009.pdf. Acesso em: 20 dez. 2018.



Programa de Ensaio da Proficiência do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - PEP-Inmetro
Av. Nossa Senhora das Graças, 50 - Xerém - Duque de Caxias - RJ - Brasil CEP: 25250-020
Tel/Fax: +55 21 2679-9745 - www.inmetro.gov.br - E-mail: pep-inmetro@inmetro.gov.br