



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR
COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR
CENTRO REGIONAL DE CIÊNCIAS NUCLEARES DO NORDESTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS ENERGÉTICAS E
NUCLEARES

MARCELO DA ROCHA LEÃO DE MAGALHÃES

**ADEQUABILIDADE DE FARINHAS DE INSETOS COMESTÍVEIS
PARA A PRODUÇÃO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA**

Recife

2019

MARCELO DA ROCHA LEÃO DE MAGALHÃES

**ADEQUABILIDADE DE FARINHAS DE INSETOS COMESTÍVEIS
PARA A PRODUÇÃO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Tecnologias Energéticas e Nucleares.

Área de Concentração: Aplicação de Radioisótopos na Agricultura e no Meio Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Elvis Joacir De França

Recife

2019

Catálogo na fonte
Bibliotecário Carlos Moura, CRB-4 / 1502

M188a Magalhães, Marcelo da Rocha Leão de.
Adequabilidade de farinhas de insetos comestíveis para a
produção de material de referência. / Marcelo da Rocha Leão de
Magalhães. - Recife, 2019.
108 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Elvis Joacir de França.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG.
Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e
Nucleares, 2019.
Inclui referências.

1. Engenharia nuclear. 2. Metrologia em química. 3. Qualidade
analítica. 4. Insetos. I. França, Elvis Joacir de, orientador. II.
Título.

621.48 CDD (22. ed.)

UFPE/BDEN-2019/26

MARCELO DA ROCHA LEÃO DE MAGALHÃES

**ADEQUABILIDADE DE FARINHAS DE INSETOS COMESTÍVEIS
PARA A PRODUÇÃO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Tecnologias Energéticas e Nucleares.

Aprovada em: 28/06/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Elvis Joacir de França (Orientador)
CRCN-NE/CNEN

Prof^a. Dra. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Emerson Emiliano Gualberto de Farias (Examinador Externo)
CRCN-NE/CNEN

Prof^o. Dr. Clayton Augusto Benevides (Examinador Externo)
CRCN-NE/CNEN

Prof^o. Dr. Maria José de Filgueiras Gomes (Examinador Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Aos meus pais Manoel e Ana Lucia,
a minha esposa Renata,
e a toda minha família e amigos.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À CAPES pelo apoio financeiro.

Ao PROTEN pela oportunidade para desenvolvimento desta Tese de Doutorado.

A toda equipe do SEAMB do CRCN-NE por toda ajuda em todos os estágios desta pesquisa.

A todos os meus amigos, que me apoiaram e me deram forças, mesmo aos não tão presentes fisicamente, mas que sempre tiveram uma palavra de apoio.

A toda minha família, que sempre está presente em todos os momentos bons e ruins da minha vida.

À minha esposa Renata, por toda cumplicidade, apoio, dedicação e amor. Por compreender todos os momentos de ausência. E por ser a mulher maravilhosa e determinada em que me espelho muito.

Aos meus pais, que são a base de tudo que sou, e por estar sempre tão presentes em tudo em minha vida.

Ao meu orientador Elvis Joacir de França, por ser tão presente e solícito para mim e todos os seus alunos e por me indicar o melhor caminho no meio científico.

Ao Comitê de Acompanhamento formado pelos professores Dra. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo, Dra. Mércia Liane de Oliveira e Dr. Clayton Augusto Benevides.

À Secretaria de Pós-Graduação de Tecnologias Energéticas e Nucleares pelo suporte e urgência na resolução de problemas, e apoio prestado durante todo o doutorado

RESUMO

A produção de material de referência da matriz Inseto é motivada pelo fato desse grupo de animais ser considerado alimento proteico do futuro para a nutrição humana e animal dada a sustentabilidade na sua produção. Este trabalho estudou farinhas comerciais tenebrio gigante (CRCN1), grilo preto (CRCN2), tenebrio molitor (CRCN3) e barata cinérea (CRCN4) para selecionar o melhor candidato por MR. Os parâmetros avaliados foram umidade, granulometria, homogeneização, quarteamento, envasa e estabilidade. Dada à dificuldade na moagem das farinhas, foi utilizado sulfato de sódio como surfactante (50% v/v para CRCN1 e CRCN3; 30% v/v para CRCN2 e CRCN4). As misturas foram homogeneizadas, utilizando-se de moinho de jarros. Contudo, o candidato CRCN4 apresentou problemas de heterogeneidade, sendo necessária a alteração do método de homogeneização. Com o novo método, utilizando betoneira, os candidatos CRCN1, CRCN2 e CRCN3 foram satisfatoriamente homogeneizados, seguindo-se pelo quarteamento, envasamento e irradiação de frascos de 20 g cada (total de 40 frascos para cada candidato). Mesmo após a homogeneização, o candidato CRCN3 apresentou heterogeneidade para P e Na, que foi comprovada a partir da análise por EDXRF. Para os demais candidatos, foram compilados os resultados dos ensaios de granulometria, determinação de umidade, massa mínima (0,75 g e 1,25 g), homogeneidade da distribuição de elementos químicos e estabilidade a curto e longo prazos. Algumas propriedades químicas foram modificadas principalmente para a menor porção analítica testada (0,75 g), assim como ocorreu problemas de homogeneidade para determinação de Mn e de estabilidade a longo e curto prazos para as concentrações de Fe no candidato CRCN1. O candidato CRCN2 foi, então, selecionado como mais adequado para a produção de um Material de Referência Certificado de farinha de grilo preto, pois foram alcançados os melhores resultados em todos os ensaios de propriedades físicas e químicas. Foram quantificadas pelas técnicas analíticas independentes, FAES, FAAS e GFAS as concentrações de Ca, Cu, Fe, Mn e Zn, estimando-se, assim, os primeiros valores de referência para o material CRCN2.

Palavras-chave: Metrologia em Química. Qualidade Analítica. Insetos.

ABSTRACT

The production of reference material (RM) of the Insect matrix is motivated by the fact of this animal group to be considered as future protein supply for human and animal nutrition due to its sustainable production. This work has studied the commercial flours of giant mealworm (CRCN1), black cricket (CRCN2), mealworms (CRCN3) and lobster cockroach (CRCN4), commercially available in Camaragibe, Pernambuco State, Brazil, for selecting the best RM candidate. The evaluated steps were Water Content, Granulometry, Homogenization, Quartering, Packaging and Stability. Due to the difficulty of flour milling, sodium sulphate was used as surfactant (50% v/v for CRCN1 and CRCN3; 30% v/v for CRCN2 and CRCN4). The mixtures were homogenized, using a jar mill. However, the candidate CRCN4 presented problems of heterogeneity, being necessary the alteration of the homogenizing method. With the new procedure using concrete mixer, the candidates CRNC1, CRNC2 and CRNC3 were satisfactorily homogenized, followed by quartering and bottling in vials of 20 g each (total of 40 vials for each candidate). Even after homogenizing, the candidate CRCN3 presented heterogeneity for P and Na, which was assayed by EDXRF. For the other candidates, results from granulometry, humidity, minimum mass (0.75 g and 1.25 g), chemical element homogeneity and short-long term stability assays were compiled. Some chemical properties were modified mainly for the minor analytical portion tested (0.75 g), as well as problems for determination of Mn and long- and short-term stability for the Fe concentrations have occurred for the CRCN1 candidate. The CRCN2 candidate was therefore selected as most suitable for producing a Certified Reference Material of Black Cricket Flour because of the best results in all tests of physical and chemical properties. The concentrations of Ca, Cu, Fe, Mn and Zn were quantified by the independent analytical techniques FAAS, FAES and GFAAS, thereby providing the first reference values for the CRCN2 material.

Keywords: Metrology in Chemistry. Analytical Quality. Insects.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Classificação das áreas de aplicação dos MRs atualmente disponíveis.....	24
Figura 2	Fluxograma das etapas para produção de um material de referência.....	26
Figura 3	Quantidade de espécies de seres vivos reconhecidas.....	31
Figura 4	Quantidade (g) de proteína e gordura em 100 g de alimentos.....	34
Figura 5	Concentração de cobre, ferro, manganês e zinco em carnes e em insetos utilizados como alimentos.....	34
Figura 6	Eficiência de produção convencional de carne e grilos.....	35
Figura 7	Diagrama de blocos de um espectrômetro de absorção atômica.....	37
Figura 8	Esquema de uma lâmpada de cátodo oco.....	38
Figura 9	Funcionamento do espectrômetro de absorção atômica com atomização por chama.....	39
Figura 10	Fluxograma de funcionamento de um EDXRF.....	40
Figura 11	Espécies de insetos utilizadas para a produção de farinha. A. Larvas de tenébrio gigante – <i>Zophobas morio</i> . B. Larvas de tenébrio comum – <i>Tenebrio molitor</i>	41
Figura 12	Espécies de barata cinérea – <i>Nauphoeta cinérea</i> empregada para a produção de farinha.....	42
Figura 13	Espécies de grilo preto – <i>Gryllus assimilis</i>	42
Figura 14	Esquema dos ensaios realizados para a escolha do candidato a material de referência.....	43
Figura 15	Diagrama de Ishikawa identificando as tarefas críticas para a garantia do controle da qualidade.....	44
Figura 16	Laboratório adaptado para a preparação de amostras. A. Isolamento da estação de moagem de amostras. B. Barreira nas portas do laboratório para evitar contaminantes externos. C. Barreira nas janelas do laboratório para isolamento do ambiente.....	45
Figura 17	Moinho planetário de bolas modelo PM200 (A) e detalhe do sistema de moagem com os vasos (B).....	46

Figura 18	Aspecto da amostra de farinha de insetos em moinho de bolas.....	46
Figura 19	Teste da mistura com surfactante para a moagem da amostra de grilo preto.....	47
Figura 20	cominuição das amostras. A. Peneiramento das amostras em peneira de 0,25 mm. B. Detalhe da amostra de grilo antes e depois da cominuição.....	47
Figura 21	Homogeneização de amostras. A. Moinho de jarros com bolas de alumina sinterizada. B. Amostra heterogênea após sete dias de homogeneização.....	48
Figura 22	Processo de homogeneização utilizando betoneira.....	49
Figura 23	Amostra de barata cinérea após homogeneização na betoneira.....	49
Figura 24	Ambiente utilizado para o quarteamento das amostras em capela de fluxo laminar.....	50
Figura 25	Irradiador com fonte de Co^{60} Gammacell 220 Excel-MDS Nordion do Departamento de Energia Nuclear da UFPE.....	51
Figura 26	Amostra do candidato a Material de Referência CRCN 3 com indícios de heterogeneidade.....	52
Figura 27	Agitador magnético com conjunto de peneiras.....	54
Figura 28	Histogramas da distribuição dos resíduos obtidos a partir dos dados de Na e P e os valores da probabilidade p do teste de Shapiro-Wilk para avaliação de homogeneidade das concentrações do material CRCN3.....	65
Figura 29	Valores médios de umidade residual e suas respectivas incertezas em nível de 95% de confiança obtidos pelos diferentes métodos estudados.....	67
Figura 30	Distribuição individual para os frascos A, B e C e distribuição acumulada dos tamanhos de partículas do candidato a Material de Referência CRCN1.....	69
Figura 31	Distribuição individual para os frascos A, B e C e distribuição acumulada dos tamanhos de partículas do candidato a Material de Referência CRCN2.....	70

Figura 32	Desvio padrão relativo - DPR em função da massa e o desvio padrão de repetitividade (s_r) para o estudo de Massa mínima por FAAS para os elementos químicos Cu, Fe e Mn no Candidato a MR CRCN1.....	72
Figura 33	Desvio padrão relativo em função da massa e o desvio padrão de repetitividade para o estudo de Massa mínima por FAAS para os elementos químicos Cu, Fe e Mn no Candidato a MR CRCN2.....	75
Figura 34	Valores de índice z obtidos para Fe e Mn por FAAS no Candidato a MR CRCN1.....	76
Figura 35	Valores de índice z obtidos para cobre, ferro e manganês por FAAS no Candidato a MR CRCN2.....	77
Figura 36	Histogramas da distribuição dos resíduos obtidos a partir dos dados de Fe e Mn e os valores da probabilidade p do teste de Shapiro-Wilk para avaliação de homogeneidade das concentrações de Fe e Mn do material CRCN1.....	79
Figura 37	Histogramas da distribuição dos resíduos obtidos a partir dos dados de Cu, Fe e Mn e os valores da probabilidade p do teste de Shapiro-Wilk para avaliação de homogeneidade das concentrações de Cu, Fe e Mn do material CRCN2.....	79
Figura 38	Comparação entre tratamentos (freezer, estufa e ambiente) obtidas em diversos tempos (1 = 15 dias; 2 = 30 dias; 3 = 60 dias) para Fe no candidato CRCN1.....	83
Figura 39	Comparação entre médias dos tratamentos (freezer, estufa e ambiente) obtidas em diversos tempos (1 = 15 dias; 2 = 30 dias; 3 = 60 dias) para Mn no Candidato a MR CRCN1.....	84
Figura 40	Comparação entre médias dos tratamentos (freezer, estufa e ambiente) obtidas em diversos tempos (1 = 15 dias; 2 = 30 dias; 3 = 60 dias) para Cu no Candidato a MR CRCN2.....	86
Figura 41	Comparação entre médias dos tratamentos (freezer, estufa e ambiente) obtidas em diversos tempos (1 = 15 dias; 2 = 30 dias; 3 = 60 dias) para Fe no Candidato a MR CRCN2.....	88
Figura 42	Comparação entre médias nos diversos tempos (1 = 15 dias; 2 = 30 dias; 3 = 60 dias) para Fe no Candidato a MR CRCN2.....	88

Figura 43	Comparação entre médias dos tratamentos (freezer, estufa e ambiente) obtidas em diversos tempos (1 = 15 dias; 2 = 30 dias; 3 = 60 dias) para Mn no Candidato a MR CRCN2.....	90
Figura 44	Comparação entre as concentrações médias obtidas e seus respectivos intervalos de confiança em nível de 95% de confiança em diversos tempos (dia 0; 15 dias; 30 dias; 60 dias e 360 dias) para Fe e Mn no Candidato a MR CRCN1.....	91
Figura 45	Comparação entre médias dos em diversos tempos (dia 0; 15 dias; 30 dias; 60 dias e 360 dias) para Cu, Fe e Mn no Candidato a MR CRCN2.....	92
Figura 46	Comparação entre médias e suas respectivas incertezas em nível de 95% de confiança para Ca utilizando amostras independentes para Candidato a MR CRCN2 por FAAS e FAES.....	96
Figura 47	Comparação entre médias e suas respectivas incertezas em nível de 95% de confiança para Cu utilizando amostras independentes para Candidato a MR CRCN2 por FAAS e GFAAS.....	96
Figura 48	Comparação entre médias e suas respectivas incertezas em nível de 95% de confiança para Fe utilizando amostras independentes para Candidato a MR CRCN2 por FAAS e GFAAS.....	97
Figura 49	Comparação entre médias e suas respectivas incertezas em nível de 95% de confiança para Mn utilizando amostras independentes para Candidato a MR CRCN2 por FAAS e GFAAS.....	97
Figura 50	Comparação entre médias e suas respectivas incertezas em nível de 95% de confiança para Zn utilizando amostras independentes para Candidato a MR CRCN2 por FAAS e GFAAS.....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características a serem consideradas para a disponibilidade de material de referência certificado.....	30
Tabela 2	Parâmetros utilizados nas análises químicas por FAAS.....	58
Tabela 3	Parâmetros utilizados nas análises químicas por GFAAS.....	59
Tabela 4	Parâmetros utilizados nas análises químicas por FAES.....	60
Tabela 5	Testes estatísticos utilizados para cada etapa realizada para adequabilidade do candidato a MR.....	60
Tabela 6	Resultados da ANOVA para a avaliação da homogeneidade intra e inter-frascos das concentrações de Na e P no candidato a MR CRCN3.....	66
Tabela 7	Média das concentrações, constante de amostragem K_s (g), erro de amostragem $K_s^{0,5}$ (%) e erro de amostragem associado à análise química do frasco inteiro (20 g) R_{20} (%) para o candidato a MR CRCN1.....	71
Tabela 8	Média das concentrações, constante de amostragem K_s (g), erro de amostragem $K_s^{0,5}$ (%) e erro de amostragem associado à análise química do frasco inteiro (20 g) R_{20} (%) para o candidato a MR CRCN2.....	74
Tabela 9	Resultados da ANOVA para a avaliação da homogeneidade intra e inter-frascos das concentrações de Fe e Mn no candidato a MR CRCN1.....	80
Tabela 10	Resultados da ANOVA para a avaliação da homogeneidade intra e inter-frascos das concentrações de Cu, Fe e Mn no candidato a MR CRCN2.....	81
Tabela 11	Resultados da análise de variância para medidas repetidas no tempo de Fe no candidato a MR CRCN1	82
Tabela 12	Aproximação multivariada da ANOVA dos dados de Fe para experimentos de parcelas repetidas no tempo referentes ao candidato CRCN1.....	83
Tabela 13	Resultados da análise de variância para medidas repetidas no tempo de Mn no candidato a MR CRCN1.....	84

Tabela 14	Aproximação multivariada da análise de variância dos dados de Mn para experimentos de parcelas repetidas no tempo referentes ao candidato CRCN1.....	85
Tabela 15	Resultados da análise de variância para medidas repetidas no tempo de Cu no candidato a MR CRCN2.....	86
Tabela 16	Aproximação multivariada da análise de variância dos dados de Cu para experimentos de parcelas repetidas no tempo referentes ao candidato CRCN2.....	87
Tabela 17	Resultados da análise de variância para medidas repetidas no tempo de Fe no candidato a MR CRCN2.....	87
Tabela 18	Aproximação multivariada da análise de variância dos dados de Fe para experimentos de parcelas repetidas no tempo referentes ao candidato CRCN2.....	89
Tabela 19	Resultados da análise de variância para medidas repetidas no tempo de Mn no candidato a MR CRCN2.....	89
Tabela 20	Aproximação multivariada da análise de variância dos dados de Mn para experimentos de parcelas repetidas no tempo referentes ao candidato CRCN2.....	90
Tabela 21	Valores obtidos e certificados e suas respectivas incertezas analíticas expandidas em nível de 95% de confiança para o material de referência TM1 por FAAS.....	94
Tabela 22	Valores obtidos e certificados e suas respectivas incertezas analíticas expandidas em nível de 95% de confiança para o material de referência TM1 por FAES.....	94
Tabela 23	Valores obtidos e certificados e suas respectivas incertezas analíticas expandidas em nível de 95% de confiança para o material de referência TM1 por GFAAS.....	95
Tabela 24	Estimativa das incertezas estimadas para cada elemento químico certificado.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
CRCN-NE	Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste
EDL	<i>Electrodeless Discharge Lamp</i> / Lâmpa de Descarga sem Eletrodo
EDXRF	<i>Energy Dispersive X-Ray Fluorescence</i> / Fluorescência de raios-X por Dispersão de Energia
FAAS	<i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i> / Espectrometria de Absorção Atômica com Chama
FAES	<i>Flame Atomic Emission Spectrometry</i> / Espectrometria de Emissão Atômica com Chama
GFAAS	<i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i> / Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite
HCL	<i>Hollow-Cathode Lamp</i> / Lâmpada de Cátodo Oco
IAEA	<i>International Atomic Energy Agency</i> / Agência Internacional de Energia Atômica
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
MR	Material de Referência
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
SI	Sistema Internacional de Unidades
SRM	<i>Standard Reference Material</i> / Material de Referência Certificado
VIM	<i>Vocabulaire International des Termes Fondamentaux et Generaux de Metrologie</i> / Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	MATERIAL DE REFERÊNCIA	21
2.2	A IMPORTÂNCIA DA CONFIABILIDADE NAS ANÁLISES QUÍMICAS	22
2.3	PRODUÇÃO DE UM MATERIAL DE REFERÊNCIA.....	25
2.3.1	Umidade.....	25
2.3.2	Granulometria	27
2.3.3	Massa mínima exequível para análise química.....	27
2.3.4	Homogeneidade.....	27
2.3.5	Estabilidade.....	28
2.3.6	Certificação das concentrações de elementos químicos	29
2.3.7	Escolha do tipo de matriz do material de referência.....	29
2.4	A MATRIZ INSETOS	31
2.4.1	A utilização dos insetos em análises ambientais	32
2.4.2	Insetos como alimentos.....	33
2.4.3	Quantificação de elementos químicos em insetos	35
2.5	TÉCNICAS ANALÍTICAS.....	36
2.5.1	Espectrometria de Absorção Atômica	36
2.5.2	Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia - EDXRF	39
3	MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1	SELEÇÃO DO MATERIAL.....	41
3.2	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	42
3.2.1	Preparação das amostras	45
3.2.2	Homogeneização	48
3.2.3	Quarteamento e Envase	50
3.2.4	Esterilização dos candidatos a Material de Referência.....	51

3.2.5	Determinação da massa mínima exequível	52
3.2.6	Determinação de umidade residual.....	53
3.2.7	Análise granulométrica	53
3.2.8	Avaliação da homogeneidade inter e intra-frascos.....	54
3.2.9	Estudo da estabilidade	55
3.2.10	Certificação das concentrações de elementos químicos	55
3.3	DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS QUÍMICOS	56
3.3.1	EDXRF	56
3.3.2	Tratamento químico das amostras.....	57
3.3.3	FAAS.....	58
3.3.4	GFAAS.....	59
3.3.5	FAES	59
3.4	ANÁLISE DOS RESULTADOS	60
3.4.1	Incerteza analítica.....	61
3.4.2	Análises estatísticas	61
3.4.2.1	Avaliação da normalidade	61
3.4.2.2	Massa mínima.....	62
3.4.2.3	Avaliação da homogeneidade	62
3.4.2.4	Avaliação da Estabilidade	62
3.4.2.5	Calculo da incerteza para certificação	63
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1	CANDIDATO A MR CRCN3 - ESTUDO DE HETEROGENEIDADE	65
4.2	CANDIDATOS A MR CRCN1 e CRCN2	66
4.2.1	Determinação da umidade residual	67
4.2.2	Granulometria	68
4.2.3	Estudo da Massa mínima	71
4.2.4	Estudo da Homogeneidade	76

4.2.5	Estudo da Estabilidade.....	81
4.2.5.1	Estabilidade a curto prazo.....	82
4.2.5.2	Estabilidade a longo prazo.....	91
4.2.6	Certificação das concentrações de elementos químicos	93
5	CONCLUSÕES.....	100
	REFERÊNCIAS	102

1 INTRODUÇÃO

Na realização de análises químicas, a garantia da qualidade dos procedimentos analíticos deve ser criteriosa, prevenindo possíveis falhas durante a análise para aumentar o grau de confiabilidade dos resultados. Isto ocorre principalmente quando se comparam resultados obtidos de uma amostra de matriz específica com valores de referência de um material conhecido. Esse material deve apresentar homogeneidade comprovada, tornando possível a quantificação e identificação de analitos de interesse na amostra, dentro dos padrões de excelência em medições (ABNT, 2000a). Outra aplicação do uso de Materiais de Referência (MRs)/Materiais de Referência Certificados (MRCs) é a validação de métodos analíticos a partir da garantia da qualidade das análises químicas.

Porém, há escassez de materiais de referência, principalmente no Brasil, considerando todas as análises químicas e matrizes a serem realizadas, o controle da qualidade e a garantia de comparabilidade dos resultados analíticos. Tais materiais possuem alto custo econômico dadas as etapas de certificação e a morosidade na produção e a maioria são produzidos pela Alemanha, Austrália, Estados Unidos da América e Inglaterra (ALVES; MORAES, 2002). De acordo com o Banco de Dados Internacional para Materiais de Referência Certificados - COMAR (BAM, 2019), estão disponíveis no mercado cerca de 10.000 MRs de diversas propriedades analíticas e com as mais variadas aplicações. Desse total, apenas 141 materiais de referência de produção brasileira foram encontrados, destacando-se os produzidos pelo Centro de Tecnologia Mineral – CETEM-RJ, pelo Instituto nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO, pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas – IPT-SP e pela Visomes Comercial Metrológica LTDA-SP.

Além disso, não há materiais de referência brasileiros cadastrados no COMAR para análises químicas de biomonitorios e alimentos como os insetos, provavelmente devido às dificuldades na obtenção de materiais dessa matriz, mesmo que sejam considerados a classe de animais mais bem-sucedida de todos os tempos com ampla distribuição e resiliência em condições adversas. Portanto, estudá-los torna-se bastante interessante devido à potencialidade de emprego em estudos de avaliação de qualidade ambiental de ecossistemas aquáticos (AWRAHMAN et al., 2016), de áreas de mineração abandonadas (WU; LEGG, 2011), de ecossistemas terrestres naturais (MAGALHÃES, 2015), e até de ambientes urbanos (SANTOS, 2016). Nesses

tecnosistemas, os resultados vêm sendo bastante relevantes com informações detalhadas para a avaliação de impactos ambientais (SANTOS, 2016).

Por outro lado, a alta capacidade de reprodução e porte reduzido desse grupo de seres vivos criam inúmeras possibilidades de fontes sustentáveis de proteína de alta qualidade para alimentação humana (UNIVERSITY FOUNDATION, 2016), visto que diversas espécies vêm sendo utilizadas para consumo humano em diferentes países. De modo geral, a entomofagia proporciona inúmeros benefícios para a saúde devido ao seu alto valor nutricional, sendo ótima conversora de fontes alimentícias diversas em proteínas e importante para o desenvolvimento sustentável, uma vez que produz consideravelmente menos gases de efeito estufa. Além disso, utiliza pouco espaço tanto para produção quanto para a alimentação e reduz bastante às emissões de amônia. Considerando-se a subsistência, incluindo fatores econômicos e sociais, os insetos demandam baixa tecnologia para produção e baixo investimento de capital, sendo factível para as diversas classes de trabalhadores urbanos e rurais (VAN HUIS et al., 2013). Contudo, a composição química dessas matrizes é fundamental para a aplicação para a confecção de alimentos.

As técnicas analíticas são primordiais para promover a escolha de matriz apropriada para a produção de um material de referência certificado. Neste sentido, o Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN-NE) dispõe de Espectrometrias de Absorção Atômica com Chama - FAAS e com Forno de Grafite - GFAAS para a quantificação de elementos químicos em diversas amostras, incluindo insetos (MAGALHÃES, 2015; SANTOS, 2016). Como técnica auxiliar para a busca de material de referência apropriado para a análise de insetos, tem-se a Espectrometria por Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia – EDXRF, técnica rápida, multielementar e de baixo custo (MAGALHÃES, 2015; SANTOS, 2016).

Em ambas as situações, as condições de análises químicas de insetos podem ser desfavoráveis, pois cada matriz possui peculiaridades analíticas como a presença de gorduras, fibras musculares e o exoesqueleto de quitina, que dificultam o tratamento químico (BARNES et al., 2014). O efeito de matriz também prejudica a comutatividade, ou seja, a propriedade do MR em atender diversos métodos analíticos para diversos tipos de amostras. Assim, torna-se necessário a disponibilização de MRs com homogeneidade e estabilidade garantidas com características semelhantes às das amostras de rotina (FERREIRA et al., 2016).

A matriz inseto foi escolhida por inexistir MRs para este grupo, o que dificulta o acesso e, conseqüentemente, aumenta os custos das análises. Devido ao exposto este trabalho visou estabelecer as condições físicas e químicas adequadas para a produção de um Material de Referência - MR utilizando farinha de insetos de quatro Candidatos CRCN1, CRCN2, CRCN3, com base no desempenho dos candidatos a partir de estudo dos seguintes objetivos específicos:

- Determinar a massa mínima de amostra para quantificação apropriada de elementos químicos;
- Avaliar a homogeneidade das concentrações dos elementos químicos intra- e inter-amostras, corroborando o processo de produção dos candidatos a MR no CRCN-NE;
- Avaliar a estabilidade dos analitos Fe, Cu e Mn quanto às diferentes condições ambientais (condições de transporte – Estabilidade a curto prazo);
- Avaliar a estabilidade dos analitos Fe, Cu e Mn quanto ao decorrer do seu tempo de prateleira (estabilidade a longo prazo);
- Quantificar os elementos químicos Ca, Cu, Fe, Mn e Zn por GFAAS, FAAS e FAES e estimar as suas respectivas incertezas analíticas baseado nas normas ABNT ISO Guias 30,31,32,33,34 e 35, certificando-se os valores de Ca, Cu, Fe, Mn e Zn.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MATERIAL DE REFERÊNCIA

Entende-se Material de Referência como um material, suficientemente homogêneo e estável a uma ou mais propriedades específicas, que foi produzido para uma determinada utilização. O termo “Material de Referência” é um considerado um termo genérico, e é utilizado tanto no universo de Materiais de Referência (MR’s e MRC’s), bem como para o subgrupo que compreende apenas os materiais de referência não certificados. Já o material de referência certificado é caracterizado por um procedimento metrologicamente válido para uma ou mais propriedades específicas e acompanhando de um certificado que fornece o valor da propriedade especificada, sua incerteza associada e uma declaração de rastreabilidade metrológica (ABNT, 2012).

As propriedades do material de referência podem ser quantitativas ou qualitativas e seus usos podem incluir a calibração de um sistema de medição, avaliação de um procedimento de medição, atribuindo valores para outros materiais e controle de qualidade do método analítico. Porém um material de referência apenas pode ser utilizado para uma única finalidade de uma determinada medida, por exemplo, não pode ser usado, ao mesmo tempo, como calibrador e como material de controle de qualidade para a mesma metodologia analítica. Por outro lado, um único material de referência pode ser usado para avaliar a confiabilidade de um processo de medição, durante o seu desenvolvimento e validação. Depois disso, o mesmo material pode ser utilizado para o controle de medições subsequentes (EMONS et al., 2006).

De acordo com a norma ABNT (2001), laboratórios de análises químicas, acreditados ou em fase de acreditação, devem demonstrar a rastreabilidade ao Sistema Internacional. Para isso, dentre os requisitos necessários para esses laboratórios, está a utilização de Materiais de Referência – MRs ou Materiais de Referência Certificados – MRCs com matriz semelhante à amostra a ser analisada e faixa de concentração compatível com os analitos a serem quantificados (ISO 13528, 2005). No entanto, é essencial que, mesmo laboratórios de análises químicas não acreditados, utilizem MRs apropriados para a demonstração da qualidade do procedimento analítico de suas análises, favorecendo a comparabilidade dos resultados analíticos (IAEA, 2003; FERREIRA et al., 2016).

Nas análises químicas, a garantia da qualidade dos procedimentos analíticos deve ser criteriosa, prevenindo possíveis falhas durante a análise para aumentar o grau de confiabilidade dos resultados. Isto ocorre principalmente quando se comparam resultados obtidos de uma amostra de matriz específica com valores de referência de um material conhecido. Esse material tem valores de concentração mássica homogeneamente distribuídos, tornando possível a quantificação e identificação de analitos de interesse na amostra, dentro dos padrões de excelência em medições (ABNT, 2000a). Outra aplicação do uso de MRs/MRCs é a validação de métodos analíticos a partir da garantia da qualidade das análises químicas.

2.2 A IMPORTÂNCIA DA CONFIABILIDADE NAS ANÁLISES QUÍMICAS

A comprovação da qualidade dos procedimentos analíticos é necessária para a garantia de confiabilidade das análises químicas em praticamente todas as esferas da ciência. Existe uma infinidade de procedimentos que atuam diretamente na obtenção de dados confiáveis e comparáveis, tais como a competência do analista, as verificações de rotina, a validação de procedimentos analíticos e o correto uso de Material de Referência - MR e Material de Referência Certificado – MRC. A aplicação destes métodos são a base da Metrologia em Química para medições precisas e a validação de resultados analíticos (KUPIEC et al., 2009).

De acordo com o Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM) (JCGM, 2012), MR é definido como material, suficientemente homogêneo e estável com relação a propriedades específicas, preparado para se adequar a uma utilização pretendida numa medição ou num exame de propriedades qualitativas. MRC é um material de referência acompanhado de uma documentação emitida por uma entidade reconhecida, a qual fornece um ou mais valores de propriedades especificadas com as incertezas e as rastreabilidades associadas, utilizando procedimentos validados (JCGM, 2012). A definição de Material de Referência Padrão – SRM (*Standard Reference Material*) é utilizada pelo NIST (*National Institute of Standards and tchnology*) para a indicação de MRC com elevado nível metrológico (QUINÁGLIA, 2012) e propriedades bem definidas.

Outra propriedade importante é a comutatividade de um material de referência, que é a propriedade de um MR expressa pelo grau de concordância entre os resultados de medição obtidos para uma dada grandeza desse material a partir de dois

procedimentos de medição e a relação entre os resultados de medição para outras amostras similares (JCGM, 2012). Um dos principais responsáveis pela característica de não comutatividade de um MR é o efeito de matriz, contudo, a falta de especificidade dos métodos utilizados também pode ser responsável pela dificuldade de garantia de comutatividade do material. O efeito de matriz é definido como a influência de uma propriedade da amostra, independente da presença do analito, sobre a medição e, assim, sobre o valor da concentração a ser medida (VESPER et al., 2007).

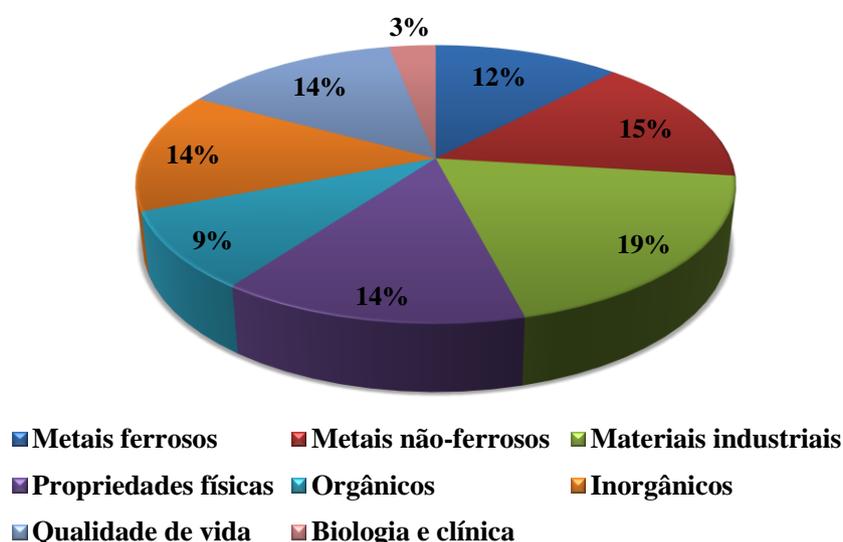
Materiais de referência são recomendados em todas as normas para a garantia da qualidade e competência de laboratórios de ensaio e calibração (ABNT, 2001; ISO 13528, 2005; EURACHEM, 2002). É empregado na calibração de equipamentos, a avaliação de metodologias e até na atribuição de valores a outros materiais ou padrões de medição (ABNT, 2016; PANITZ, 2003; SILVA NETO, 2012).

Na rotina de um laboratório de análises químicas são necessários materiais de referência que, após as medições, permitam aferir o quanto os valores obtidos estão próximos aos esperados, relacionando-os com as propriedades de interesse, em diferentes matrizes reais. É conveniente que todo material de referência seja acompanhado de suas especificações de origem e processamento, a fim de garantir sua rastreabilidade às unidades de medidas do sistema internacional (SILVA NETO, 2012; ISO 17025, 2001), e podem ainda ser acompanhados de um certificado de análise no qual uma ou mais propriedades, como por exemplo, as concentrações de elementos químicos, são garantidas por meio de procedimentos bem estabelecidos em termos de rastreabilidade (ABNT, 2016; PANITZ, 2003). A obtenção exata da unidade, nos quais os valores são expressos com as respectivas incertezas analíticas dentro dos limites estabelecidos para um nível de confiança satisfatório, também caracteriza esse tipo de material. Os resultados obtidos na análise do material de referência devem ser comparados aos valores determinados no certificado deste material (exatidão) e, no caso de discrepâncias para o intervalo da incerteza (precisão) indicado neste certificado, devem ser procuradas as causas do viés para tentar eliminá-las ou aceitá-las dependendo do rigor de precisão estabelecido para os procedimentos analíticos (ISO 17025, 2005; ISO 13528, 2005; EURACHEM, 2002).

Atualmente existe o banco de materiais de referência COMAR (*The Code d'Indexation des Matériaux de Référence*) disponível para consulta *on-line* com mais de 8.000 materiais de referência certificados, fornecidos por cerca de 240 produtores, em mais de 27 países, e encontram-se classificados em 8 áreas de aplicação como se pode

observar na Figura 1 (COMAR, 2019). Materiais de referência são geralmente produzidos por agências (institutos) estrangeiras, tais como o *National Institute of Standards and Technology* - NIST, a *International Atomic Energy Agency* – IAEA, *National Water Research Institute* – NWRI e o *Institute for Reference Materials and Measurements* – IRMM. No Brasil, destacam-se como os principais produtores o Instituto de Pesquisas Tecnológicas – IPT, o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO e o Centro de Tecnologia Mineral – CETEM (QUINÁGLIA, 2012).

Figura 1 – Classificação das áreas de aplicação dos MRs atualmente disponíveis.



Fonte: Adaptado de COMAR (2019).

Com respeito ao grande número de materiais de referência atualmente encontrados e a importância para a prática laboratorial, existe uma lacuna na disponibilidade atual de materiais de referência para os mais diversos tipos de matrizes, especialmente ambientais e de alimentos. Essa lacuna é ainda mais crítica quando se trata de materiais de referência desenvolvidos no Brasil e compatíveis às necessidades das rotinas analíticas realizadas no país. Embora não seja muito bem esclarecido devido à carência de normas para laboratórios de ensaios brasileiros, é muito recomendada a aplicação de materiais de referência para o controle de qualidade dos procedimentos analíticos de pesquisas científicas. A problemática é intensificada pela ausência de

materiais de referência acessíveis e comutáveis para a grande parte dos laboratórios de análises químicas no Brasil.

2.3 PRODUÇÃO DE UM MATERIAL DE REFERÊNCIA

A produção de um material de referência não é tarefa fácil para os laboratórios de pesquisa, pois tal atividade requer o estabelecimento e o conhecimento de diversos parâmetros relacionados com as medições. Ao material de referência devem ser garantidas a sua homogeneidade, estabilidade, o tamanho de partículas, a composição química e as incertezas analíticas de medição, entre outras características físico-químicas (SILVA NETO, 2012). A *International Organization for Standardization* - ISO elaborou uma série de guias para preparação, aplicação, avaliação e certificação de materiais de referência. Dentre estas, a ABNT ISO GUIA 35 Materiais de referência - Princípios gerais e estatísticos para a certificação (ABNT, 2012) relaciona todos os testes e as determinações que devem ser realizados para que um material de referência produzido seja considerado adequado e possa ser utilizado como referência para ensaios laboratoriais. Na Figura 2, encontram-se as etapas básicas de produção, avaliação e liberação para uso de um material de referência.

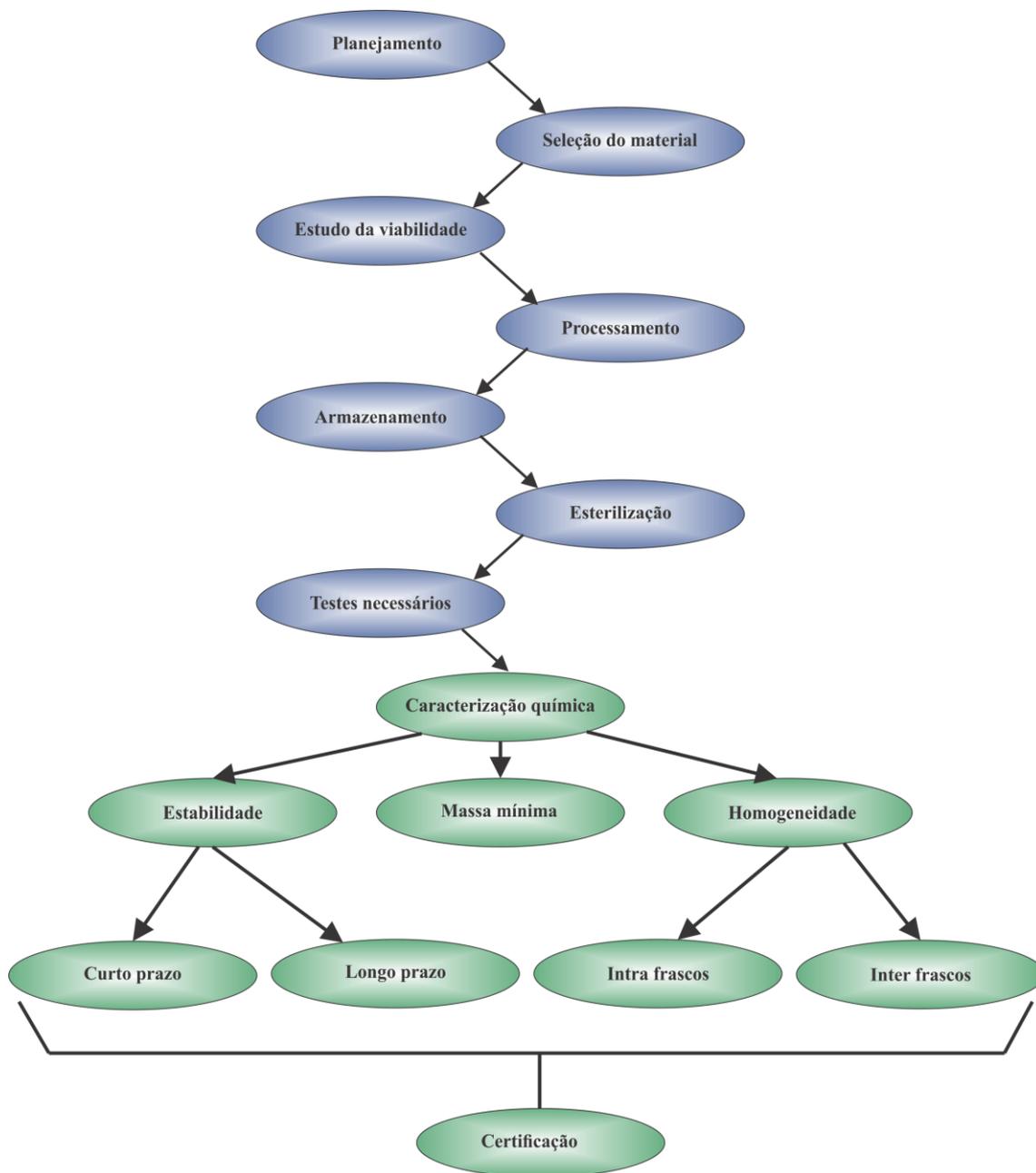
As principais etapas envolvidas na avaliação de candidatos a material de referência de matriz insetos para sua utilização em laboratórios de análises químicas são resumidas nas seções a seguir.

2.3.1 Umidade

É o estado determinado pela quantidade de vapor de água residual contido em um corpo (PANITZ, 2003), sendo considerado parâmetro de extrema importância, já que influencia todos os demais componentes do material de referência. A correção em massa seca é fundamental para a expressão dos resultados analíticos e deve ser realizada em todo ensaio a partir da determinação de umidade com alta precisão e acurácia (CAMPBELL-PLATT, 2015). Diversos métodos podem ser utilizados entre eles destacam-se a secagem em estufa, secagem a frio e a vácuo. Após esses procedimentos, a umidade pode ser obtida por meio da estabilização de pesagens sucessivas em balança analítica. A massa da porção-teste utilizada para os ensaios também deve ser testada

para garantir resultados confiáveis e sem desperdiçar grande quantidade do material de referência (CARDOSO et al., 2010).

Figura 2 - Fluxograma das etapas para produção de um material de referência.



Fonte: Adaptado de Emons et al. (2004).

2.3.2 Granulometria

Diferentes tamanhos de partículas em um material de referência podem interferir na homogeneidade dos analitos devido ao fracionamento e às diversas composições químicas de cada fração. Essa característica é menos crítica para materiais de origem biológica em comparação com os materiais de matriz geológica. Esses últimos geralmente são formados por partículas e agregados com frações de distintas composições químicas (KRAMER et al., 2003). Uma maneira simplificada para avaliar o tamanho das partículas da amostra é a pesagem antes e após procedimento em agitador de peneiras, em peneiras com tamanhos de malha conhecidos e padronizados, embora análises mais acuradas possam ser realizadas por meio de técnicas mais específicas tais como a granulometria a laser e a espectrometria UV-visível (BAYLE et al., 2005).

2.3.3 Massa mínima exequível para análise química

Segundo a ISO Guia 34 (2012), o estabelecimento de massa mínima para a porção analítica do material de referência para utilização nas análises laboratoriais é condição essencial para evitar erros e discrepâncias dos valores certificados. Para tal, diferentes massas do material são submetidas a análises químicas e comparadas por meio de ANOVA para avaliação da repetitividade e das diferenças significativas entre os resultados de concentrações de elementos químicos. A massa mínima de amostra pode variar com o tipo de material de referência. Materiais de referência de matrizes geológicas, por serem mais enriquecidos em elementos químicos, utilizam pequena porção analítica (100 mg – 150 mg). Para aqueles de matrizes biológicas, a massa mínima é bastante variável, atingindo até 2,5 g em material de referência de leite – *SRM 1549a Whole Milk Powder* para a análise de vitaminas.

2.3.4 Homogeneidade

Essencial para a manutenção das propriedades físico-químicas do material, esse ensaio visa avaliar se porções analíticas retiradas de recipientes selecionados aleatoriamente do lote preparado possuem as mesmas características macroscópicas,

físicas e químicas (CARDOSO et al., 2010). Um material é considerado homogêneo se subamostras de um lote desse material estão em concordância com os valores e as incertezas pré-estabelecidas para alguns parâmetros. Para a avaliação da homogeneidade é importante que sejam avaliados atributos em 2% a 5% do total de unidades do lote produzido durante a estocagem. A variação entre as unidades analisadas deve ser incluída na incerteza analítica expressa no certificado. Com os resultados do ensaio de homogeneidade, determina-se também a quantidade mínima recomendada para utilização do material de referência em análises laboratoriais. O teste estatístico preconizado para avaliação da homogeneidade é a análise de variâncias - ANOVA, embora atualmente já tenham sido observados ensaios utilizando análise multivariada - MANOVA (SANTOS et al. 2015).

2.3.5 Estabilidade

É a avaliação da possível degradação do material após diferentes períodos de tempos subsequentes à sua preparação. Essa degradação pode ser decorrente de exposição do material à temperatura, luz, umidade e oxigênio. Microrganismos, entre outros fatores, são capazes de alterar as propriedades físico-químicas do material (CARDOSO et al., 2010).

A embalagem é uma etapa crucial na manutenção da estabilidade dos materiais de referência que devem ser acondicionados em recipientes que evitem o contato com oxigênio e umidade minimizando as interferências do meio externo (FAURE; WAGSTAFFE, 1993). De maneira simples, o teste de estabilidade é realizado sob duas modalidades:

- Exposição do material a uma alta temperatura durante até quatro semanas, com a finalidade de avaliar possíveis condições adversas durante o transporte inadequado;
- Ensaio realizado nas condições de estocagem por grandes períodos de modo a estudar a estabilidade do material durante o armazenamento dentro do seu prazo de validade.

Para este fim, diversos parâmetros são medidos durante um intervalo de tempo de cerca de um ano. Quando há efeito temporal, a incerteza do parâmetro estabilidade é avaliada por análise de regressão (LISINGER et al., 2001).

2.3.6 Certificação das concentrações de elementos químicos

Para atribuir valores de uma propriedade de um Material de Referência, são aceitos quatro abordagens: a utilização de um único método primário em um único laboratório, o emprego de uma ou mais técnicas analíticas independentes em um mesmo laboratório, a colaboração interlaboratorial com um ou mais métodos de exatidão demonstrável e a medição com um método específico por uma rede de laboratórios. A abordagem considerada adequada vai depender do tipo de material de referência, do uso pretendido, da qualificação dos laboratórios envolvidos e da qualidade dos métodos empregados (ABNT, 2012).

A abordagem de um único laboratório é baseada em utilizar os dados de um só laboratório para atribuir valores as propriedades. Isto pode ser feito a partir de um método de razão primária que não é adequado para MRC's de matriz devido ao risco de ocorrerem efeitos de matriz ou interferências. Para esses casos, a ABNT (2012a) recomenda o uso de, pelo menos, dois resultados independentes de métodos independentes. Para realizar a certificação das concentrações obtidas neste estudo optou-se pela realização das análises de amostras independentes a partir de técnicas analíticas independentes.

2.3.7 Escolha do tipo de matriz do material de referência

De acordo com a IAEA (IAEA, 2003), a escolha do tipo de matriz é baseada na sua disponibilidade (composição química, propriedades físicas e estabilidade), na forma química, nível metrológico e na presença de outras substâncias e elementos químicos interferentes, assim como a homogeneidade e na demonstração da rastreabilidade (Tabela 1).

A demanda por análises químicas utilizando insetos é crescente dada a comprovação da sua utilização como biomonitores em estudos de avaliação da qualidade ambiental dos mais variados ecossistemas (SANTOS, 2016) e seu emprego como substituto na alimentação humana por serem fontes de proteínas de alta qualidade e de nutrientes (UNIVERSITY FOUNDATION, 2016). Com isso, a demanda por material de referência de insetos torna-se ainda maior, o que justifica a escolha dessa matriz para a produção de um material de referência.

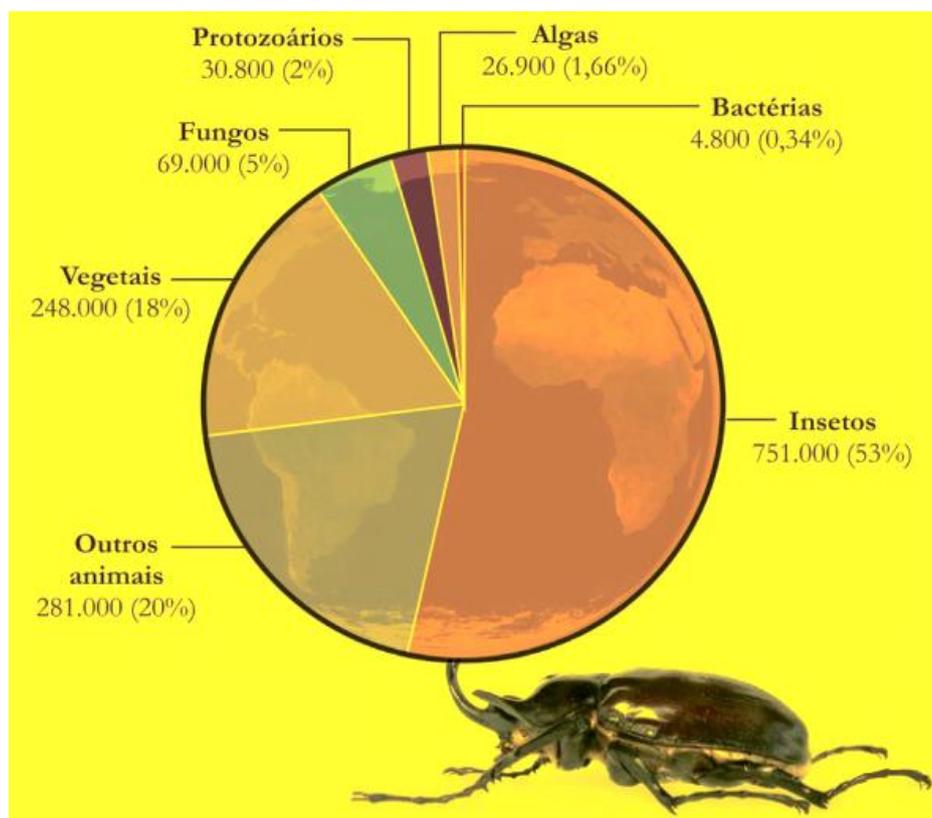
Tabela 1 - Características a serem consideradas para a disponibilidade de material de referência certificado.

Características	Consideração
Disponibilidade dos MRCs	<p>Existe MRC apropriado disponível no que diz respeito à:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Matriz (composição química, propriedades físicas e estabilidade) • Forma química e nível metrológico adequado • Presença de outras substâncias e elementos químicos (eventuais interferências na medição)? <p>Este material de referência pode ser comparado com a amostra?</p>
Atribuição de valores de propriedades	<ul style="list-style-type: none"> • Como foram determinados os valores de propriedades de MRC específico (caracterização)? • Existe alguma informação quantitativa da distribuição de elementos no material? Homogeneidade do material? • São os valores de propriedades atribuídos rastreáveis para alguma referência estabelecida, por exemplo, o SI? • A rastreabilidade foi demonstrada? <p>Este MRC pode ser usado para calibração?</p>
Incerteza dos valores de propriedades atribuídas	<p>Há incerteza do valor de propriedade atribuído?</p> <p>O que isso representa:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Incerteza analítica como um intervalo dos valores de propriedades atribuídas (de acordo com a definição da incerteza) • Parâmetros estatísticos, por exemplo, intervalo de confiança da média dos valores médios obtidos pelos laboratórios • As informações fornecidas permitem o cálculo de uma incerteza adequada? <p>O MRC é comutável?</p>

2.4 A MATRIZ INSETOS

Os insetos merecem relevância, diante de todos os tipos de vida no planeta, por se tratarem dos animais mais abundantes (Figura 3). Incontáveis espécies, quantidade de adaptações ambientais e biomassa são incomparáveis a qualquer outro grupo animal (FELIX et. al, 2010).

Figura 3 - Quantidade de espécies de seres vivos reconhecidas.



Fonte: Wilson (2010), p. 46.

O número de espécies de insetos conhecidas atualmente é estimado em quase um milhão, entretanto, estima-se que existam entre 2,5 e 10 milhões de espécies. A discrepância de valores das estimativas é gigantesca, o que corrobora a imensa diversidade deste grupo, superior a qualquer outro grupo de organismos que exista ou que já tenha existido neste planeta. Para fins de comparação, só as formigas totalizam aproximadamente 10 quatrilhões de indivíduos, pesando aproximadamente o mesmo que todos os 6,5 bilhões de seres humanos (FELIX et. al, 2010).

Contrariamente ao que normalmente se imagina, os insetos trazem mais benefícios do que prejuízos por meio da produção da seda, alimentos (polinização), fármacos, corantes e produtos de inovação (novas substâncias e controle biológico). É incontestável a sua importância para a evolução das espécies, principalmente plantas, e para manutenção dos ecossistemas. Defesas físico-químicas de plantas e recursos alimentares selecionam grupos de herbívoros. Esses fenômenos influenciam a evolução das defesas e reprodução de plantas (COLEY; BARONE, 1996), resultando, em alguns casos, em um processo coevolutivo (JANZEN, 1980).

Os insetos atuam em diversos processos como a regulação de comunidades microbianas, a fragmentação do material vegetal em decomposição e a estruturação do solo por atividades de escavação. Participam, ainda, da ciclagem dos nutrientes, modificando a qualidade da serapilheira e do solo (AQUINO, 2001; CORREIA; OLIVEIRA, 2000). A eliminação total deste grupo de seres vivos do solo, acarretaria graves consequências ao ambiente, perturbando as cadeias alimentares, causando a extinção de espécies e comprometendo os ciclos biogeoquímicos (HOLL; KAPPELLE, 1999).

2.4.1 A utilização dos insetos em análises ambientais

Os insetos estão sendo reconhecidos como indicadores ambientais, além da praticidade para utilização em protocolos laboratoriais (BROWN, 1997). A aplicação dos insetos em pesquisas ambientais apresentam pontos favoráveis como a abundância no ambiente e a diversidade de espécies quanto aos hábitos alimentares e ambientais, características que permitem amostragem sem prejuízos para a comunidade e contribuem para estudos laboratoriais (SANTOS, 2016).

Os insetos possuem propriedades como a quimiorrecepção, que permitem a interação entre os organismos e o ambiente, favorecendo a localização de alimentos e reconhecimento de predadores, além de alertar contra substâncias tóxicas (MASUKO, 2003).

Particularidades como tamanho reduzido, capacidade de reprodução e curto período entre as gerações permitem respostas rápidas às alterações ambientais, demonstrando a relevância do uso desses animais como biomonitores, além da adaptação às condições ambientais criadas pelas atividades humanas, comportamento

esse denominado de sinantropia (NUORTEVA,1963; PAIS, 2003). Trabalhos demonstraram a utilização da classe Insecta como biomonitoros a fim de verificar impactos ambientais e desenvolver valores de referência de elementos químicos para serem usados como padrão (ARDESTANI et al., 2014).

O acúmulo de elementos químicos nos insetos pode estar relacionado com as concentrações presentes no solo e alimentos (TALARICO et al., 2014) e o emprego destes para análise de contaminação ambiental por deposição de elementos químicos no solo foi demonstrado por Gongalsky (2006), que analisou em insetos a bioacumulação de analitos resultantes dos resíduos da mineração de urânio para produção de energia.

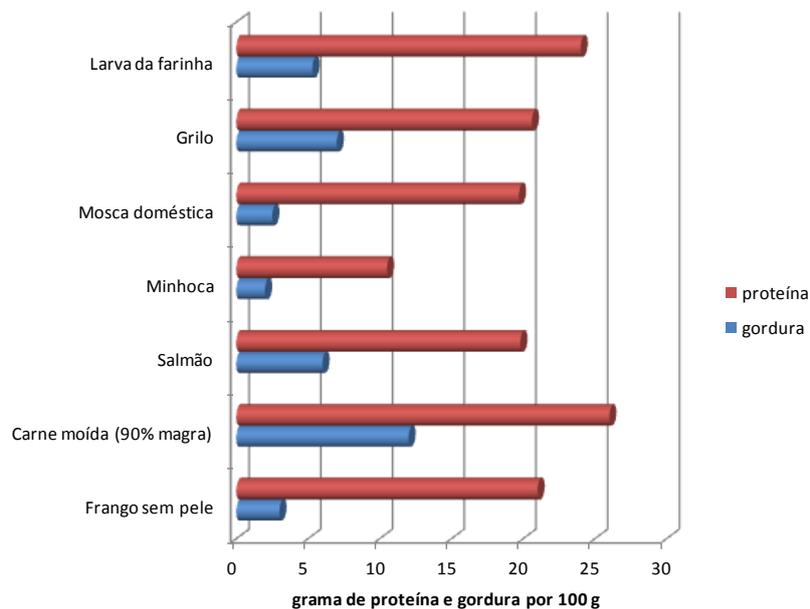
2.4.2 Insetos como alimentos

A entomofagia ainda é pouco praticada nos países ocidentais, principalmente devido à neofobia alimentar e aos poucos atrativos sensoriais em comparação à carne, porém vem crescendo muito em importância em todo o mundo por apresentar diversos benefícios ao planeta e ao ser humano (MEGIDO et al., 2016), mesmo assim faz parte do cardápio de cerca de 2 bilhões de pessoas no mundo (MAKKAR et al., 2014). Devido a isso, os insetos vêm sendo considerados como os principais substitutos da carne, pois geralmente apresentam elevados teores de proteína (Figura 4), aminoácidos, contém uma grande variedade de micronutrientes, tais como os minerais cobre, ferro, magnésio, manganês, fósforo, selênio e zinco (Figura 5) e as vitaminas riboflavina, ácido pantotênico, biotina e em alguns casos ácido fólico (RUMPOLD; SCHLÜTER, 2013).

Apesar disso, o consumo de carne não está previsto para diminuir nos próximos anos, pelo contrário está projetado um aumento na produção de 229 milhões de toneladas em 1999/2000 para 450 milhões de toneladas em 2050 (STEINFELD et al., 2006). Este fato é bastante preocupante do ponto de vista ambiental e econômico devido à disponibilização de terras para criação e produção de alimentos para os animais, ao uso da água, ao consumo de agroquímicos e às emissões de gases do efeito estufa. Por outro lado, os insetos apresentam uma alta eficiência de conversão alimentar (Figura 6) e, em sua produção, tem-se uma dependência de espaço de terras bastante inferior à pecuária tradicional, empregando-se quantidade de água significativamente menor do que o gado tradicional. Assim, há a produção de alimentos e rações com uma maior economia de recursos, além da redução da produção de gases

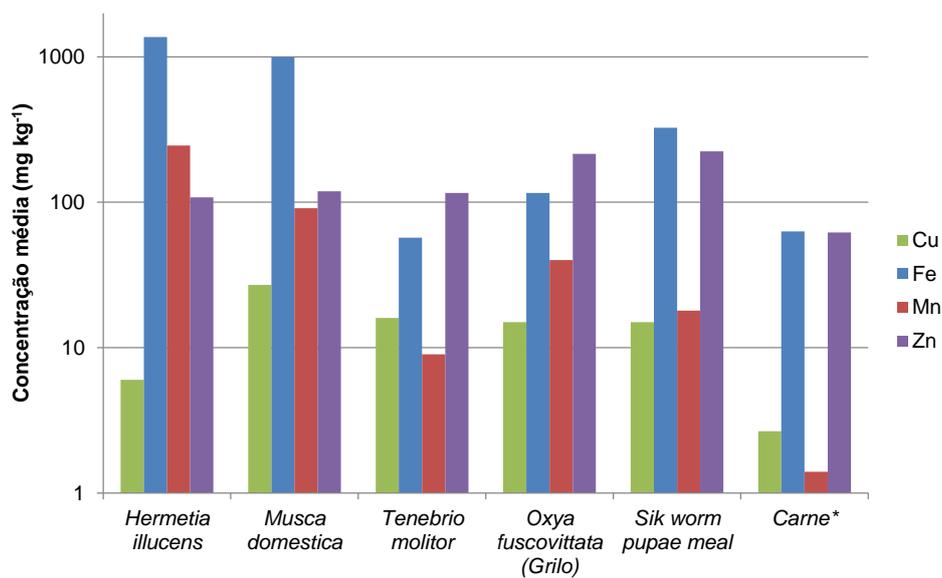
de efeito estufa (FAO REGIONAL OFFICE FOR ASIA AND THE PACIFIC, 2010; NAKAGAKI; DEFOLIART, 1991).

Figura 4 - Quantidade (g) de proteína e gordura em 100 g de alimentos.



Fonte: Modificado de Vox (2016).

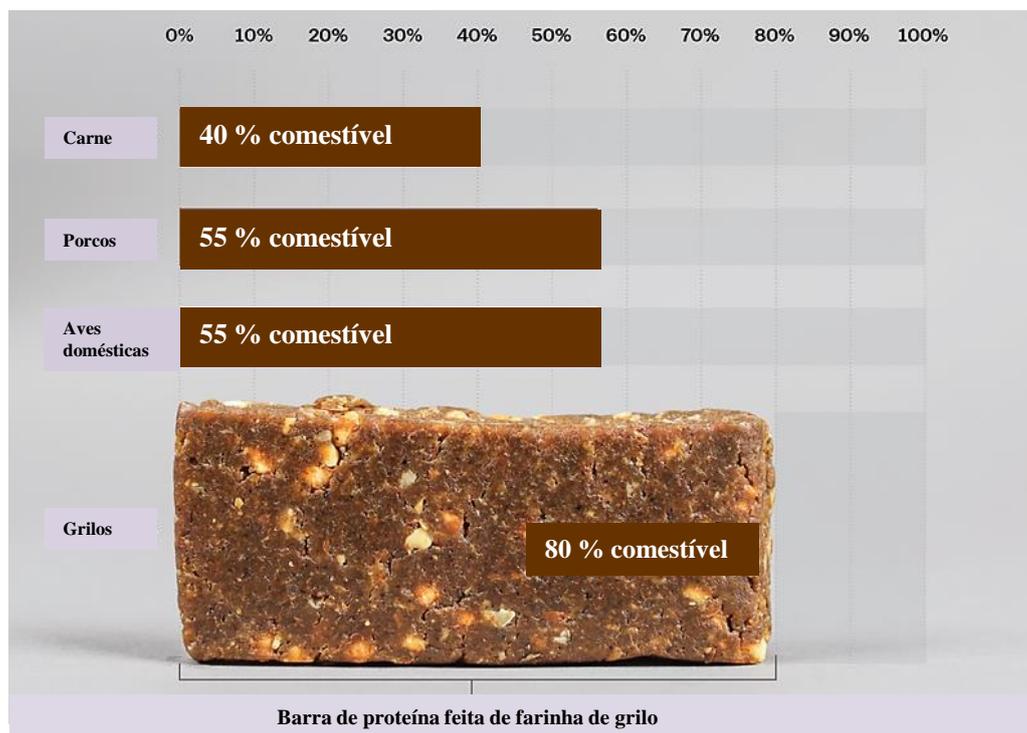
Figura 5 - Concentração de cobre, ferro, manganês e zinco em carnes e em insetos utilizados como alimentos.



*Compilação de valores

Fonte: Modificado Makkar et al. (2014) e De Smet e Vossen (2016).

Figura 6 - Eficiência de produção convencional de carne e grilos.



Fonte: Modificado de Vox (2016).

Mesmo assim, há a necessidade de verificação da segurança alimentar, valores nutricionais quanto a macro e micronutrientes, os quais dependem de uma cadeia rastreável de medição, o que inclui o emprego de materiais de referência e técnicas analíticas confiáveis.

2.4.3 Quantificação de elementos químicos em insetos

As técnicas analíticas Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia - EDXRF, Análise por Ativação Neutrônica Instrumental – INAA, Espectrometria de Absorção Atômica – AAS e Espectrometria de Massas por Plasma Acoplado Indutivamente – ICP-MS foram aplicadas para a determinação de até 20 elementos químicos em invertebrados terrestres, incluindo insetos (SANTOS, 2016). Magalhães (2015) testou diversos procedimentos de tratamento químico para a quantificação de elementos químicos, prosseguindo com a quantificação de 13 elementos químicos por EDXRF, GFAAS e ICP-MS em insetos de vegetação preservada de Mata Atlântica. Santos (2016) determinou As, Cd, Cl, Co, Cr, Cu, Fe, K,

Mo, P, Pb, S, Sb, Th e Zn em invertebrados terrestres de ambientes urbanos, utilizando as técnicas de EDXRF, GFAAS e ICP-MS. Em ambos os casos, foram utilizados procedimento do Laboratório de Serviços Ambientais – SEAMB do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste – CRCN-NE. A comprovação da qualidade do procedimento analítico foi baseada em materiais de referência de matrizes diferentes da amostra (RM 8414 *Bovine Muscle* e SRM 1547 *Peach Leaves*) (MAGALHÃES, 2015; SANTOS, 2016), assumindo-se que as dificuldades quanto ao tratamento sejam maiores para o músculo bovino e tecidos vegetais que a matriz de insetos.

A gama de elementos químicos determinados nestes trabalhos foi resultado da utilização das técnicas analíticas disponíveis no CRCN-NE para a quantificação de muitos elementos químicos com nível metrológico adequado.

2.5 TÉCNICAS ANALÍTICAS

Para a avaliação dos candidatos a material de referência de matrizes de insetos, torna-se essencial a determinação de diversos elementos químicos com nível metrológico adequado (parâmetros de análise e estatísticos controlados e resultados rastreáveis ao sistema internacional). Para isso, necessita-se do uso de técnicas analíticas adequadas para análises químicas com matrizes biológicas como a Espectrometria de Absorção Atômica com Chama – FAAS e a Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite - GFAAS. Por se tratar de uma técnica analítica rápida e não destrutiva a Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia – EDXRF – foi utilizada como técnica complementar para a quantificação dos elementos químicos, no Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste – CRCN-NE.

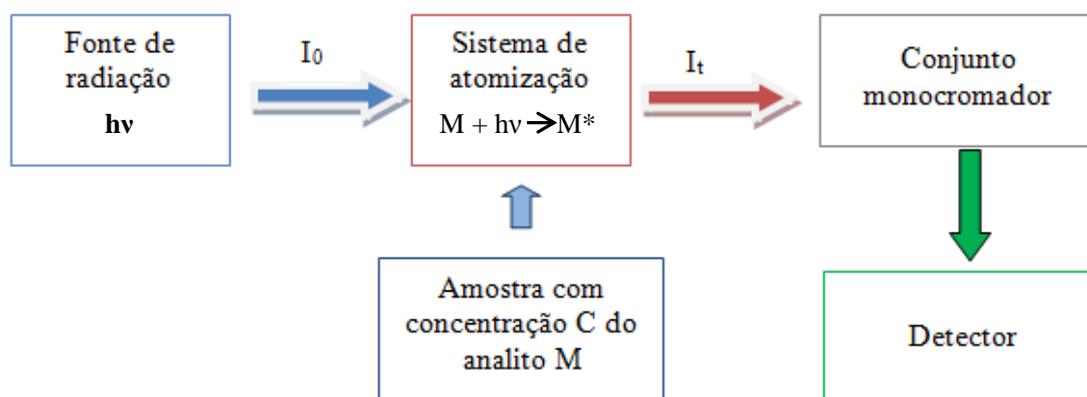
2.5.1 Espectrometria de Absorção Atômica

O princípio da Espectrometria de Absorção Atômica - AAS é realizar a medição da absorção da intensidade da radiação eletromagnética pelas espécies atômicas neutras, não excitadas, em estado gasoso. Cada uma destas possui um espectro de absorção formado por uma série de estreitas raias características devidas a transições eletrônicas envolvendo os elétrons externos. Grande parte dessas transições corresponde a comprimentos de ondas nas regiões ultravioleta e visível. Cada uma dessas espécies

atômicas é capaz de absorver radiações de comprimentos de onda iguais aos das radiações que ela é capaz de emitir quando excitada (EWING, 1989). Esse fenômeno é utilizado para a determinação quantitativa de elementos químicos em uma ampla variedade de amostras (WELZ; SPERLING, 1999).

O espectrômetro é composto de uma fonte de radiação, de um sistema de atomização, de um conjunto monocromador e do detector (Figura 7). A atomização pode ser feita em chama, em tubo aquecido acoplado a um gerador de hidretos, por meio da geração de vapor a frio e, eletrotermicamente, em forno de grafite, por exemplo (JACKSON, 1999). Os dois tipos de atomizadores mais utilizados são a chama (FAAS) e o forno de grafite (GFAAS). FAAS é a técnica mais indicada para análise em níveis de mg kg^{-1} . Dada à seletividade, a sensibilidade e a possibilidade de determinação de elementos traços importantes para a saúde humana, GFAAS pode ser empregada para análises químicas e quantificação em nível de $\mu\text{g kg}^{-1}$, (KRUG et al., 2004).

Figura 7 – Diagrama de blocos de um espectrômetro de absorção atômica.



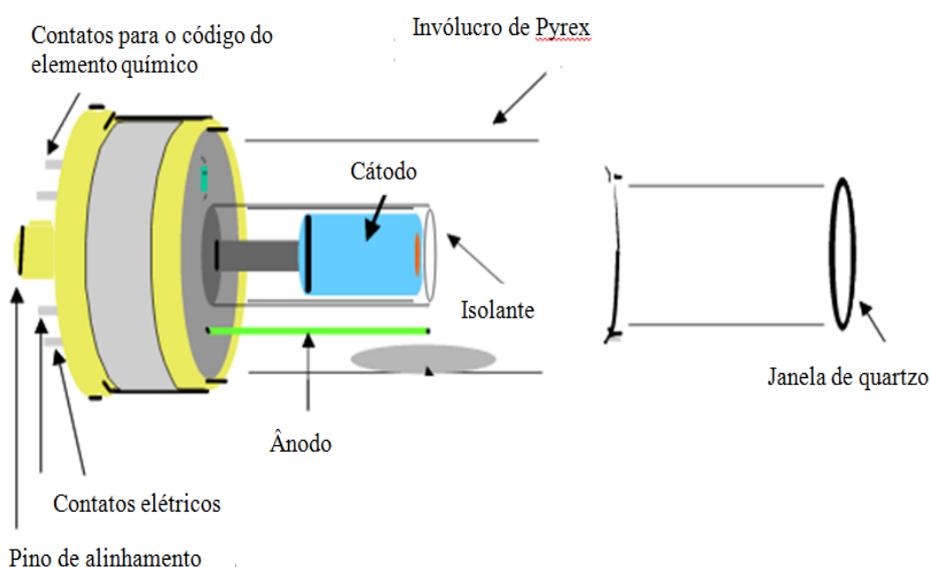
Fonte: Magalhães (2015).

No atomizador, são gerados os átomos gasosos no estado fundamental, que irão absorver a radiação de comprimento de onda característico proveniente da fonte de radiação e, conseqüentemente, possibilitar a determinação da concentração do analito (LAJUNEN, 1992). Embora mais sensível e versátil, a técnica GFAAS é susceptível a alterações instrumentais e operacionais como as variações na temperatura, na taxa de aquecimento do tubo de grafite, no volume injetado de amostra, na radiação emitida da fonte, nos modificadores de matriz e nas diluições, podendo acarretar efeito de memória (BUTCHER; SNEDDON, 1998).

As principais fontes de radiação para a excitação dos átomos de elementos químicos capazes de emitir radiação nas regiões visível e ultravioleta do espectro eletromagnético são as lâmpadas de cátodo oco (HCL - *hollow-cathode lamp*), as fontes de espectros contínuos e as lâmpadas de descarga sem eletrodos (EDL – *Electrodeless Discharge Lamp*) (WELZ; SPERLING, 1999). As lâmpadas de cátodo oco são construídas em um tubo de vidro preenchido com gás inerte (Figura 8). O cátodo é confeccionado ou revestido com o elemento químico de interesse, já o ânodo é constituído por um bastão de zircônio ou tungstênio (WELZ; SPERLING, 1999).

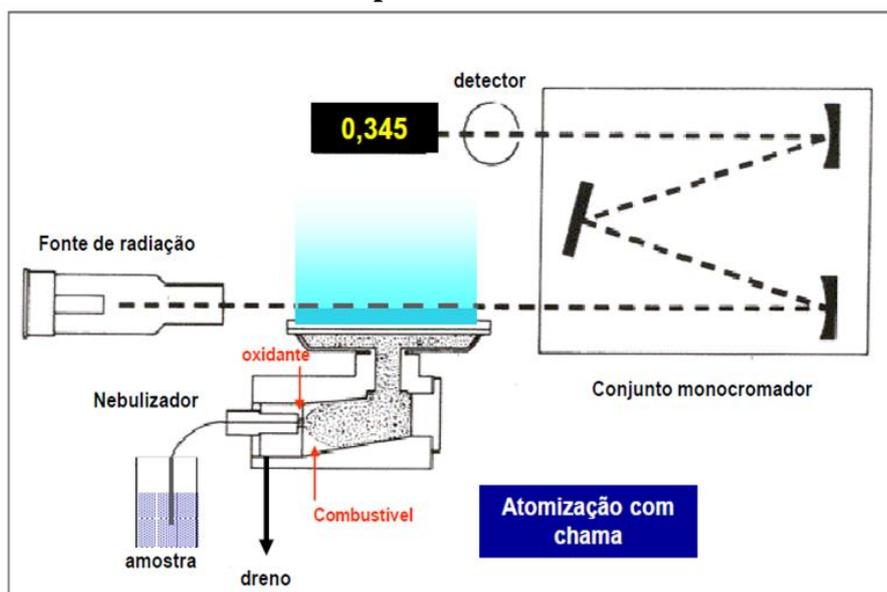
Para injeção da amostra, um tubo capilar flexível leva a solução ao nebulizador, responsável pela nebulização e formação de um aerossol. As gotas maiores caem e são drenadas, enquanto as de menor diâmetro vaporizam na chama ou no forno de grafite, sendo atomizadas. O rendimento da nebulização da solução é cerca de 1% (SKOOG, 2006; KRUG et al., 2004; RSC, 2016). Na Figura 9 é mostrado o esquema de funcionamento de um espectrômetro de absorção atômica com chama.

Figura 8 – Esquema de uma lâmpada de cátodo oco.



Fonte: Modificado de Varian (2001).

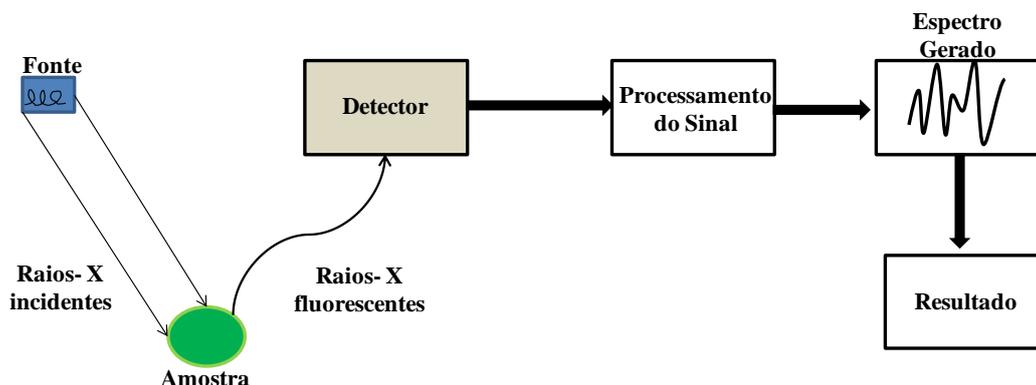
Figura 9 – Funcionamento do espectrômetro de absorção atômica com atomização por chama.



Fonte: Kruget al (2004).

2.5.2 Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia - EDXRF

Como uma técnica analítica quali-quantitativa, EDXRF baseia na medição da intensidade de fluorescência de raios-X emitidos pelos elétrons dos átomos de elementos químicos da amostra, detectados por unidade de tempo. Os raios-X são emitidos por tubos apropriados, que excitam os elétrons dos átomos. Ao retornar ao seu estado de estabilidade, os átomos emitem raios-X característicos (Figura 10). A energia desses é específica para cada elemento químico. A intensidade dos raios-X que é medida pelo detector é relacionada à concentração de cada elemento químico na amostra por meio de curvas analíticas. Detector semiconductor de alta resolução para a medição é normalmente empregado, com capacidade de produzir pulsos eletrônicos proporcionais às energias e às intensidades dos raios-X. O detector de Si-Li é o mais utilizado (JANSSENS et. al, 1993).

Figura 10 – Fluxograma de funcionamento de um EDXRF.

Fonte: Magalhães (2015).

No equipamento de EDXRF, emprega-se o detector de SiLi para a quantificação de raios-X (Linha $K\alpha$ e $K\beta$) emitidos pelos elétrons dos elementos químicos com número atômico variando entre 13 (Al) e 50 (Sn). Para os elementos químicos de maior peso atômico, podem ser utilizados os raios-X das camadas L e M. Já para elementos químicos leves (número atômico menor que 13) não é aconselhável o uso do EDX devido à baixa eficiência para raios-X de baixa energia para esse tipo de detector (GARCIA; SANTOS, 1974).

O emprego da técnica de EDXRF requer padronização dos parâmetros para cada rotina experimental. Cada amostra a ser analisada deve ser avaliada com base em curvas estabelecidas previamente com materiais de referência certificados ou padrões internos (REDUS et al., 2009; SOUSA et al., 2013). O aumento do nível metrológico de EDXRF é algo bastante desafiador, já que a precisão e exatidão são baixas quando comparadas com as demais técnicas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os candidatos passaram por procedimentos adequados atendendo a requisitos estabelecidos internacionalmente pelas ISO Guias 30 a 35.

3.1 SELEÇÃO DO MATERIAL

Para a escolha do um candidato a MR, foram utilizados larvas de tenébrio gigante (*Zophobas morio*) e tenébrio comum (*Tenebrio molitor*), além das espécies de barata cinérea (*Nauphoeta cinerea*) e grilo preto (*Gryllus assimilis*) fornecidos em forma de farinha de insetos desidratados pela empresa Insetos Brasil, localizada no Município de Camaragibe, Pernambuco (Figuras 11, 12 e 13), visando sanar a deficiência quanto à disponibilidade de materiais de referência neste tipo de matriz. As amostras foram obtidas na forma de farinha para garantir homogeneidade e comutatividade dos candidatos a MR.

Figura 11 – Espécies de insetos utilizadas para a produção de farinha. A. Larvas de tenébrio gigante – *Zophobas morio*. B. Larvas de tenébrio comum – *Tenebrio molitor*.



Fonte: O autor.

Figura 12 – Espécies de barata cinérea – *Nauphoeta cinérea* empregada para a produção de farinha



Fonte: O autor.

Figura 13 – Espécies de grilo preto – *Gryllus assimilis*



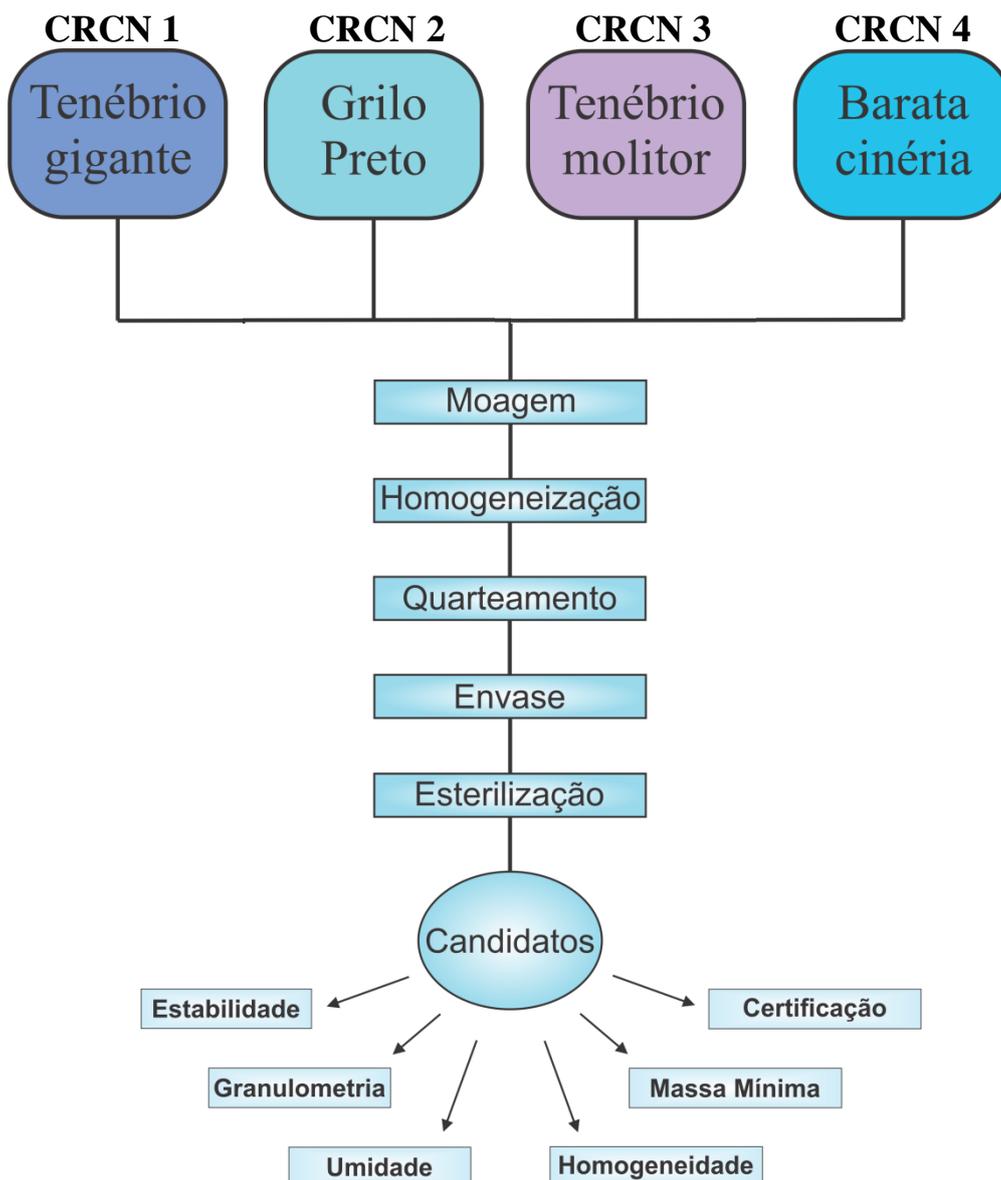
Fonte: O autor.

3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As etapas e sequência de experimentos que foram realizadas no presente estudo estão ilustradas na Figura 14. Após a preparação das amostras, homogeneização e quarteamento foi realizado o envase em recipientes apropriados e subsequente

esterilização por radiação gama para os ensaios seguintes, isto é, estabilidade, granulometria, umidade, homogeneidade, massa mínima e caracterização química das amostras. As amostras de farinhas de insetos foram identificadas de acordo com a Figura 14 visando facilitar a identificação dos lotes de amostras.

Figura 14 - Esquema dos ensaios realizados para a escolha do candidato a material de referência.

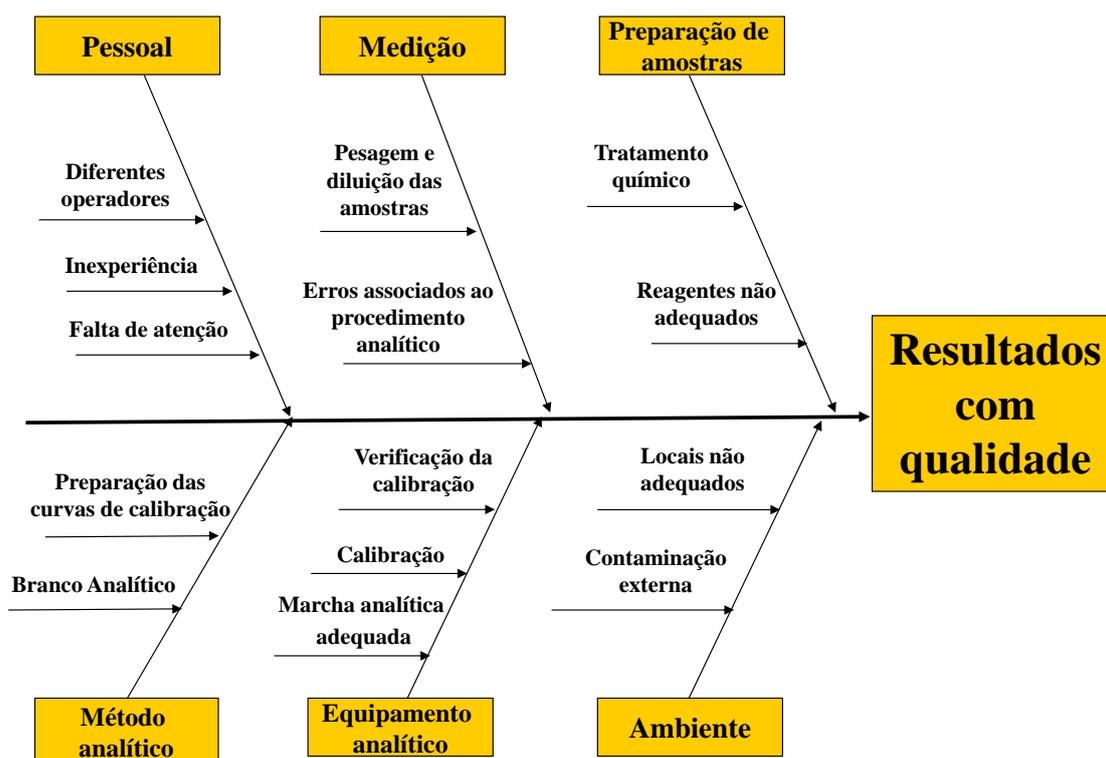


Fonte: O autor.

As principais etapas do método analítico foram estudadas e monitoradas, utilizando as ferramentas de controle estatístico da qualidade. Para conhecer e visualizar possíveis causas originárias dos problemas e/ou as condições necessárias para gerar um

resultado satisfatório, fez-se o uso do diagrama de Ishikawa (Figura 15). Com isso, foi possível identificar potenciais causas de falha (fontes de incertezas), assim como averiguar o controle da qualidade.

Figura 15 – Diagrama de Ishikawa identificando as tarefas críticas para a garantia do controle da qualidade.



Fonte: O Autor

Para garantir a obtenção de resultados com qualidade, através do diagrama de Ishikawa foram identificadas todas as etapas críticas ao processo (retângulos amarelos) e, em seguida, verificaram-se as possíveis causas de resultados inadequados em cada uma dessas etapas. Todas as causas possíveis identificadas foram tratadas, ou por procedimentos bem estabelecidos no Serviço de Monitoração Ambiental do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (SEAMB/CRCN-NE), ou por tratamento prévio de cada problema identificado nesse diagrama. Os procedimentos utilizados após o planejamento encontram-se detalhados a seguir.

3.2.1 Preparação das amostras

Aproximadamente 1 kg de farinha de cada espécie de inseto foi levado a um laboratório de preparação do SEAMB/CRCN-NE, ambiente devidamente limpo e adequado para a preparação das amostras (Figura 16). Todo o procedimento de preparação das amostras foi realizado em capela de fluxo laminar Veco (modelo Biosafe – 12) com filtro HEPA (*High Efficiency Particulate Arrestance*) para evitar a contaminação com elementos químicos exógenos.

Figura 16 – Laboratório adaptado para a preparação de amostras.

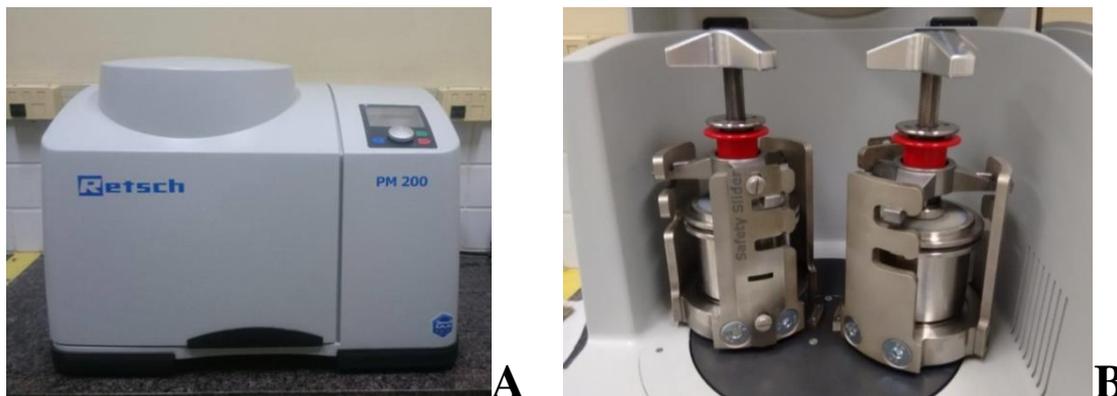
A. Isolamento da estação de moagem de amostras. B. Barreira nas portas do laboratório para evitar contaminantes externos. C. Barreira nas janelas do laboratório para isolamento do ambiente.



Fonte: O autor.

As farinhas de insetos tiveram o tamanho de partículas ainda mais reduzido em liquidificador industrial Skysmen (modelo LT – 2,0 Super) modificado com lâmina de titânio. Em seguida, as amostras foram para o moinho de bolas com material de moagem de alumina sinterizada (Figura 17) para serem cominuídas.

Figura 17 – Moinho planetário de bolas modelo PM200 (A) e detalhe do sistema de moagem com os vasos (B).



Fonte: O Autor

Todavia, não se obteve resultado satisfatório de moagem como se pode observar na Figura 18, impossibilitando o peneiramento e seleção de partículas a um tamanho adequado, devido à compactação exacerbada das partículas. Isto provavelmente foi associado a açúcares e à quantidade de gordura presente nos insetos, visto que os insetos são triturados pelo fornecedor após fervura e secagem em estufa, causando alterações na estrutura de açúcares e proteínas.

Figura 18 – Aspecto da amostra de farinha de insetos em moinho de bolas.



Fonte: O autor.

Após a tentativa anterior não resultar em uma moagem adequada, optou-se pela utilização de um surfactante para minimizar as dificuldades na moagem, deixando as amostras em formas de particulado. Para tanto, foram realizados testes com almofariz e pistilo adicionando diferentes quantidades de sulfato de sódio e farinhas de insetos triturados variando de 30% a 50% v/v a quantidade de sulfato. Ao final dos testes

estabeleceu-se uma mistura de 50% m/m de sulfato para as larvas de tenébrio gigante e tenébrio molitor e de 30% m/m para a barata cinérea e o grilo preto (Figura 19). Uma vez definida a proporção adequada para a moagem das farinhas com o surfactante, foi realizada moagem de 1 kg da mistura, seguido de peneiramento adequado, resultando em partículas menores que 0,25 mm como se pode observar na Figura 20, obtendo-se aproximadamente 800 g de amostra de cada candidato.

Figura 19 – Teste da mistura com surfactante para a moagem da amostra de grilo preto.



Fonte O Autor

Figura 20 – Cominuição das amostras. A. Peneiramento das amostras em peneira de 0,25 mm. B. Detalhe da amostra de grilo antes e depois da cominuição.

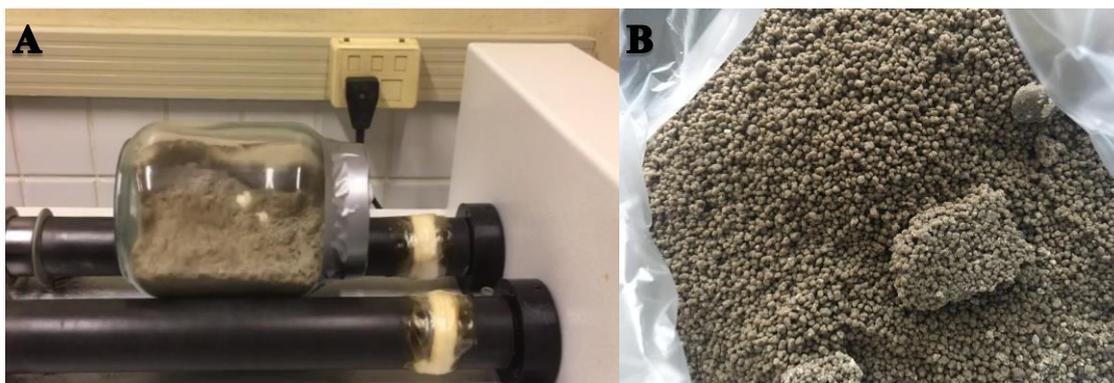


Fonte O Autor

3.2.2 Homogeneização

Terminado o processo de cominuição e peneiramento, os candidatos CRCN 1, CRCN 2, CRCN 3 e CRCN 4 foram submetidos a homogeneização. A amostra CRCN 4 (barata cinérea) foi primeiramente submetida a homogeneização em moinho de vasos com velocidade angular de 30 rotações por minuto, utilizando bolas de alumina sinterizada para auxiliar no processo durante sete dias. Esta metodologia foi insatisfatória visto que a amostra apresentou alto grau de heterogeneidade (Figura 21), pois devido à tendência de movimento contínuo e unidirecional, formaram-se aglomerados de amostra. Sendo necessário adotar outra maneira para a homogeneização das amostras.

Figura 21 – Homogeneização de amostras. A. Moinho de jarros com bolas de alumina sinterizada. B. Amostra heterogênea após sete dias de homogeneização.



Fonte O Autor

Em seguida, buscou-se uma alternativa para realização desta homogeneização, utilizando-se uma betoneira Horbach de 250 L, visto que o movimento não seria mais repetitivo e contínuo na mesma direção como ocorria na tentativa anterior. Para tanto, a amostra utilizada foi a CRCN 4. Toda a amostra foi transferida para um balde de polietileno e foram utilizadas bolas de vidro para auxiliar no processo. O recipiente foi envolvido em espuma e selado para evitar danos e contaminação e, em seguida, colocado na betoneira (Figura 22) por um período de sete dias. No entanto, devido ao seu alto grau de heterogeneidade e a prévia compactação, mais uma vez o resultado obtido não foi o desejado como se pode observar na Figura 23, em que toda a amostra ficou totalmente compactada, sendo assim a amostra de barata cinérea foi descartada do estudo.

Figura 22 – Processo de homogeneização utilizando betoneira.



Fonte O Autor.

Figura 23 – Amostra de barata cinérea após homogeneização na betoneira.



Fonte O Autor.

As outras amostras dos candidatos a MR (CRCN1, CRCN2 e CRCN3) foram transferidas para baldes de polietileno com esferas de vidro para auxiliar na homogeneização, que foram selados e protegidos (Figura 22). Todo o conjunto foi submetido ao mesmo processo descrito acima em betoneira por um período de sete dias, obtendo resultados aparentemente satisfatórios. Após este processo, as amostras foram encaminhadas para o quarteamento e envase.

3.2.3 Quarteamento e Envase

Após a homogeneização, para a composição dos lotes, foram transferidas porções de 20 g de cada amostra, segregadas por quarteador de 8 vias da Sonda Terra (Figura 24).

Figura 24 – Ambiente utilizado para o quarteamento das amostras em capela de fluxo laminar.



Fonte O Autor.

As porções homogeneizadas foram transferidas para frascos apropriados previamente limpos. Para a descontaminação, os frascos permaneceram mergulhados em solução de detergente Extran (Merck) 5% v/v durante 24 horas com a conseguinte lavagem com água Tipo I (Resistividade $\geq 10 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$). Após isso, os frascos foram novamente mergulhados em solução de ácido nítrico (ultrapuro) 10% v/v por 24 horas, enxaguando-se novamente realizado com água Milli-Q. Todos os reagentes utilizados na limpeza foram de alto grau de pureza. A secagem dos recipientes foi realizada em capela de fluxo laminar. Ao final, obteve-se um total de 40 frascos para cada candidato

(CRCN1, CRCN2 e CRCN3). Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar para evitar contaminação com particulados atmosféricos.

3.2.4 Esterilização dos candidatos a Material de Referência

Para a esterilização, de modo a evitar perdas por degradação microbiológica, a irradiação dos frascos contendo os candidatos a MR, foi realizada empregando um irradiador de Co-60 tipo Gammacell 220 Excel-MDS Nordion (Figura 25) do Departamento de Energia Nuclear/Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, com dose de radiação gama de 5 kGy durante o período de 2h e 20 min. Essa dose foi considerada apropriada para esterilização conforme o estudo realizado por Moreira (2010).

Figura 25 – Irradiador com fonte de Co⁶⁰ Gammacell 220 Excel-MDS Nordion do Departamento de Energia Nuclear da UFPE.



Fonte: O Autor.

3.2.5 Determinação da massa mínima exequível

Para realização do estudo de massa mínima, foram escolhidos aleatoriamente cinco frascos de cada um dos candidatos. Baseando-se nos resultados obtidos por Fonseca (2010) e Magalhães (2015), que conseguiram determinar elementos químicos em insetos com massas mínimas da ordem de 250 mg, foram retiradas porções de 750 mg e 1,25 mg (massa total do “blend”) dos candidatos a MR em triplicata para cada massa. Essas quantidades dos candidatos a MR foram referentes às massas 250 mg e 500 mg de farinhas de insetos (massa apenas de farinha de insetos dentro do “blend”), o que corrobora com os resultados de inúmeros materiais de referência de matrizes biológicas. Foi realizada determinação das concentrações dos elementos químicos Cu, Fe e Mn por FAAS. Para avaliar esses resultados, foi utilizada a constante de amostragem K_s proposta por Ingamells (INGAMELLS; SWITZER, 1973; INGAMELLS, 1974) e o estudo do desvio padrão relativo em comparação com o desvio padrão de repetitividade da técnica analítica (ABNT, 2012a), para as duas massas propostas no estudo.

Ao realizar-se o procedimento de pesagem das amostras, foi observado que todo o lote do candidato a material de referência CRCN3 apresentou indícios de heterogeneidade (Figura 26) com formação de aglomerados. Deste modo, optou-se por não utilizá-lo nas demais etapas sem antes realizar uma rápida verificação de homogeneidade para confirmação do que foi constatado qualitativamente, evitando custos desnecessários. Dentre os equipamentos disponíveis, EDXRF proporciona resultados adequados com a rapidez necessária para o ensaio.

Figura 26 – Amostra do candidato a Material de Referência CRCN 3 com indícios de heterogeneidade.



Fonte: O Autor.

3.2.6 Determinação de umidade residual

Para determinação de umidade residual, porções analíticas em triplicata de 1,25 g de frascos escolhidos aleatoriamente de candidato a MR, foram transferidas para recipientes de alumínio tarados previamente com auxílio de balança analítica DenverM-220D (precisão de 0,0001g). Os procedimentos avaliados envolveram: (1) secagem em estufa de circulação forçada à 85 °C, (2) secagem a frio em liofilizador após congelamento das amostras e (3) secagem à vácuo em dessecador com sílica gel. O tempo mínimo de secagem foi também estudado a partir da pesagem a cada 1 hora até peso constante (diferenças entre pesagens sucessivas menores que 10 mg) para a estufa e o liofilizador. Para o dessecador à vácuo, foram realizadas pesagens a cada dia até peso constante num período máximo de dez dias. Antes de cada pesagem, as amostras foram levadas a dessecador para equilíbrio térmico em temperatura ambiente, quando necessário. A Equação 1 foi utilizada para o cálculo do teor de água nas amostras.

$$\%umidade = \left(1 - \frac{peso_{seco}}{peso_{úmido}}\right) \times 100 \quad (1)$$

3.2.7 Análise granulométrica

Para a análise da distribuição dos tamanhos de partículas, foi utilizado conjunto de agitador magnético e peneiras (Figura 27) de abertura de 500 µm, 250 µm, 149 µm, 125 µm, 74 µm e, finalmente, 63 µm. Para tanto, foram escolhidos aleatoriamente três frascos de cada candidato à MR. Após peneiramento por um período de uma hora, as peneiras previamente taradas em balança semianalítica foram novamente pesadas, seguindo-se com a estimativa de fração de massa retida em cada peneira por meio da diferença nas pesagens. Logo após, foi calculada a distribuição percentual das partículas.

Figura 27 – Agitador magnético com conjunto de peneiras.



Fonte: O Autor

3.2.8 Avaliação da homogeneidade inter e intra-frascos

A análise de variabilidade inter e intra-frascos, componente mais importante para a seleção do candidato a MR, foi realizada por meio da determinação de Cu, Fe e Mn por FAAS para o CRCN1 e CRCN2, pois são elementos de fácil quantificação por esta técnica, possibilitando uma resposta adequada, rápida e bastante precisa (BODE et al., 2000). Para o CRCN3, optou-se por avaliar esta característica por meio da quantificação de sódio e fósforo por EDXRF, visto que este candidato apresentou sinais de heterogeneidade. Esta técnica analítica gera resultados de maneira mais rápida e menos custosa.

Foram realizadas amostragem sistemática aleatória de cinco frascos para cada tipo de candidato a MR, nos quais foram retiradas 3 porções analíticas (4 g), e destas, três sub-porções analíticas de 1,25 g, totalizando 45 sub-porções de cada candidato a MR. Após a obtenção dos resultados foi testada a presença de dados anômalos por meio do teste de Grubbs e a normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilks. Em seguida, ANOVA foi utilizada para avaliar as diferenças inter- e intra-frascos quanto às frações de massa dos elementos químicos, tal como recomendado pela ABNT (2012a), possibilitando também estimar a componente da incerteza final devida à homogeneidade (VAN DER VEEN et al., 2000; LISINGER et al., 2001).

3.2.9 Estudo da estabilidade

O estudo da estabilidade foi realizado após ser demonstrada a homogeneidade do material quanto às frações de massa dos elementos químicos (ABNT, 2012). Para isto foi realizado o teste de estabilidade a curto prazo (durante 60 dias) e a longo prazo (12 meses), para avaliar a integridade dos candidatos a MR. Assim como ocorreu para a Seção 3.2.7, as porções analíticas de frascos escolhidos aleatoriamente para cada teste foram analisadas por FAAS.

Para avaliar a estabilidade a curto prazo, foi verificada a ocorrência de modificações nas características do material em condições de transporte e/ou armazenamento não adequadas. Esse tipo de ensaio é realizado tipicamente em diferentes temperaturas e leva normalmente de 1 a 2 meses (ABNT, 2012a). Os testes foram realizados utilizando seis frascos escolhidos aleatoriamente (amostras em triplicata para cada frasco), sendo dois para cada condição imposta ao candidato à MR. As temperaturas foram de -20 °C (temperatura de armazenamento no freezer, frascos N° 1 e 8), 25 °C (temperatura ambiente, frascos N° 19 e 22) e 65 °C (temperaturas extremas, frascos N° 35 e 40). Todos os frascos foram avaliados após 15, 30 e 60 dias (total de 6 subamostras para cada espécie em cada tempo analisado).

Para estudar a estabilidade em longo prazo, outros três frascos (Fracos N° 2, 10 e 21) escolhidos aleatoriamente foram armazenados a temperatura ambiente fora do dessecador (25 °C). Porções analíticas em triplicata de 1,25 g (total de 9 subamostras para cada farinha) foram analisadas por FAAS após um ano sob essas condições para avaliar a manutenção das características e o tempo de prateleira dos candidatos a MR.

3.2.10 Certificação das concentrações de elementos químicos

Após os candidatos terem todas as suas propriedades físicas e químicas avaliadas e adequadamente comprovadas, apenas o candidato CRCN2 passou pela fase de caracterização química e certificação dos resultados de concentrações dos elementos químicos Ca, Cu, Fe, Mn e Zn, pelas técnicas analíticas de Espectrometria de Absorção atômica com atomização por chama – FAAS e por forno de grafite - GFAAS, bem como por Espectrometria de emissão atômica com atomização por chama - FAAS,

visando a utilização mais de uma técnica independente para o mesmo elemento químico.

Dez frascos do candidato a MR CRCN 2 foram escolhidos aleatoriamente, de cada um destes foram retiradas 9 sub amostras, sendo 3 subporções para cada técnica analítica (total de 90 amostras) e 5 subporções do material de referência TM-1 (Tecido de Mexilhão 1 – Fornecido pelo IPEN-SP) para cada técnica analítica, foram utilizados para este ensaio, visto que seria necessária a comprovação da qualidade do procedimento analítico, para a certificação dos resultados. As amostras foram tratadas quimicamente e foi realizada a determinação das concentrações de Ca, Cu, Fe, Mn e Zn por ao menos duas técnicas analíticas diferentes, assim como a estimativa das respectivas incertezas analíticas.

3.3 DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS QUÍMICOS

Foram utilizadas as técnicas de Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia (EDXRF) para a avaliação de heterogeneidade do candidato CRCN3, a Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização por Chama (FAAS) para os ensaios de Homogeneidade e Massa Mínima, após procedimento de tratamento químico. Para o ensaio de Certificação, FAAS Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização por forno de grafite (GFAAS) e a Espectrometria de Emissão atômica com chama (FAES) foram empregadas para a quantificação dos elementos químicos. Vale ressaltar que, para este último ensaio, foram utilizadas diferentes porções analíticas para cada técnica analítica e procedimento tratamento químico.

Para os ensaios, foram utilizadas as técnicas de Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia (EDXRF), Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização por Chama (FAAS), Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização por Forno de Grafite (GFAAS) e a Espectrometria de Emissão Atômica (FAES) para a quantificação dos elementos químicos.

3.3.1 EDXRF

Porções analíticas de 1 g do CRCN3 foram transferidas para tubos de polietileno cobertos por filme de polipropileno específico para a análise por EDXRF no

equipamento EDX-720 da Shimadzu. Para o controle da qualidade do procedimento analítico, porções dos materiais de referência SRM 2976 Freeze-Dried Mussel Tissue (Trace Elements & Methylmercury) e TM1 Tecido de Mexilhão, produzidos pelo National Institute of Standard and Technology – NIST e pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN e foram analisados com as amostras.

Antes das análises, foi realizada a verificação de calibração em energia e resolução do equipamento a partir do padrão A-750, fornecido pelo fabricante. Para verificação do procedimento anterior, foi utilizado o padrão SUS também fornecido pela Shimadzu. Após as verificações, dados de intensidade para o branco analítico foram armazenados, para serem utilizados nos cálculos das concentrações de elementos químicos. Todas as análises foram realizadas em triplicata, na atmosfera de vácuo de 30 Pascal, com tempo de contagem de 14 minutos para quantificação de Na e P. Foi utilizada voltagem de 15 kV para a determinação destes elementos químicos. As curvas analíticas utilizadas foram obtidas previamente utilizando diversos materiais de referência de matriz biológica conforme Sousa et al. (2013).

3.3.2 Tratamento químico das amostras

As amostras, brancos analíticos e o material de referência TM-1 foram submetidos ao tratamento químico para a obtenção das soluções de amostras. O tratamento químico foi realizado partindo do protocolo estabelecido por Magalhães (2015), sendo realizados testes até a adequação. Porções de 1,25 g de amostras e 0,3 g do material de referência (massa indicada no certificado) foram transferidas diretamente para tubos de Teflon®, apropriados para uso em forno de micro-ondas da Proveto Analítica modelo DGT 100 plus. Foi adicionado 8 mL de ácido nítrico destilado (HNO_3 p.a.), seguido pelo aquecimento em forno digestor de acordo com o procedimento de rampas de potência abaixo:

1. Etapa de pré-digestão – 330 W durante 5 min;
2. Etapa de digestão – 800 W durante 10 min;
3. Resfriamento – 0 W durante 15 min.

As soluções foram transferidas para a capela de fluxo laminar para atingir equilíbrio térmico e foram filtradas em papel de filtro quantitativo para remoção de qualquer particulado. Os volumes finais de soluções independentes para cada técnica

analítica foram completados com água Milli-Q em recipientes descontaminados para 15 mL nas amostras do FAAS e do FAES e para 50 mL nas amostras do GFAAS. As soluções das amostras, materiais de referência e brancos analíticos foram encaminhadas para a análise química por FAAS, FAES e GFAAS.

3.3.3 FAAS

Após a obtenção das curvas analíticas utilizando soluções-padrão (Merck) de concentrações conhecidas para cada elemento químico, foi realizada a otimização do equipamento a partir dos ajustes no ganho da lâmpada de cátodo oco e no fluxo dos gases (mistura acetileno/ar) injetados, cujos parâmetros de análise estão presentes na Tabela 2. Alíquotas das soluções das amostras, material de referência e brancos analíticos (~1 mL) foram injetadas no espectrômetro de absorção atômica com atomização por chama Agilent modelo 220 FS e analisadas em triplicata. O tempo de injeção para leitura das amostras foi 6 s e a correção do “background” foi feita utilizando lâmpada de deutério. As frações de massa e incertezas analíticas combinada foram obtidas em planilha Microsoft Excel após os cálculos dos fatores de diluição associado a cada amostra e a respectiva subtração do branco analítico.

Tabela 2 - Parâmetros utilizados nas análises químicas por FAAS.

Analito	Comprimento de onda (nm)	Abertura da janela (nm)	Tipo de chama
Ca	239,9	0,2	N ₂ O/Acetileno
Cu	324,8	0,5	Ar / Acetileno
Fe	248,3	0,2	Ar / Acetileno
Mn	279,5	0,2	Ar / Acetileno
Zn	213,9	0,1	Ar / Acetileno

Fonte O Autor.

3.3.4 GFAAS

Para realização das análises, foram construídas curvas de calibração utilizando soluções-padrão (Merck) de concentrações conhecidas para cada elemento químico de interesse. O sistema de injeção de amostra foi testado com a otimização do ganho das lâmpadas de cátodo oco assim como ocorreu para as análises por FAAS. Alíquotas (até 20 μL) das soluções de amostras, materiais de referência e brancos analíticos foram depositadas no tubo de grafite para a atomização. O equipamento Agilent modelo 240 Z AA com forno de grafite Agilent modelo GTA 120 foi empregado para a quantificação dos elementos químicos, os parâmetros de análise utilizados estão presentes na Tabela 3. Planilha Microsoft Excel foi utilizada para o cálculo das frações de massa e incertezas analíticas assim como realizado para as amostras do FAAS.

Tabela 3 - Parâmetros utilizados nas análises químicas por GFAAS.

Analito	Compriment		Amostra (μL)	Temperatur a ($^{\circ}\text{C}$)
	o de onda (nm)	Modificador de matriz		
Cu	324,8	-	15	2300
Fe	248,3	-	10	2300
Mn	279,5	-	10	2400
Zn	307,6	-	15	1900

Fonte O Autor.

3.3.5 FAES

A curva analítica foi construída utilizando solução-padrão de cálcio a 1000 mg L^{-1} (Merck) em concentrações conhecidas. Em seguida, foi realizada a otimização do equipamento a partir dos ajustes no fluxo dos gases (mistura óxido nítrico/acetileno) injetados e no sinal emitido pelos átomos de cálcio, utilizando branco analítico e pontos da curva de calibração, cujos parâmetros de análise estão presentes na Tabela 4. Alíquotas das soluções das amostras, material de referência e brancos analíticos foram analisadas em triplicata, com tempos de injeção de 5 s e de leitura das amostras de 6 s. As concentrações de cálcio e suas respectivas incertezas analíticas combinada foram obtidas da mesma maneira que foi realizado na Seção 3.3.2.

Tabela 4 - Parâmetros utilizados nas análises químicas por FAES.

Analito	Comprimento de onda (nm)	Abertura da janela (nm)	Tipo de chama
Ca	422,7	0,5	N ₂ O / Acetileno

Fonte O Autor.

3.4 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Um dos aspectos mais relevantes da presente pesquisa é a garantia de controle da qualidade dos procedimentos analíticos. Para isso, foram avaliadas as fontes individuais de incertezas analíticas das análises químicas. Ferramentas estatísticas foram aplicadas para a comprovação do nível metrológico alcançado nas análises químicas, nos ensaios de homogeneidade, estabilidade, massa mínima e na certificação, assim como técnicas estatísticas univariadas e multivariadas para a avaliação da homogeneidade das concentrações de elementos químicos nos candidatos a material de referência (Tabela 5).

Tabela 5 – Testes estatísticos utilizados para cada etapa realizada para adequabilidade do candidato a MR.

O que foi testado	Teste estatístico
Normalidade dos dados e de seus resíduos da ANOVA	Teste de Shapiro-Wilk (95% de confiança)
Massa mínima	Constante de amostragem Ks*
Homogeneidade intra e inter frascos	ANOVA (nível de 95% de confiança)
Estabilidade	Análise de variância uni e multivariada (parcelas subdividas no tempo)
Incerteza combinada para Certificação	$U_{cert} = k * \sqrt{u_{car}^2 + u_{entre}^2 + u_{curto}^2 + u_{longo}^2}$

Fonte: O Autor.

3.4.1 Incerteza analítica

Para estimar a incerteza analítica dos resultados obtidos pelas técnicas analíticas utilizadas, foram combinadas as incertezas individuais relativas à precisão (repetições analíticas) e à exatidão (desvio com relação aos materiais de referência analisados) conforme o EURACHEM / CITAC Guide CG (ELLISON; WILLIAMS, 2012). As incertezas analíticas foram expandidas em nível de 95% de confiança ($k=2$).

3.4.2 Análises estatísticas

Técnicas estatísticas univariadas foram aplicadas após a verificação dos requisitos quanto à normalidade dos resíduos e homocedasticidade de variâncias. ANOVA e regressão linear foram realizadas no programa de computador Statistica (STATSOFT, 2011) para avaliação da homogeneidade e da estabilidade das frações de massa dos elementos químicos quantificados nos candidatos a material de referência. Na determinação de massa mínima foi utilizada a constante de amostragem K_s para estimar a subporção de massa ideal (INGAMELLS; SWITZER, 1973; INGAMELLS, 1974). Todos os testes estatísticos e gráficos utilizados neste estudo foram feitos utilizando o Statistica (STATSOFT, 2011) e planilha eletrônica Excel®.

3.4.2.1 Avaliação da normalidade

Para aplicação dos testes estatísticos univariados, faz-se necessária à verificação da normalidade dos dados e a homocedasticidade das variâncias dos resíduos por meio de testes estatísticos. Testar a normalidade dos resíduos torna-se essencial para que os resultados das análises de variância sejam confiáveis. A avaliação da normalidade dos valores e de seus resíduos foi realizada utilizando o teste de Shapiro-Wilk em nível de 95% de confiança, em que foi avaliada a hipótese nula de que os dados apresentam distribuição normal. Para ser aceita a hipótese nula o valor de probabilidade, p valor calculado, deve ser maior que o nível de significância, ($\alpha = 0,05$), sendo satisfeita esta condição, aceita-se a normalidade dos dados avaliados.

3.4.2.2 Massa mínima

A constante de amostragem K_s proposta por Ingamells (INGAMELLS; SWITZER, 1973; INGAMELLS, 1974) foi utilizada para avaliação das massas mínimas de amostra propostas neste estudo. Essa constante visa avaliar a relação entre a massa da amostra e o coeficiente de variação para determinações consecutivas de um elemento químico, garantindo 1% de erro mínimo quando se é realizada uma subamostragem em uma determinação simples para uma massa ideal de amostra. Detalhes sobre os cálculos dessa constante podem ser verificados nos trabalhos de Ingamells e Switzer (1973) e Ingamells (1974).

3.4.2.3 Avaliação da homogeneidade

ANOVA foi utilizada para avaliar tanto se havia diferenças significativas em nível de 95% de confiança nas concentrações de elementos químicos nos diferentes frascos analisados, como as diferenças dentro de um mesmo frasco (ABNT, 2012a). Primeiramente, foi testada a normalidade dos dados por meio do teste descrito na Seção 3.4.3.1, após verificada a normalidade dos resíduos e a homocedasticidade das variâncias, aplicou-se a ANOVA para verificar a hipótese de que as concentrações médias obtidas para Cu, Fe e Mn não diferem estatisticamente em nível de 95% de confiança.

3.4.2.4 Avaliação da Estabilidade

A análise de variância com dados repetidos ao longo do tempo considera o tempo (ou o espaço) como uma variável que é controlada pelo pesquisador, cujas características dependem do objetivo do experimento, normalmente envolvem 2 fatores: tratamentos e tempos. O objetivo principal deste tipo de análise é avaliar as tendências de um tratamento ou grupos de tratamentos ao longo do tempo. Para realizar esse estudo, precisa-se estabelecer uma unidade experimental (ou parcela), na qual são realizadas as observações e um ou mais tratamentos. Neste estudo, as parcelas foram os frascos dos candidatos a MR e os tratamentos foram estufa (65 °C), ambiente (25 °C) e freezer (-20 °C) (VIVALDI, 1999).

Este teste pode ser realizado de maneira uni e multivariada. Em uma análise de variância univariada, a hipótese dos tratamentos causarem efeitos nulos é testada independentemente para cada uma das variáveis. Já na multivariada, a hipótese nula (H_0) de efeito dos tratamentos serem nulo é testada para todas as variáveis (tempo) simultaneamente. Sendo assim, considera-se a existência de correlações entre as variáveis de resposta conforme o tempo (VIVALDI, 1999). Neste estudo, foram aplicadas as abordagens uni e multivariadas para avaliar as influências dos tratamentos no decorrer do tempo, causando (ou não) degradação nos candidatos a Material de Referência.

3.4.2.5 Cálculo da incerteza para certificação

Para atribuição dos valores de incerteza da certificação de cada uma das concentrações dos elementos químicos determinados, devem-se ser levadas em consideração as incertezas associadas a cada etapa envolvida no processo. Utilizou-se um fator de abrangência igual a 2. Com isso o valor de U_{cert} pôde ser calculado por meio da Equação 2 (ABNT, 2012a).

$$U_{cert} = k * \sqrt{u_{car}^2 + u_{entre}^2 + u_{curto}^2 + u_{longo}^2} \quad (2)$$

na qual,

U_{cert} = incerteza padrão em % para a certificação dos resultados;

k = fator de abrangência;

u_{car} = incerteza padrão associada a caracterização dos elementos químicos pelas diferentes técnicas;

u_{entre} = incerteza padrão associada a homogeneidade entre frascos;

u_{curto} = incerteza padrão associada a estabilidade a curto prazo;

u_{longo} = incerteza padrão associada a estabilidade a longo prazo;

O cálculo de cada uma das componentes de incerteza utilizados para a determinação da incerteza de certificação foi feito utilizando o desvio padrão entre a diferença do resultado obtido para cada replicata pela média dos resultados, depois o resultado deste desvio padrão foi dividido pela média das concentrações e multiplicado por cem para obter uma incerteza percentual para cada elemento em cada componente

da incerteza. No caso das componentes de incerteza para os elementos Ca e Zn, que não foram analisados para homogeneidade entre frascos, estabilidade a curto prazo e estabilidade a longo prazo, foi utilizado a mediana dos demais elementos analisados para cada um desses estudos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

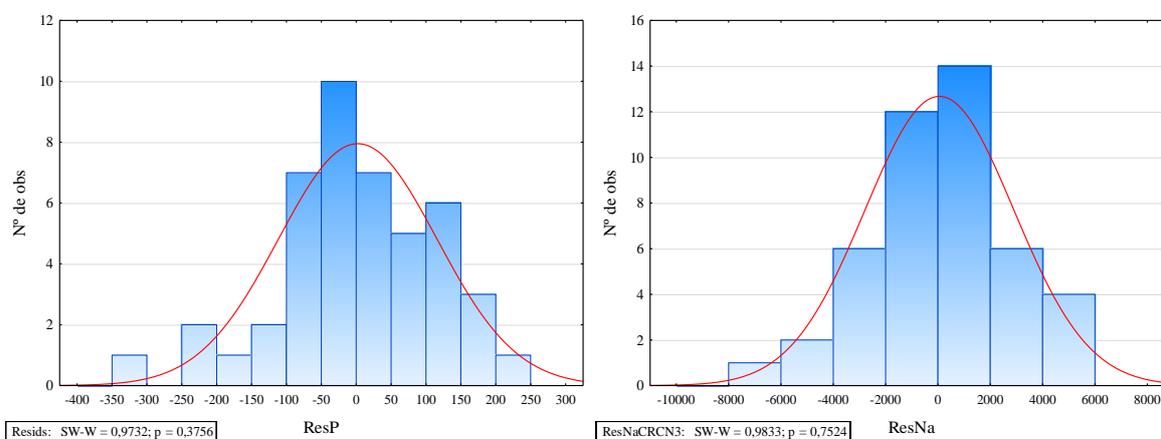
Devido à heterogeneidade observada para o candidato a MR CRCN3, o capítulo Resultados e Discussão foi dividido no estudo da heterogeneidade deste candidato e nas demais etapas para avaliação da adequabilidade dos candidatos CRCN1 e CRCN2.

4.1 CANDIDATO A MR CRCN3 - ESTUDO DE HETEROGENEIDADE

Para averiguar a heterogeneidade observada qualitativamente no candidato a MR CRCN3, foram quantificados os elementos químicos Na e P por EDXRF em 10 frascos escolhidos aleatoriamente, sendo retiradas 3 porções de cada um, e de cada porção três subporções para avaliação intra e inter frascos, totalizando 45 subporções analíticas.

Para cada elemento químico, aplicou-se o teste de Grubbs para identificar resultados anômalos, no qual não foram observados valores fora de controle para Na e P. Para avaliar a normalidade dos resíduos, exigência para utilização de ANOVA, foram construídos histogramas. De acordo com a rotina do programa de computador, aplicou-se, ainda, o teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade dos resíduos. Esses histogramas devem refletir uma distribuição normal (BINGHAM; FRY, 2010), como se pode observar na Figura 28.

Figura 28 – Histogramas da distribuição dos resíduos obtidos a partir dos dados de Na e P e os valores da probabilidade p do teste de Shapiro-Wilk para avaliação de homogeneidade das concentrações do material CRCN3.



Fonte: O Autor.

Para os elementos químicos estudados, foram observadas distribuições simétricas, indicando que há normalidade dos resíduos, pois os p-valores obtidos por meio do teste de Shapiro-Wilk de 0,7524 para Na 0,3756 para P, foram superiores ao nível de significância de 5%. Comprovando-se a normalidade dos resíduos, na Tabela 6, estão presentes os resultados obtidos por ANOVA para o estudo de homogeneidade das concentrações de Na e P, para o candidato a MR CRCN3 com $n = 45$.

Tabela 6 – Resultados da ANOVA para a avaliação da homogeneidade intra e inter-frascos das concentrações de Na e P no candidato a MR CRCN3.

Analito		Média (mg kg ⁻¹)	Desvio padrão	CV(%)	p-valor
Na	Intra	103150,6	4053,7	4,4	0,167
	Inter		4576,8	3,9	0,000001
P	Intra	5261,6	206,7	4,2	0,167
	Inter		220,1	3,9	0,000000

Fonte: O Autor.

Os resultados da Tabela 6 mostram que, para os dois elementos químicos analisados, há indícios de heterogeneidade quando comparadas as médias de diferentes frascos (inter frascos) (p -valor $< 0,05$), o que corrobora a formação de aglomerados esbranquiçados neste material. Apesar de apresentar valores de p -valor adequados para a comparação entre os frascos, optou-se por eliminar este candidato a MR, visto a não garantia da qualidade do material nesta etapa para a certificação do mesmo de acordo com ABNT, (2012a).

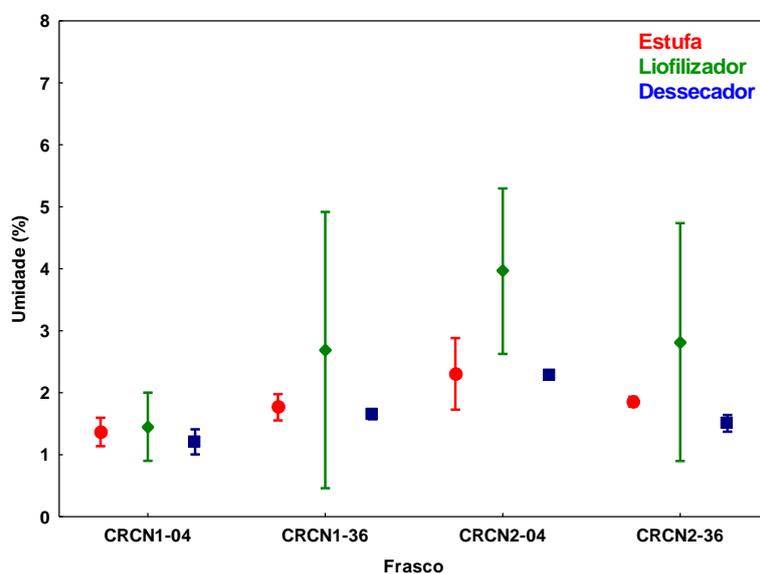
4.2 CANDIDATOS A MR CRCN1 e CRCN2

Nos próximos tópicos serão avaliadas as características físicas e químicas dos dois candidatos a Material de Referência que atenderam, satisfatoriamente, as etapas de preparação e homogeneização para averiguar sua adequabilidade para a produção de um Material de Referência de insetos.

4.2.1 Determinação da umidade residual

A determinação da umidade foi realizada por três métodos diferentes. Em seguida, foi realizada a comparação das médias dos resultados (triplicata para cada amostra) obtidos e suas respectivas incertezas para cada tratamento de determinação do teor de água para cada um dos dois lotes de amostras, como pode ser observado na Figura 29. A partir desses dados, pôde-se determinar o método mais adequado de determinação de umidade para os candidatos a MR.

Figura 29 – Valores médios de umidade residual e suas respectivas incertezas em nível de 95% de confiança obtidos pelos diferentes métodos estudados.



Fonte: O Autor

Pode-se notar que os resultados apresentados para o método de determinação de umidade por meio da liofilização apresentaram maior variação em comparação com os demais métodos. Isto pode ser explicado pela possível perda de massa de amostra devido ao vácuo utilizado pelo equipamento e/ou a manipulação destas amostras a cada pesagem. Partes das partículas dos materiais ficaram aderidas ao filme de polipropileno utilizado para selar as amostras, o que pode ter acarretado perda de massa de amostras neste método, acarretando na maior variação entre as replicatas.

Os resultados obtidos para a determinação de umidade por aquecimento em estufa e dessecador a vácuo não apresentaram diferenças em seu intervalo de confiança. Apesar do método de utilização de dessecador a vácuo apresentar menores incertezas

para todas as amostras analisadas, este processo pode ser bastante moroso, pois, a determinação de umidade pode durar até 10 dias para a sua conclusão. Dependendo do tempo necessário para a análise química e obtenção de seus resultados, este seria um prazo incoerente com relação a capacidade analítica e a demanda de diversos laboratórios. Na utilização da estufa, este mesmo parâmetro pode ser determinado com nível metrológico adequado (confiança de 95%), porém em um tempo de até, no máximo, 48 horas.

A determinação da umidade percentual foi realizada no decorrer de todas as etapas pelo método utilizando estufa. O resultado percentual de umidade residual obtido para o candidato a MR CRCN 1 foi $1,57 \pm 0,27$, enquanto, para o CRCN 2, foi $2,10\% \pm 0,45\%$, em nível de 95% de confiança. Esses valores médios são considerados baixíssimos para materiais produzidos a partir de matrizes biológicas, o que pode ser considerado excelente do ponto de vista analítico, pois as análises químicas são realizadas em massa seca. Para algumas técnicas analíticas com a Análise por Ativação Neutrônica Instrumental, teor de água residual mais elevado pode resultar em violação das cápsulas durante a irradiação com nêutrons. Estudos comprovam também que teores de umidade abaixo de 5% em alimentos secos resultam em baixo risco de crescimento bacteriano e de reações químicas (FELLOWS, 2017), o que é essencial para a estabilidade de um MR.

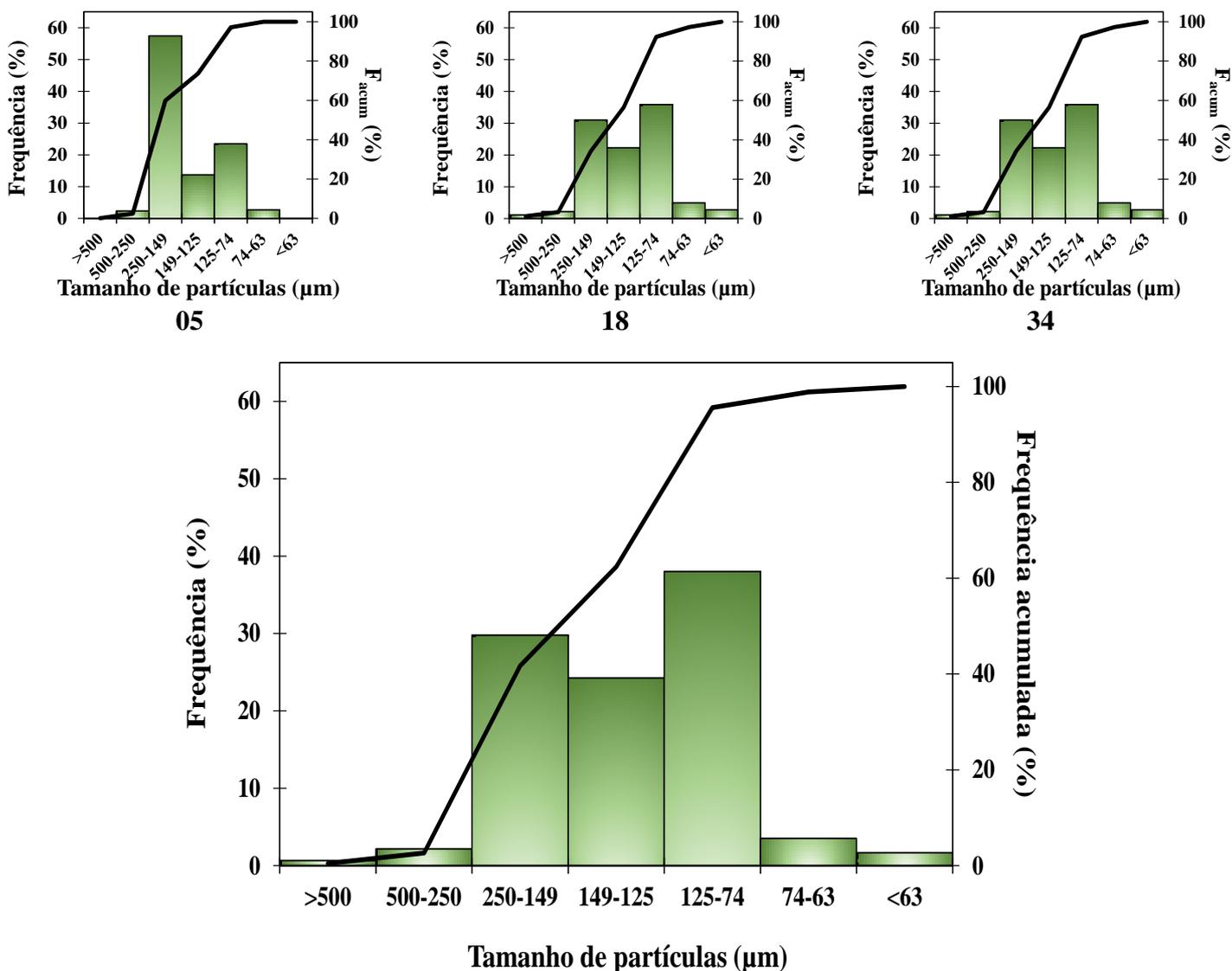
4.2.2 Granulometria

As Figuras 30 e 31 mostram os resultados do estudo de granulometria por peneiramento utilizando malhas de diversos tamanhos dos candidatos a MR CRCN1 e CRCN2 referentes aos frascos 05, 18 e 34 e o resultado médio entre eles, respectivamente. Nessas figuras podem ser também observadas os tamanhos de partículas, sua distribuição e a distribuição acumulada dessas partículas para os dois candidatos a material de referência.

Ao avaliar os frascos individualmente na Figura 30, o frasco 05 apresentou distribuição equivalente ao dobro dos demais frascos no intervalo de tamanho de partículas de 250 a 149 μm , granulometria considerada inadequada para este tipo de material, porém essa diferença dos resultados entre o frasco 05 e os demais ocorreu devido a um defeito apresentado no equipamento no momento da agitação desta

amostra, impossibilitando que o procedimento fosse executado da mesma maneira dos demais. Desse modo, a análise de distribuição de partículas realizada para a amostra 05 foi desconsiderada para a construção do gráfico da distribuição de tamanho médio de partícula.

Figura 30 – Distribuição individual para os frascos A, B e C e distribuição acumulada dos tamanhos de partículas do candidato a Material de Referência CRCN1.

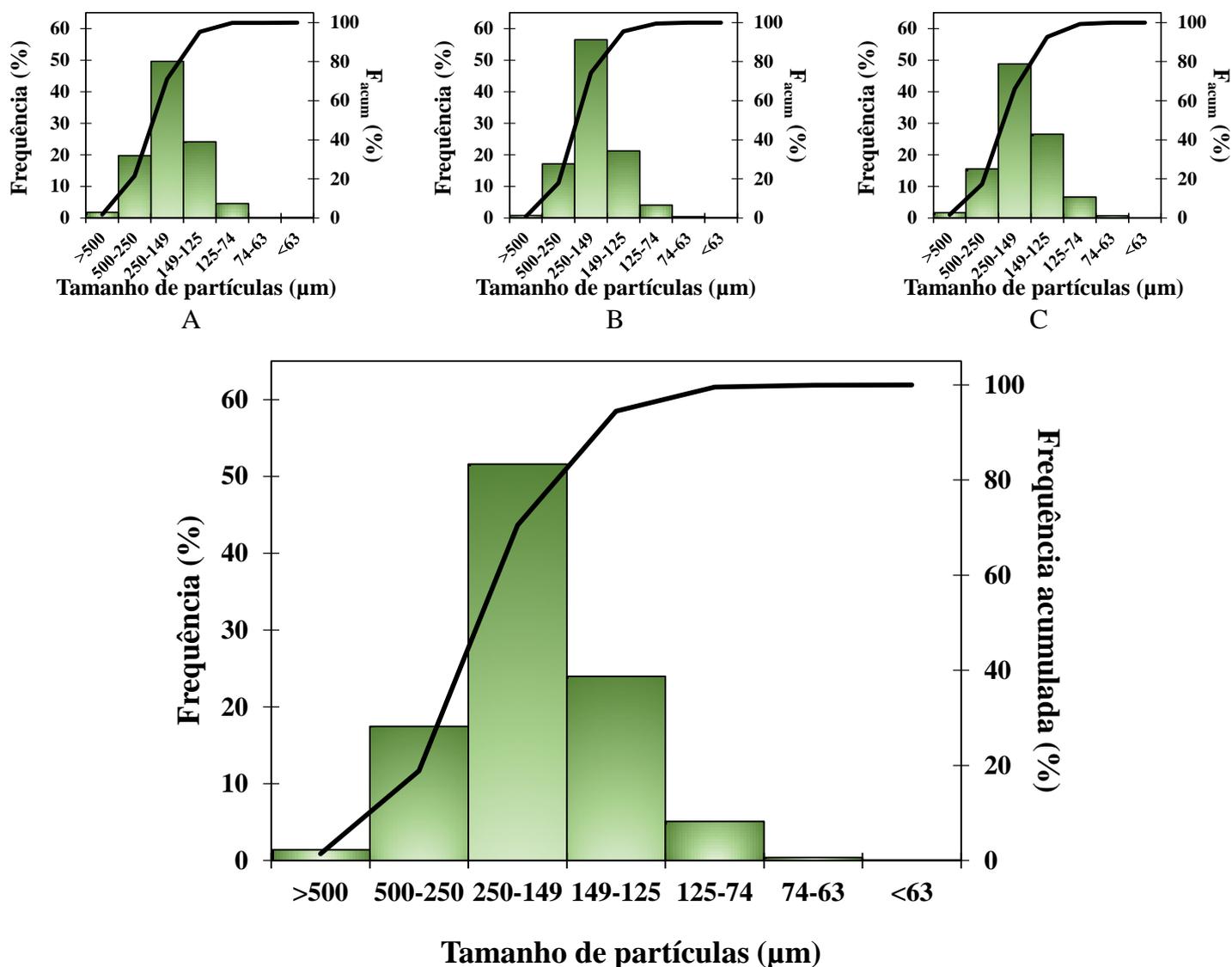


Fonte: O Autor.

No candidato a MR CRCN 1, apenas 3% apresentaram tamanho de partículas superior a 250 μm. Assim, pode-se afirmar que sua distribuição granulométrica está adequada para utilização como material de referência. Este resultado está condizente

com vários materiais de referência de matrizes biológicas da *International Atomic Energy Agency* – IAEA, tais como o IAEA 407 (Tecido de peixe), IAEA 432 (Mexilhão) e o IAEA 336 (Lichen) que apresentam tamanhos de partículas em torno de 250 μm . Pode-se observar ainda que 94% de suas partículas estão distribuídas em uma faixa que varia de 250 μm a 74 μm , indicando distribuição estreita e homogênea do tamanho de partículas do CRC1.

Figura 31 – Distribuição individual para os frascos A, B e C e distribuição acumulada dos tamanhos de partículas do candidato a Material de Referência CRCN2.



Fonte: O Autor.

No segundo candidato, nota-se que em torno de 17% deste material apresenta granulometria superior a 250 μm , isto é, mais de 80% deste material apresenta tamanho de partículas menor que o utilizado na maioria dos materiais de matrizes biológicas. Estes mesmos 80% de partículas estão distribuídas, assim como observado para o primeiro material em uma faixa estreita de 250 μm a 74 μm . Este tamanho de partículas foi considerado um perfil típico, pois distribuições largas levam a diferentes tamanhos de partículas, o que poderia acarretar em uma segregação dessas partículas, interferindo diretamente na homogeneidade do material (KRAMER et al., 2003).

4.2.3 Estudo da Massa mínima

A Tabela 7 apresenta os valores da constante de amostragem K_s para as massas mínimas de candidato a MR estabelecidas para estudar esta propriedade, assim como a média das concentrações obtidas, $K_s^{0,5}$, que é referente ao coeficiente de variação (%) esperado caso tivesse sido analisado 1 g de amostra, e o coeficiente de variação esperado para a análise do frasco inteiro R_{20} (20 g).

Tabela 7 – Média das concentrações, constante de amostragem K_s (g), erro de amostragem $K_s^{0,5}$ (%) e erro de amostragem associado à análise química do frasco inteiro (20 g) R_{20} (%) para o candidato a MR CRCN1.

Massa	Parâmetros Estatísticos	Cu	Fe	Mn
0,75 g	Média (mg kg^{-1})	4,39	23,7	2,85
	K_s (g) 1%	303	47,2	31,9
	$K_s^{0,5}$ (%)	17,4	6,87	5,65
	R_{20} (%)	3,89	1,54	1,26
1,25 g	Média (mg kg^{-1})	5,02	24,4	2,70
	K_s (g) 1%	280	23,7	26,2
	$K_s^{0,5}$ (%)	16,75	4,87	5,12
	R_{20} (%)	3,74	1,09	1,14

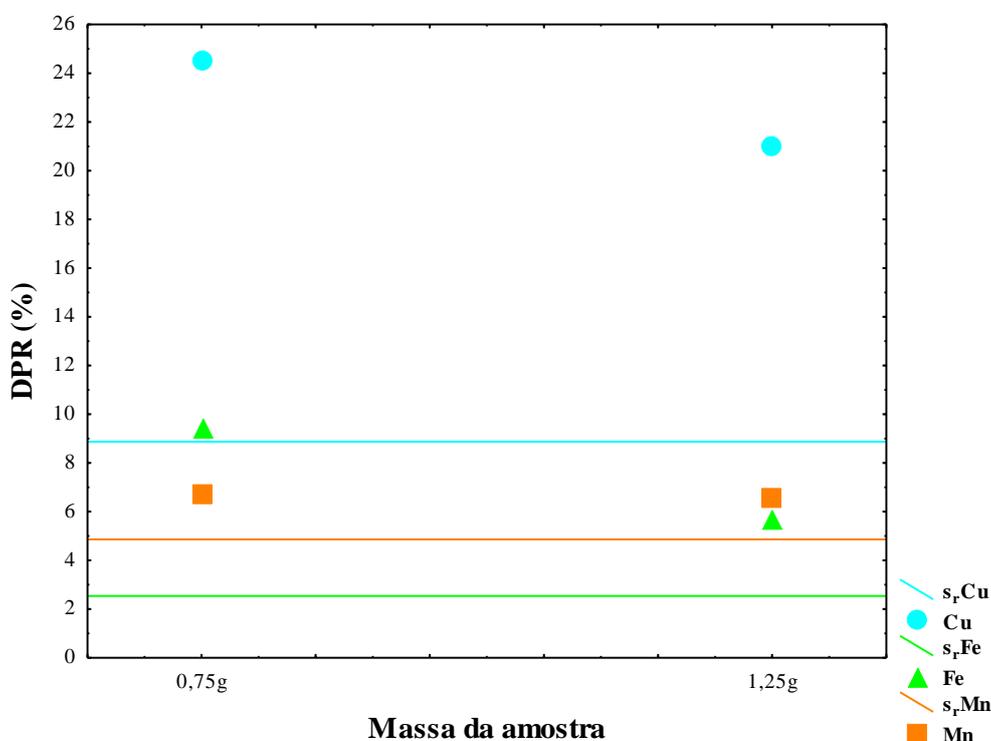
Fonte: O Autor.

Para o candidato a MR CRCN1, ao comparar os valores dos parâmetros estatísticos calculados para esse estudo (Tabela 7), nota-se que, para todos os elementos

químicos, a constante de amostragem (K_s) foi menor para a massa de 1,25 g ficando em 280 g para Cu, 23,7 g para Fe e 26,2 g para Mn. É evidente que garantir erro de amostragem de 1% não é factível, pois o erro de amostragem pode ser cerca de 10 a 1000 vezes superior ao erro analítico (PETERSEN et al, 2005; MARKERT, 1995). Ao comparar-se os resultados de $K_s^{0,5}$, é possível inferir que apenas os elementos químicos Fe e Mn seriam passíveis de certificação, uma vez que os erros de amostragem referentes às análises de Cu foram praticamente idênticos para as massas de 0,75 g e 1,25 g (diferença de aproximadamente 0,4%). Por meio dos cálculos da Tabela 7, pode-se afirmar que, para todos os elementos químicos estudados, a massa de 1,25 g teve sempre um erro amostral menor do que a massa de 0,75 g.

A Figura 32 apresenta o Desvio padrão relativo (DPR) em função da massa e o desvio padrão em % referente à repetitividade do método analítico (s_r) para o estudo de massa mínima por FAAS para os elementos químicos Cu, Fe e Mn no Candidato a MR CRCN1.

Figura 32 – Desvio padrão relativo - DPR em função da massa e o desvio padrão de repetitividade (s_r) para o estudo de Massa mínima por FAAS para os elementos químicos Cu, Fe e Mn no Candidato a MR CRCN1.



Fonte: O Autor.

Para se estimar a massa mínima de amostra necessária para análise do candidato a MR, foi feita também a comparação na forma percentual, entre o DPR e o s_r . Essa estimativa foi obtida a partir do método que estima a repetitividade de métodos analíticos (ISO, 2005a). De acordo com ABNT (2012a), a massa mínima de amostra ser utilizada para que os resultados de certificação sejam válidos deve ser aquela em que o DPR se iguale, ou seja, menor que o s_r .

A Partir dos resultados da Figura 32, pode se observar que, para nenhuma massa estudada, os valores do desvio padrão relativo dos elementos químicos Cu, Fe e Mn sequer se igualam ao valor do desvio padrão de repetitividade do método, apesar dos resultados de Fe e Mn se aproximarem do ideal. O resultado mais distante do adequado foi o de cobre, em concordância com resultados obtidos através da constante de amostragem K_s (Tabela 7).

Apesar da massa de 1,25g ter apresentado resultados com menores erros de acordo com o estudo da constante de amostragem, mesmo assim não seriam adequadas para a certificação das concentrações destes elementos químicos. Tal resultado pode ser melhor compreendido, ao se avaliar a g quantidade de sulfato (80% m/m) adicionada na moagem para a obtenção de tamanho de partículas ideal, visto que o sulfato não apresentou concentrações consideráveis (mesma ordem de grandeza dos brancos analíticos) destes elementos químicos. Deste modo, a adição de sulfato pode ter causado uma “diluição” das amostras devido a menor quantidade de massa de insetos.

Na Tabela 8, são mostrados os parâmetros estatísticos utilizados para estudar a massa mínima que garantam erros de amostragem compatíveis a análises de alimentos por meio da constante de Ingamells (INGAMELLS; SWITZER, 1973; INGAMELLS, 1974) para o candidato a MR CRCN2.

Os resultados obtidos para o segundo candidato a MR mostram valores dos parâmetros estatísticos bem melhores que os do primeiro candidato para todos os três elementos químicos utilizados para o teste de massa mínima. Similarmente aos resultados do candidato a MR CRCN1, a massa de 1,25 g obteve melhor desempenho, tendo erros percentuais associados à amostragem de 7,38 % para cobre, 1,53 % para ferro e 1,05% para Mn. Erros considerados adequados para estes tipos de estudos (ABNT, 2012a), inclusive para um material de referência.

Tabela 8 – Média das concentrações, constante de amostragem K_s (g), erro de amostragem $K_s^{0,5}$ (%) e erro de amostragem associado à análise química do frasco inteiro (20 g) R_{20} (%) para o candidato a MR CRCN2.

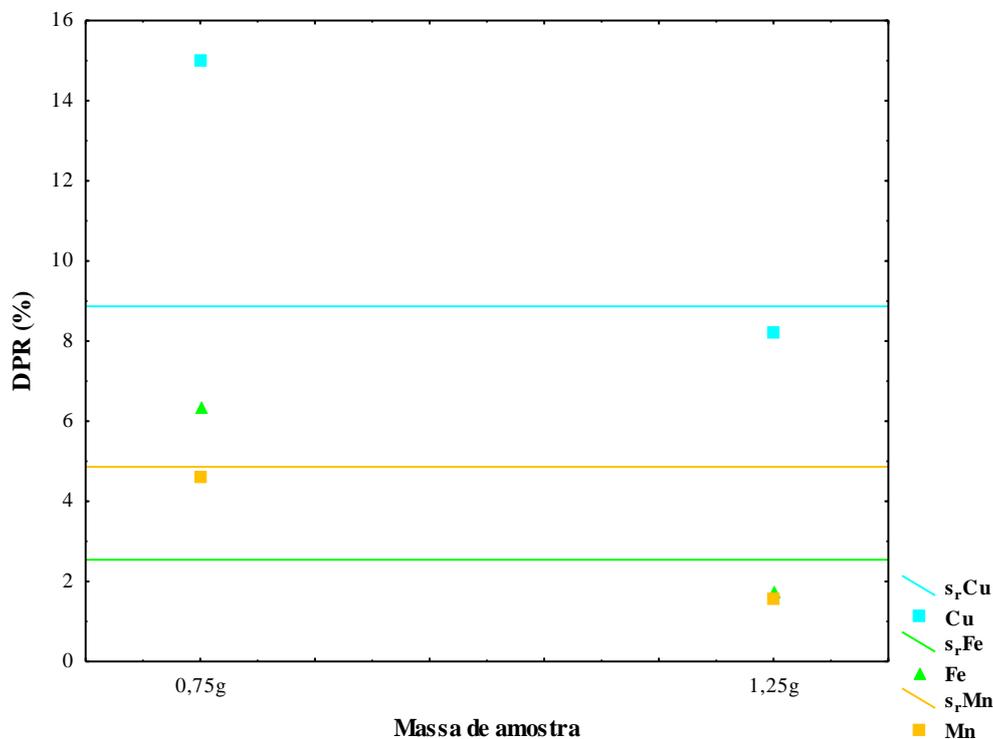
Massa	Parâmetros Estatísticos	Cu	Fe	Mn
0,75 g	Média (mg kg^{-1})	10,4	49,5	13,0
	K_s (g) 1%	148	17,6	13,6
	$K_s^{0,5}$ (%)	12,2	4,20	3,69
	R_{20} (%)	2,72	0,94	0,82
1,25 g	Média (mg kg^{-1})	10,2	51,1	12,85
	K_s (g) 1%	54,4	2,33	1,10
	$K_s^{0,5}$ (%)	7,38	1,53	1,05
	R_{20} (%)	1,65	0,34	0,23

Fonte: O Autor.

Portanto, os resultados obtidos afirmam para os fatores estatísticos utilizados para avaliar a massa mínima de amostra são satisfatórios, mostrando que, para os elementos químicos estudados, o candidato a material de referência será útil para análises destes metais por diversas técnicas. A massa de 1,25 g é compatível com inúmeras técnicas analíticas como AAS, Espectrometria de Massas com Plasma Acoplado Indutivamente – ICP-MS, Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Acoplado Indutivamente – ICP-OES e Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Comprimento de Onda - WDXRF, por exemplo (CASTRO, 2017).

Para avaliar se realmente essa massa é a ideal para utilização na certificação dos resultados, a Figura 33 apresenta o Desvio padrão relativo (DPR) em função da massa e o desvio padrão de repetitividade do método analítico (s_r). A comparação deve resultar em valores de DPR iguais ou menores que aqueles estimados para s_r . A partir dos resultados, foram obtidos valores de desvio padrão relativo menores para a massa de 1,25g, considerando-se todos os elementos químicos estudados. Porém, o valor de DPR para Cu e Fe só estão abaixo do desvio padrão de repetitividade (s_r) apenas para a massa de 1,25. Para Mn, a massa de 0,75 g também poderia ser considerada adequada para utilização na certificação e validação de métodos, pois o critério $\text{DPR} < s_r$ foi atendido para ambas as massas mínimas testadas.

Figura 33 – Desvio padrão relativo em função da massa e o desvio padrão de repetitividade para o estudo de Massa mínima por FAAS para os elementos químicos Cu, Fe e Mn no Candidato a MR CRCN2.



Fonte: O Autor.

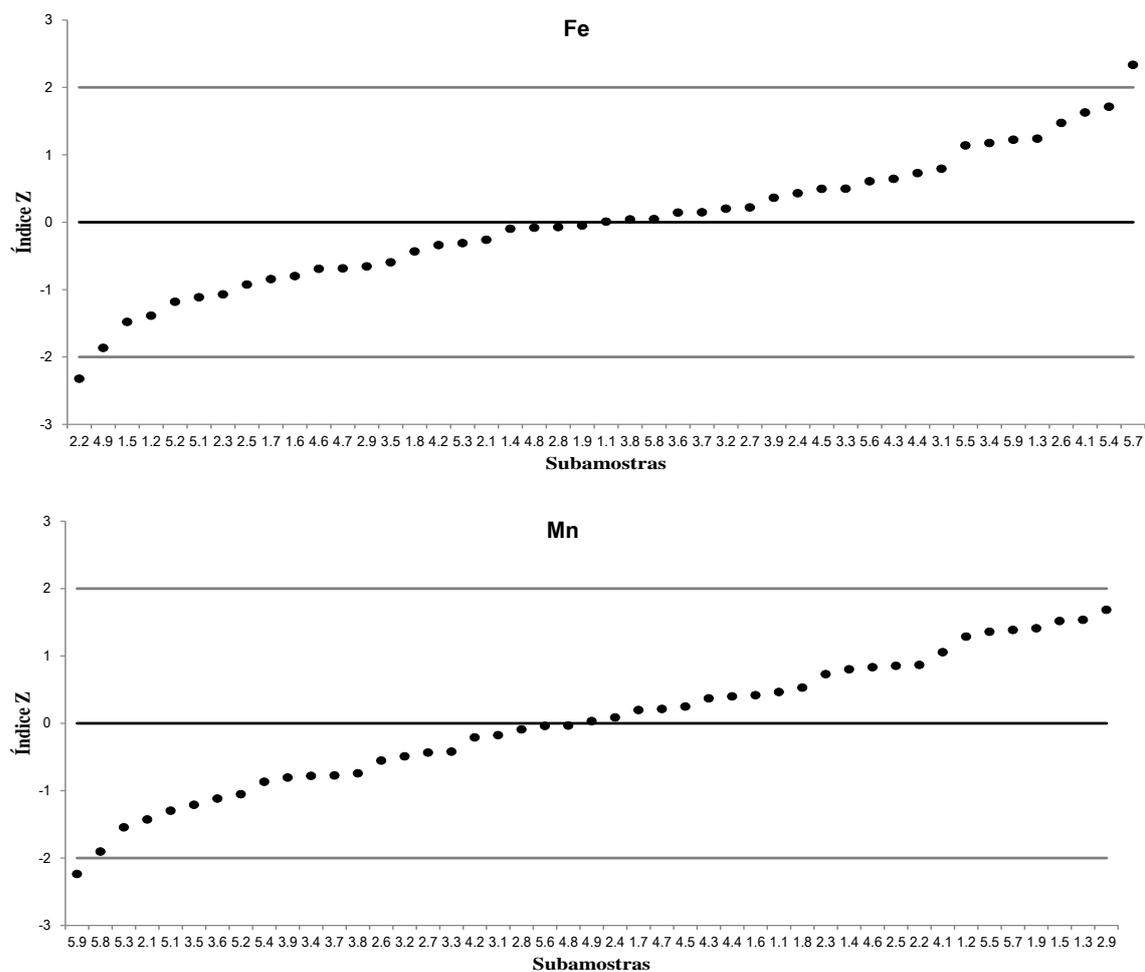
Para utilização do candidato a MR CRCN2, pode-se afirmar que seria necessária a utilização de uma massa de, no mínimo, 1,25 g, pois atende a uma gama maior de elementos químicos para quantificação. Desta maneira, foi a massa utilizada em todos os testes realizados com os candidatos a material de referência até a etapa final de certificação das concentrações de elementos químicos e a definição de suas incertezas associadas.

Do mesmo modo que o candidato CRCN1, houve adição de sulfato de sódio para a moagem e peneiramento (peneira de 63 μm), porém em quantidade inferior, corroborando os melhores resultados obtidos para o candidato a MR CRCN2 em todos os elementos químicos estudados. Apesar dessa adição, a massa de 1,25g é compatível com a utilizada por Zeiler e Shakhashiro, (2005) que utilizaram massa mínima de 1g de amostra de alga para a caracterização de Ca, Cu, Fe, Mn e Zn por ICP-OES, e para alguns materiais de referência de matrizes complexas como o *Standard Reference Material SRM 1546a – Meat Homogenate* (homogeneizado de carne).

4.2.4 Estudo da Homogeneidade

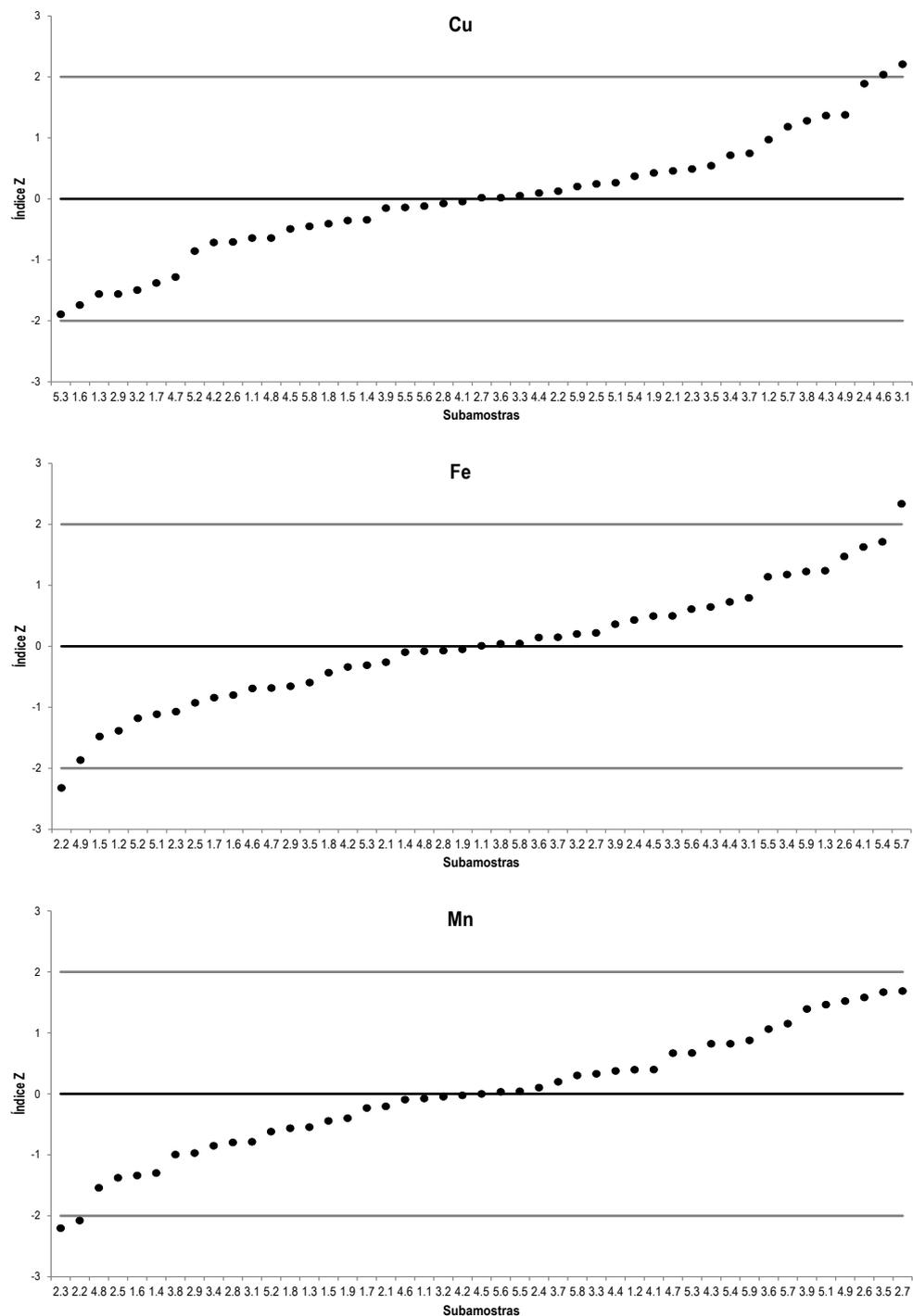
Para cada um dos 5 frascos de candidato a MR de insetos utilizados no estudo da homogeneidade, foram analisadas 3 porções analíticas (4 g) e destas retiradas 3 subporções de 1,25 g, totalizando 45 porções analíticas independentes para cada candidato a MR, o que possibilitou o estudo da precisão nas determinações das concentrações de Cu, Fe e Mn a partir do cálculo de índice z ($|x_i - \bar{X}|/DP$). As Figuras 34 e 35 mostram os valores de índices z para as porções analisadas por FAAS para os elementos químicos determinados nos candidatos a MR CRCN1 (Fe e Mn) e CRCN2 (Cu, Fe e Mn). Para que as análises químicas empregadas fossem satisfatórias em nível de 95% de confiança os valores de z deveriam estar entre -2 e 2. As amostras foram identificadas utilizando a numeração de 1 a 5n os frascos e 1 a 9 nas subamostras

Figura 34 – Valores de índice z obtidos para Fe e Mn por FAAS no Candidato a MR CRCN1.



Fonte: O Autor.

Figura 35 – Valores de índice z obtidos para cobre, ferro e manganês por FAAS no Candidato a MR CRCN2.



Fonte: O Autor.

Foi observado no material CRCN1 que, para os elementos Fe e Mn apenas o valor de uma subamostra esteve fora do intervalo adequado de -2 a 2 (nível de 95% de

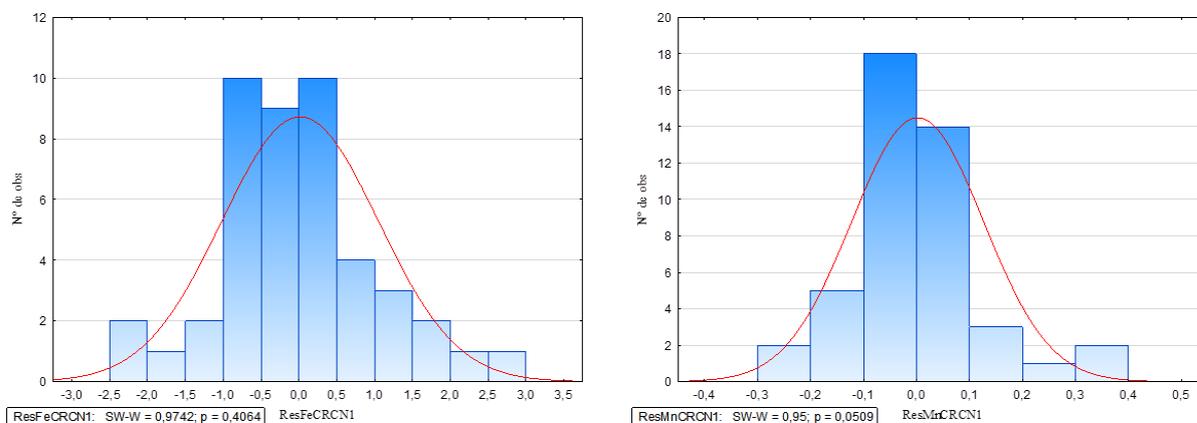
confiança), indicando que estes resultados merecem a devida atenção. Porém, como as amostras são de uma mesma população e no cálculo do escore z é levado em conta o desvio padrão para a população, o teste z pode ser considerado bastante restritivo. Neste caso, todos os valores de desvio padrão foram bem similares, o que diminuiu bastante o valor do denominador por se tratar da mesma população. Como é apenas um valor em quarenta e cinco e eles ainda estão no intervalo de -3 a 3, esses valores serão utilizados sem tratamento para o estudo da homogeneidade, devido ao fato não se esperar que venham a interferir na normalidade do conjunto de dados.

Da maneira semelhante ao que ocorreu para o CRCN1, o candidato a MR CRCN apresentou apenas dois valores de escore z para cobre, ferro e manganês fora do intervalo de 95% de confiança. Como estiveram muito próximos a $|2|$, não sendo necessário a eliminação ou substituição destes no estudo da homogeneidade dos candidatos a MR, visto que os coeficientes de variação apresentados são menores que 6% para todos os elementos químicos determinados.

Para o estudo da homogeneidade intra- e inter- frascos, foram realizadas determinações de Cu, Fe e Mn em nove subporções analíticas referentes a três subamostras de cada um dos cinco frascos escolhidos aleatoriamente para ambos os candidatos a MR CRCN 1 e CRCN 2. Contudo, Cu apenas foi avaliado no CRCN2, pois os valores para o candidato CRCN1 estiveram próximos à concentração mínima detectável de 3 mg kg^{-1} . Para cada elemento químico, aplicou-se o teste de Grubbs para identificar resultados anômalos.

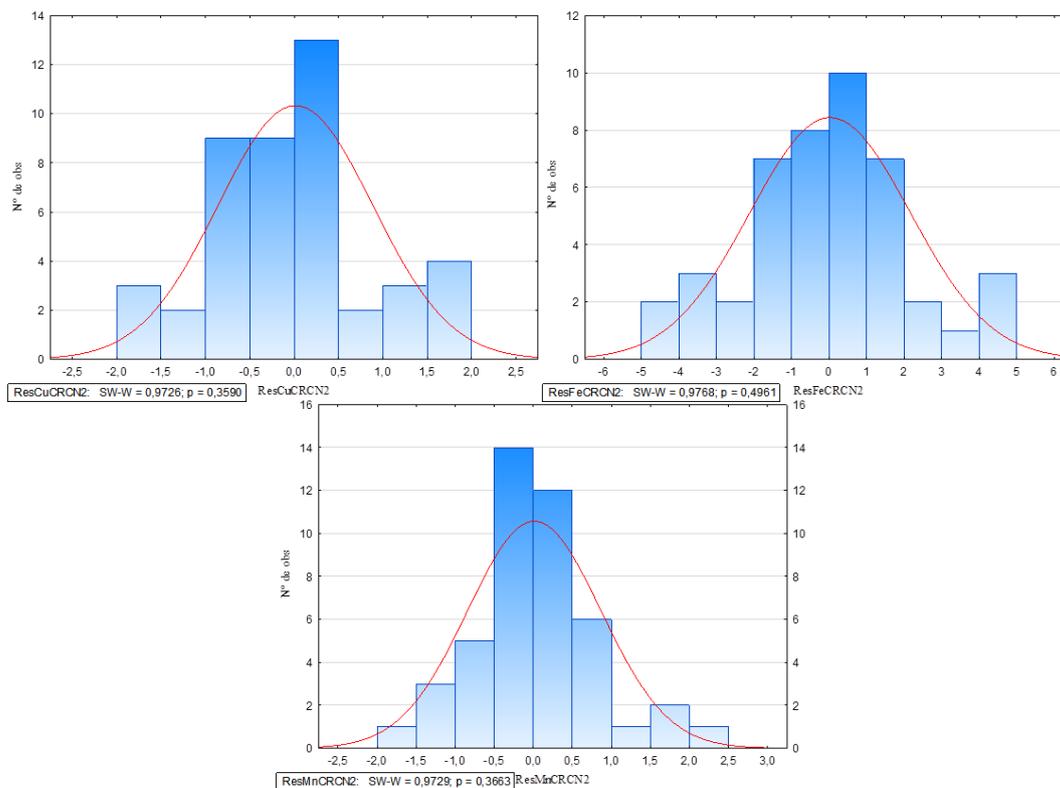
Os resíduos foram obtidos após a realização da ANOVA no Statistica, gerando-se os histogramas das Figuras 36 e 37. De acordo com a rotina do programa de computador, aplicou-se, ainda, o teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade dos resíduos de Fe e Mn para o CRCN1 e Cu, Fe e Mn respectivamente para o CRCN2. Esses histogramas devem refletir uma distribuição normal (BINGHAM; FRY, 2010).

Figura 36 – Histogramas da distribuição dos resíduos obtidos a partir dos dados de Fe e Mn e os valores da probabilidade p do teste de Shapiro-Wilk para avaliação de homogeneidade das concentrações de Fe e Mn do material CRCN1.



Fonte: O Autor.

Figura 37 – Histogramas da distribuição dos resíduos obtidos a partir dos dados de Cu, Fe e Mn e os valores da probabilidade p do teste de Shapiro-Wilk para avaliação de homogeneidade das concentrações de Cu, Fe e Mn do material CRCN2.



Fonte: O Autor.

Para todos os elementos químicos estudados na homogeneidade, foram observadas distribuições simétricas em forma de sino, indicando distribuição normal aproximada dos resíduos. Os resultados foram confirmados pelos p-valores obtidos por meio do teste de Shapiro-Wilk de 0,4064 para Fe e 0,0509 para Mns (Figura 36), corroborando, em nível de 5% de significância, a distribuição normal dos resíduos do conjunto de dados dos candidatos CRCN1 (Fe e Mn). Para o CRCN2, foram observadas curvas em forma de sino e uma distribuição simétrica dos dados (Figura 37), que também é corroborado pelo p valor ($p > 0,05$), atestando a normalidade dos resíduos em nível de 95% de confiança.

A Tabela 9 apresenta os resultados da ANOVA para comparação das concentrações de Fe e Mn, para o candidato a Material de Referência CRCN1. Os resultados mostraram que, apenas para Mn, a hipótese de que as médias das populações sejam iguais foi rejeitada ($p < 0,05$) para os diferentes frascos utilizados, porém não foram encontradas diferenças significativas em nível de 95% de confiança para a homogeneidade intra-frascos. Para Fe, a hipótese H_0 de que os valores médios sejam iguais foi aceita tanto entre frascos como dentro do mesmo frasco ($p > 0,05$), mostrando que o material pode ser considerado homogêneo para esse elemento químico.

Tabela 9 – Resultados da ANOVA para a avaliação da homogeneidade intra e inter-frascos das concentrações de Fe e Mn no candidato a MR CRCN1.

Analito		Média (mg kg ⁻¹)	Desvio padrão	CV(%)	p-valor
Fe	Intra	18,80	0,87	3,50	0,601
	Inter		0,65	4,64	0,0696
Mn	Intra	3,42	0,12	3,53	0,728
	Inter		0,16	4,79	0,000359

Fonte: O Autor.

A Tabela 10 apresenta os resultados obtidos pela ANOVA para Cu, Fe e Mn, respectivamente, para o candidato a Material de Referência CRCN2, tanto dentro de um mesmo frasco quanto em comparação aos diferentes frascos.

Tabela 10 – Resultados da ANOVA para a avaliação da homogeneidade intra e inter-frascos das concentrações de Cu, Fe e Mn no candidato a MR CRCN2.

Analito		Média (mg kg ⁻¹)	Desvio padrão	CV(%)	p-valor
Cu	Intra	9,83	0,83	4,7	0,813
	Inter		1,26	9,4	0,290
Fe	Intra	39,11	1,7	3,9	0,501
	Inter		2,3	5,3	0,208
Mn	Intra	16,32	0,51	3,1	0,655
	Inter		0,83	5,1	0,0974

Fonte: O Autor.

Para o candidato a Material de Referência CRCN2, a hipótese H_0 testada pela ANOVA de que o conjunto de dados obtidos para os elementos químicos cobre, ferro e manganês para os estudos intra- e inter-frascos provêm de um conjunto de dados com as mesmas médias foi aceita para todos os casos avaliados. Dessa maneira, pôde-se afirmar que o candidato a MR CRCN2 pode ser considerado homogêneo em nível de 95% de confiança.

Considerando todos os materiais analisados, o candidato a MR CRCN2 apresentou homogeneidade da distribuição das concentrações dos três elementos químicos avaliados, o CRCN1 apresentou indícios de heterogeneidade para manganês, enquanto o CRCN 3 teve a hipótese de homogeneidade rejeitada para os dois elementos químicos (Na e P) avaliados

4.2.5 Estudo da Estabilidade

Os resultados para o estudo da estabilidade serão apresentados em dois subtópicos, a avaliação das condições de transporte (Estabilidade a curto prazo) e o tempo de prateleira (Estabilidade a longo prazo) para os materiais CRCN1 e CRCN2.

4.2.5.1 Estabilidade a curto prazo

Para avaliar a estabilidade do material em curto prazo, foram utilizados frascos independentes de todos os testes realizados. O delineamento experimental adotado foi de parcelas subdivididas no tempo (0 a 60 dias) para estudar as possíveis degradações nas amostras com relação as condições de transporte, a contribuição da heterogeneidade entre frascos e a diferença entre os tratamentos (estufa, freezer e ambiente).

A análise univariada das concentrações obtidas para Fe no material CRCN1, empregando-se a ANOVA para parcelas repetidas no tempo, está na Tabela 11. Similarmente aos resultados obtidos para Mn, pôde-se observar que o teste estatístico foi significativo a 95% de confiança para o fator tempo, indicando que houve diferença nas concentrações de Fe medidas nos tempos estudados. Sendo assim, pode-se concluir que houve degradação das amostras, o que afetou a concentração de Fe.

Tabela 11 – Resultados da análise de variância para medidas repetidas no tempo de Fe no candidato a MR CRCN1.

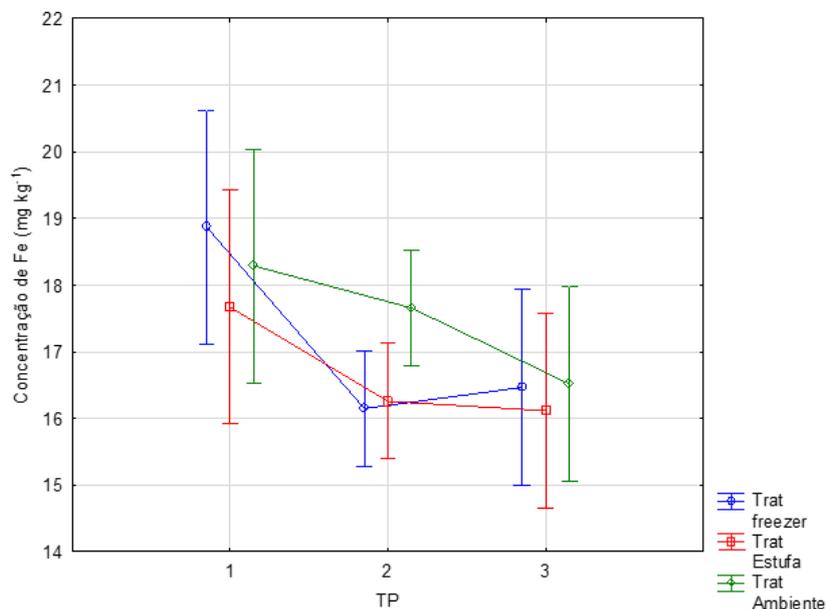
Efeito	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F-valor	p-valor
TP	37,7	2	18,9	19,3	0,000180
TP*Trat	7,46	4	1,86	1,91	0,174
FR	0,0039	1	0,00390	0,00582	0,941
FR*Trat	0,807	2	0,404	0,602	0,577
TP*FR	0,330	2	0,165	0,141	0,869
TP*FR*Trat	5,19	4	1,30	1,11	0,396

TP = Tempo; Trat = Tratamento (armazenamento); FR = Frasco.

Fonte: O Autor.

Para se aprofundar nos resultados, foram compilados os valores médios de ferro e os intervalos para comparações múltiplas em nível de 95% de confiança, relacionando-se o tipo de tratamento e o tempo (Figura 38). Pôde-se observar que, ao comparar as concentrações médias para o tratamento freezer, há indícios de que houve degradação entre os tempos 1 e 2. Os resultados obtidos permitem concluir que o candidato CRCN1 provavelmente não é estável, considerando-se os resultados do ensaio de estabilidade.

Figura 38 – Comparação entre tratamentos (freezer, estufa e ambiente) obtidas em diversos tempos (1 = 15 dias; 2 = 30 dias; 3 = 60 dias) para Fe no candidato CRCN1.



Fonte: O Autor.

A aproximação multivariada do experimento em parcelas subdivididas no tempo para as concentrações de Fe do candidato CRCN1 corroborou os resultados obtidos pela análise univariada, em que houve diferença estatística significativa em nível de 95% de confiança apenas para os tempos analisados (Tabela 12), o que pode indicar uma degradação para este elemento químico independente do armazenamento empregado, já que foram encontradas diferenças significativas no tratamento freezer.

Tabela 12 – Aproximação multivariada da ANOVA dos dados de Fe para experimentos de parcelas repetidas no tempo referentes ao candidato CRCN1.

Efeito	Teste	Valor	F-valor	Efeito gl	Erro gl	p-valor
TP	Wilks	0,149	14,3	2	5	0,00852
TP*Trat	Wilks	0,419	1,36	4	10	0,314
FR	Wilks	0,999	0,00582	1	6	0,942
FR*Trat	Wilks	0,832	0,602	2	6	0,578
TP*FR	Wilks	0,953	0,124	2	5	0,886
TP*FR*Trat	Wilks	0,603	0,719	4	10	0,598

TP = Tempo; Trat = Tratamento (armazenamento); FR = Frasco.

Fonte: O Autor.

Os resultados das concentrações de Mn foram testados por ANOVA e os resultados da análise univariada podem ser observados na Tabela 13, assim como a distribuição média das concentrações em relação ao tempo e ao tratamento (Figura 39).

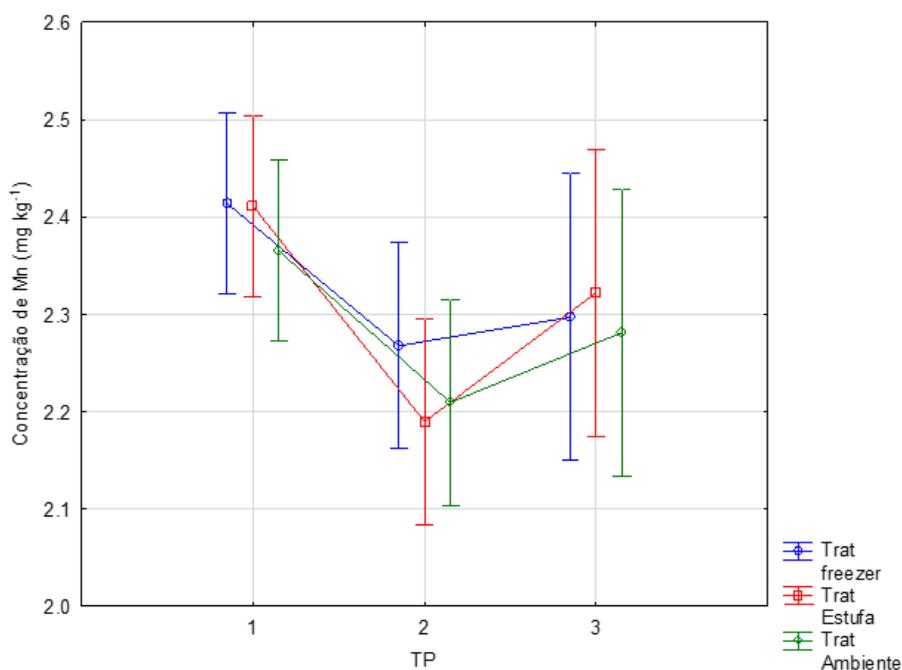
Tabela 13 – Resultados da análise de variância para medidas repetidas no tempo de Mn no candidato a MR CRCN1.

Efeito	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F-valor	p-valor
TP	0,275	2	0,137	21,98	0,00097
TP*Trat	0,0187	4	0,0047	0,75	0,578
FR	0,0030	1	0,0030	0,27	0,624
FR*Trat	0,0017	2	0,0008	0,07	0,930
TP*FR	0,0077	2	0,0038	1,08	0,371
TP*FR*Trat	0,0439	4	0,0110	3,09	0,0579

TP = Tempo; Trat = Tratamento (armazenamento); FR = Frasco.

Fonte: O Autor.

Figura 39 – Comparação entre médias dos tratamentos (freezer, estufa e ambiente) obtidas em diversos tempos (1 = 15 dias; 2 = 30 dias; 3 = 60 dias) para Mn no Candidato a MR CRCN1.



Fonte: O Autor.

De acordo com a Tabela 14, não houve indícios estatísticos que as médias entre os frascos e entre os tratamentos difiram entre si em nível 95% de confiança, contudo diferenças entre os tempos de análises foram consideradas significativas ($\alpha = 0,05$). Estas diferenças podem ser vistas com maior clareza na Figura 39, na qual foi observada diferença estatística apenas para os tempos 1 e 2 no tratamento estufa, conforme o esperado devido à alta temperatura da estufa (65 °C) a que foram submetidas as amostras.

Os resultados da aproximação multivariada da análise de variância desse experimento estão na Tabela 14, em que foi comprovado, em nível de 95% de confiança, as diferenças entre os tempos, provavelmente associado com a degradação causada pelo aquecimento em estufa.

Tabela 14 – Aproximação multivariada da análise de variância dos dados de Mn para experimentos de parcelas repetidas no tempo referentes ao candidato CRCN1.

Efeito	Teste	Valor	F	Efeito gl	Erro gl	p
TP	Wilks	0,0154	159,6	2	5	0,000030
TP*Trat	Wilks	0,295	2,10	4	10	0,155
FR	Wilks	0,957	0,267	1	6	0,624
FR*Trat	Wilks	0,976	0,0732	2	6	0,930
TP*FR	Wilks	0,695	1,09	2	5	0,403
TP*FR*Trat	Wilks	0,300	2,07	4	10	0,160

TP = Tempo; Trat = Tratamento (armazenamento); FR = Frasco.

Fonte: O Autor.

Para o candidato CRCN2, os resultados da análise univariada das concentrações de Cu podem ser observados na Tabela 15, nos quais não foram observadas diferenças significativas em nível de 95% de confiança, pois a hipótese de nula (H_0) de que os valores não diferem entre si foi aceita ($p > 0,05$), sendo assim não há indícios de degradação relacionados ao transporte do candidato a MR.

A Figura 40 apresenta as concentrações médias de Cu e seus respectivos intervalos de confiança em nível de 95% de confiança, que demonstram os resultados obtidos através do teste univariado considerando o tempo e os tratamentos aplicados.

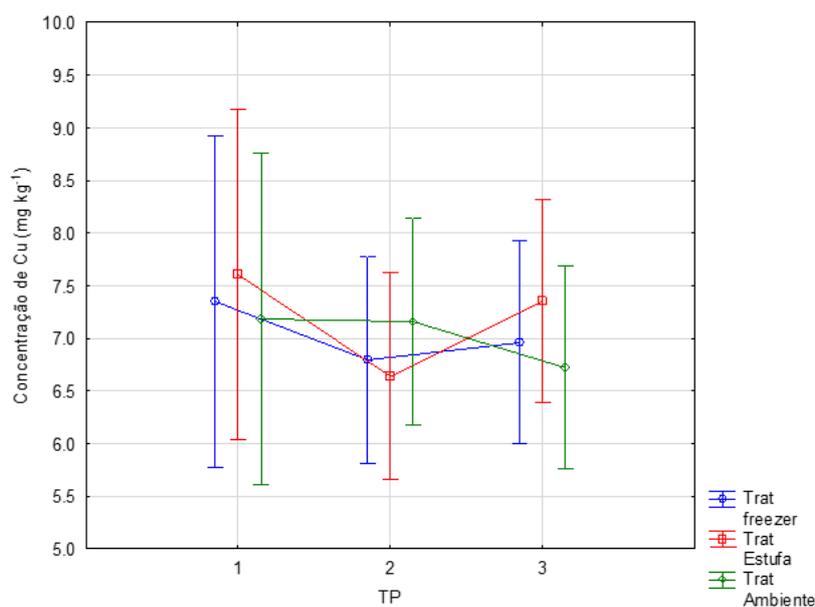
Tabela 15 – Resultados da análise de variância para medidas repetidas no tempo de Cu no candidato a MR CRCN2.

Efeito	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F-valor	p-valor
TP	2,54	2	1,27	1,38	0,289
TP*Trat	2,27	4	0,567	0,615	0,660
FR	0,619	1	0,619	0,367	0,567
FR*Trat	0,0643	2	0,0321	0,0191	0,981
TP*FR	0,216	2	0,108	0,198	0,823
TP*FR*Trat	2,03	4	0,508	0,933	0,477

TP = Tempo; Trat = Tratamento (armazenamento); FR = Frasco.

Fonte: O Autor.

Figura 40 – Comparação entre médias dos tratamentos (freezer, estufa e ambiente) obtidas em diversos tempos (1 = 15 dias; 2 = 30 dias; 3 = 60 dias) para Cu no Candidato a MR CRCN2.



Fonte: O Autor.

Na Tabela 16, os resultados da análise multivariada para o material CRCN2, utilizando-se do teste de Wilks, indicaram também que não houve diferenças significativas em nível de 95% de confiança para os valores de concentração de Cu para o material CRCN2, confirmando a estabilidade do material quanto a este elemento químico.

Tabela 16 – Aproximação multivariada da análise de variância dos dados de Cu para experimentos de parcelas repetidas no tempo referentes ao candidato CRCN2.

Efeito	Teste	Valor	F	Efeito gl	Erro gl	p
TP	Wilks	0,744	0,858	2	5	0,478
TP*Trat	Wilks	0,617	0,682	4	10	0,620
FR	Wilks	0,942	0,367	1	6	0,567
FR*Trat	Wilks	0,993	0,0191	2	6	0,981
TP*FR	Wilks	0,922	0,211	2	5	0,817
TP*FR*Trat	Wilks	0,449	1,23	4	10	0,358

TP = Tempo; Trat = Tratamento (armazenamento); FR = Frasco.

Fonte: O Autor.

Os resultados da análise de variância para as concentrações de Fe medidas em diferentes tempos, frascos e sujeitas a diferentes acondicionamentos podem ser observados na Tabela 17. A comparação múltipla entre as concentrações médias com relação ao tempo e ao tratamento está na Figura 41, enquanto que os resultados da análise multivariada estão na Tabela 18.

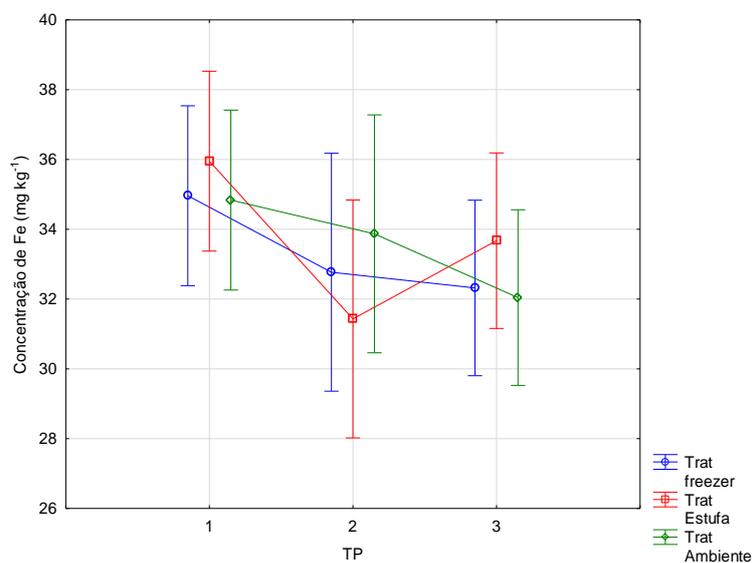
Tabela 17 – Resultados da análise de variância para medidas repetidas no tempo de Fe no candidato a MR CRCN2.

Efeito	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F-valor	p-valor
TP	79,0	2	39,5	13,3	0,000908
TP*Trat	30,4	4	7,61	2,56	0,0929
FR	0,633	1	0,633	0,436	0,534
FR*Trat	14,2	2	7,11	4,892	0,0549
TP*FR	11,8	2	5,89	1,39	0,286
TP*FR*Trat	13,7	4	3,43	0,811	0,542

TP = Tempo; Trat = Tratamento (armazenamento); FR = Frasco.

Fonte: O Autor.

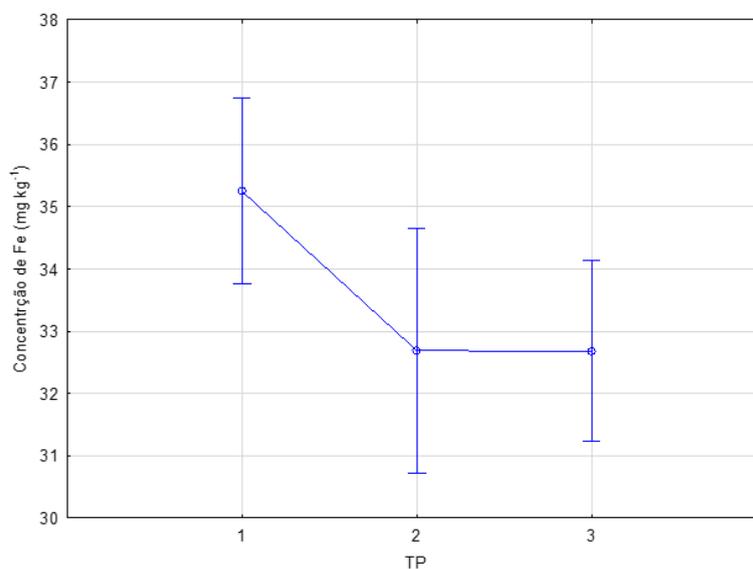
Figura 41 – Comparação entre médias dos tratamentos (freezer, estufa e ambiente) obtidas em diversos tempos (1 = 15 dias; 2 = 30 dias; 3 = 60 dias) para Fe no Candidato a MR CRCN2.



Fonte: O Autor.

Vale ressaltar que os resultados da análise de variância não foram muito claros para Fe no CRCN2 (Figura 40). Ao comparar-se apenas as médias dos tempos (Figura 42), percebe-se que há uma tendência da diminuição dos valores médios para os tempos 2 e 3.

Figura 42 – Comparação entre médias nos diversos tempos (1 = 15 dias; 2 = 30 dias; 3 = 60 dias) para Fe no Candidato a MR CRCN2.



Fonte: O Autor.

A análise multivariada dos parâmetros estudados (Tabela 18) mostra que, o candidato a material de referência apresenta uma alteração significativa nas concentrações de Fe ao decorrer do tempo, corroborando com o exposto anteriormente. Nesse caso, esse candidato a MR não apresentou uma estabilidade adequada com relação à distribuição de ferro independente do método de estocagem empregado.

Tabela 18 – Aproximação multivariada da análise de variância dos dados de Fe para experimentos de parcelas repetidas no tempo referentes ao candidato CRCN2.

Efeito	Teste	Valor	F	Efeito gl	Erro gl	p
TP	Wilks	0,130	16,7	2	5	0,00612
TP*Trat	Wilks	0,394	1,48	4	10	0,279
FR	Wilks	0,932	0,436	1	6	0,534
FR*Trat	Wilks	0,380	4,89	2	6	0,0549
TP*FR	Wilks	0,678	1,19	2	5	0,378
TP*FR*Trat	Wilks	0,688	0,513	4	10	0,728

TP = Tempo; Trat = Tratamento (armazenamento); FR = Frasco.

Fonte: O Autor.

Para Mn no candidato CRCN2, a análise univariada para medidas repetidas no tempo em nível de 95% de confiança podem ser observados na Tabela 19. Percebe-se que, para os efeitos de FR e as interações de tempo, frasco e tratamento, apresentaram resultados satisfatórios para o objetivo do estudo, pois não houve diferenças significativas ($\alpha = 0,05$). Porém, ao avaliar-se apenas o fator tempo, o teste foi significativo, indicando instabilidade do material em nível de 95% de confiança.

Tabela 19 – Resultados da análise de variância para medidas repetidas no tempo de Mn no candidato a MR CRCN2.

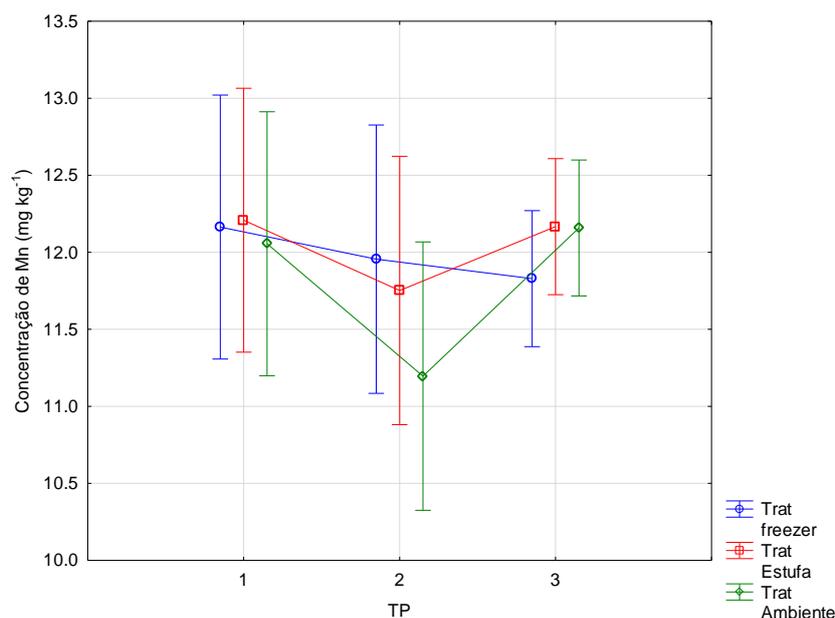
Efeito	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F-valor	p-valor
TP	79,0	2	39,5	13,3	0,000908
TP*Trat	30,4	4	7,61	2,56	0,0930
FR	0,633	1	0,633	0,436	0,534
FR*Trat	14,2	2	7,11	4,89	0,0549
TP*FR	11,8	2	5,89	1,39	0,286
TP*FR*Trat	13,7	4	3,43	0,811	0,542

TP = Tempo; Trat = Tratamento (armazenamento); FR = Frasco.

Fonte: O Autor.

Observando o gráfico da Figura 43, não estão claras as diferenças encontradas para os tempos (TP) em cada tratamento (TR). Todavia, a análise multivariada (Tabela 20) rejeitou a hipótese de que as médias dos tratamentos, tempos e frascos e suas interações sejam diferentes em nível de 95% de confiança.

Figura 43 – Comparação entre médias dos tratamentos (freezer, estufa e ambiente) obtidas em diversos tempos (1 = 15 dias; 2 = 30 dias; 3 = 60 dias) para Mn no Candidato a MR CRCN2.



Fonte: O Autor.

Tabela 20 – Aproximação multivariada da análise de variância dos dados de Mn para experimentos de parcelas repetidas no tempo referentes ao candidato CRCN2.

Efeito	Teste	Valor	F	Efeito gl	p-valor
TP	Wilks	0,361	4,42	2	0,0785
TP*Trat	Wilks	0,399	1,46	4	0,286
FR	Wilks	0,953	0,296	1	0,606
FR*Trat	Wilks	0,996	0,0130	2	0,987
TP*FR	Wilks	0,801	0,622	2	0,574
TP*FR*Trat	Wilks	0,438	1,28	4	0,342

TP = Tempo; Trat = Tratamento (armazenamento); FR = Frasco.

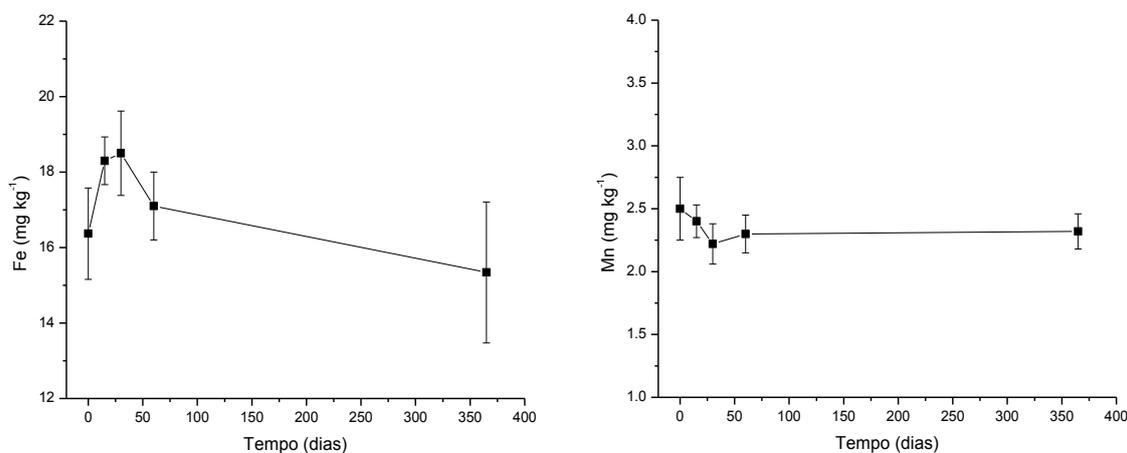
Fonte: O Autor.

De maneira geral, os resultados obtidos no estudo de estabilidade de curto prazo permitem afirmar que, para os elementos analisados, o material CRCN2 foi suficientemente estável para a produção de MR e transporte.

4.2.5.2 Estabilidade a longo prazo

A Figura 44 apresenta os resultados médios (dos frascos avaliados) das concentrações dos elementos químicos ferro e manganês e seus respectivos intervalos de confiança para cada um dos tempos utilizados no estudo da estabilidade a longo prazo no decorrer de 365 dias para os candidatos a MR CRCN 1. Os resultados estão expressos em massa seca, utilizando fator de correção da umidade residual.

Figura 44 – Comparação entre as concentrações médias obtidas e seus respectivos intervalos de confiança em nível de 95% de confiança em diversos tempos (dia 0; 15 dias; 30 dias; 60 dias e 360 dias) para Fe e Mn no Candidato a MR CRCN1.



Fonte: O Autor.

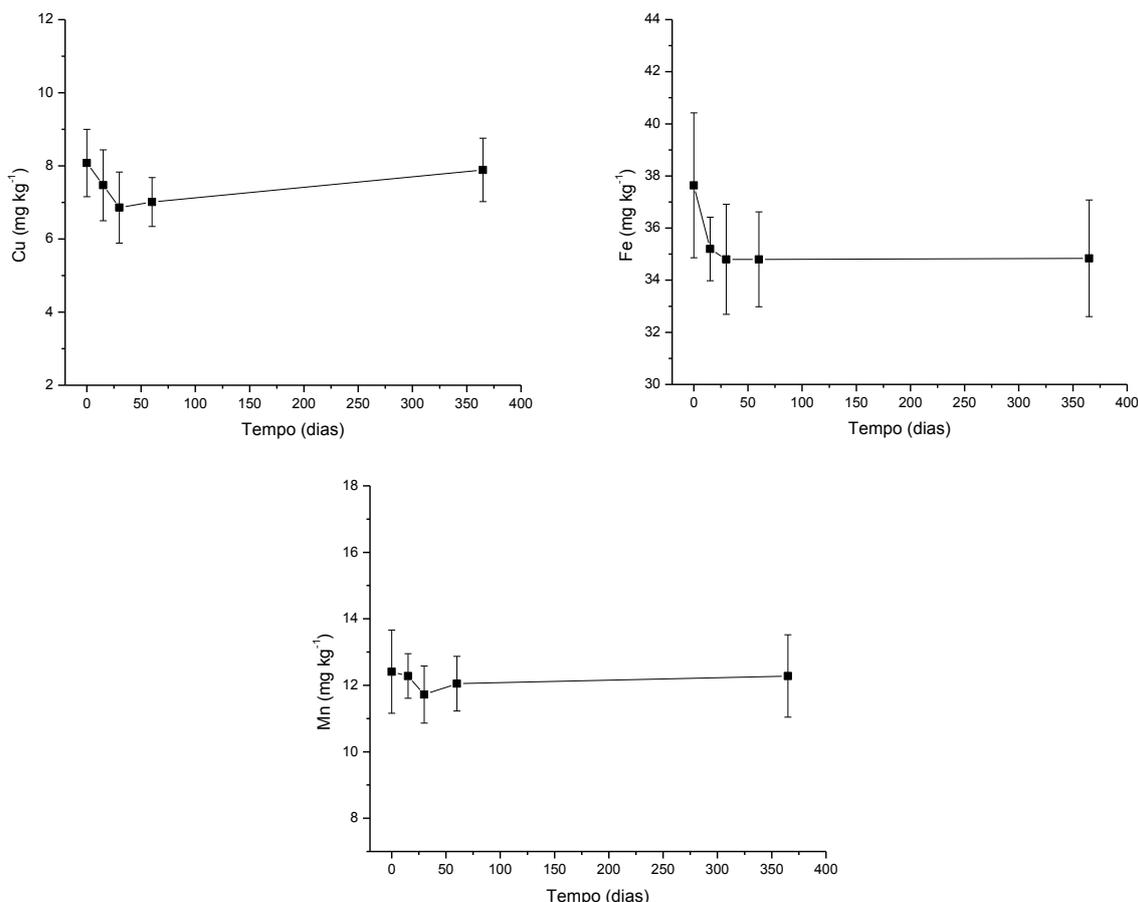
Foram observadas diferenças significativas em nível de 95% de confiança nas concentrações obtidas de Fe entre os tempos de 15 dias e 360 dias, o que pode indicar uma degradação ao longo do período analisado para o elemento químico Fe, o que já era de se esperar, já que o mesmo apresentou instabilidade a curto prazo para o tratamento no freezer que é considerada o controle. Outra hipótese para essa diferença é que devido ao fato de o candidato a Material de Referência CRCN1 ter apresentado

heterogeneidade entre os diferentes frascos analisados, isto pode causar diferenças nos resultados, indicando uma falsa degradação, que estaria ligada a heterogeneidade.

Para o Mn, não foram verificadas diferenças significativas em nível de 95% de confiança nas concentrações ao longo do teste, indicando que este elemento pode ser considerado estável ao longo do período estudado e armazenado em temperatura ambiente. Porém, ao observar os resultados do teste de estabilidade a curto prazo, verifica-se instabilidade do Mn no decorrer do tempo, que não foi verificado por este ensaio. Isto reforça a hipótese de os resultados de instabilidade a curto e longo prazo estarem realmente relacionados a heterogeneidade deste Candidato.

A Figura 45 apresenta os valores de concentração médios (cobre, ferro e manganês) para cada tempo do teste de estabilidade a longo prazo para o candidato a MR CRCN2, bem como os intervalos de confiança em nível 0,05 de significância.

Figura 45 – Comparação entre médias dos em diversos tempos (dia 0; 15 dias; 30 dias; 60 dias e 360 dias) para Cu, Fe e Mn no Candidato a MR CRCN2.



Fonte: O Autor.

A análise dos valores obtidos de Cu e Mn ao longo do experimento de um ano mostra que não houve diferenças significativas entre os tempos analisados. Por conseguinte, não há indícios de que exista degradação nestes elementos químicos. O ferro apresenta uma tendência de queda na concentração nas amostras avaliadas em 30 e 60 dias, porém no final de análise (365 dias) não foi corroborada a tendência. Como não houve diferenças significativas entre nenhum dos cinco tempos estudados em nível de 95% de confiança, pode-se considerar que o candidato a Material de Referência CRCN2 apresentou-se estável para os elementos químicos avaliados no estudo.

Como o CRCN2 foi o material que apresentou os resultados adequados de acordo com as normas da ABNT ISSO Guias 30, 31, 32, 33, 34 e 35 para todas as características físicas e químicas avaliadas, apenas para este candidato a MR foi realizado ensaio de certificação das concentrações de elementos químicos e determinação de incertezas analíticas.

4.2.6 Certificação das concentrações de elementos químicos

Com o objetivo de estabelecer concentrações certificadas de elementos químicos determinadas no candidato a MR CRCN2, a garantia de qualidade do procedimento analítico foi demonstrada a partir dos resultados do Material de Referência TM1. Os valores obtidos e certificados e suas respectivas incertezas expandidas em nível de 95% de confiança para os elementos químicos Ca, Cu, Fe, Mn, e Zn determinados por FAAS estão apresentados na Tabela 21. Os valores do Número E_n estiveram no intervalo entre -1 e 1, demonstrando a qualidade do procedimento analítico em nível de 95% de confiança (ISO 13528, 2005).

Na Tabela 22, estão mostrados os valores obtido e certificado para o elemento químico cálcio quantificado no TM 1 por FAES, assim como suas respectivas incertezas analíticas expandidas e os valores de E_n , que novamente estiveram dentro do intervalo adequado para um nível de confiança de 95%.

Tabela 21 – Valores obtidos e certificados e suas respectivas incertezas analíticas expandidas em nível de 95% de confiança para o material de referência TM1 por FAAS.

Analito	Valor obtido		Valor certificado		E _n
	(mg/kg)		(mg/kg)		
	Média	DP	Média	DP	
Ca	2820	± 313	2720	± 400	0,20
Cu	11,3	± 1,3	11,3	± 1,7	-0,01
Fe	584	± 37	593	± 53	-0,14
Mn	22,7	± 2,3	22,7	± 3,7	-0,01
Zn	118,6	± 9,8	118,5	± 9,5	0,02

Fonte: O Autor.

Tabela 22 – Valores obtidos e certificados e suas respectivas incertezas analíticas expandidas em nível de 95% de confiança para o material de referência TM1 por FAES.

Analito	Valor obtido		Valor certificado		E _n
	(mg/kg)		(mg/kg)		
	Média	DP	Média	DP	
Ca	2851	± 132	2720	± 400	0,20

Fonte: O Autor.

Para a análise por GFAAS na Tabela 23, são apresentados os valores obtidos e certificados e suas respectivas incertezas analíticas expandidas em nível de 95% de confiança para cada elemento químico quantificado no material de referência TM 1 por GFAAS, assim como os valores de Número E_n. Para esta técnica, foi possível comprovar a qualidade do procedimento analítico para os elementos químicos Cu, Fe, Mn e Zn, cujos valores de Número E_n estiveram dentro do intervalo de -1 a 1.

Tabela 23 – Valores obtidos e certificados e suas respectivas incertezas analíticas expandidas em nível de 95% de confiança para o material de referência TM1 por GFAAS

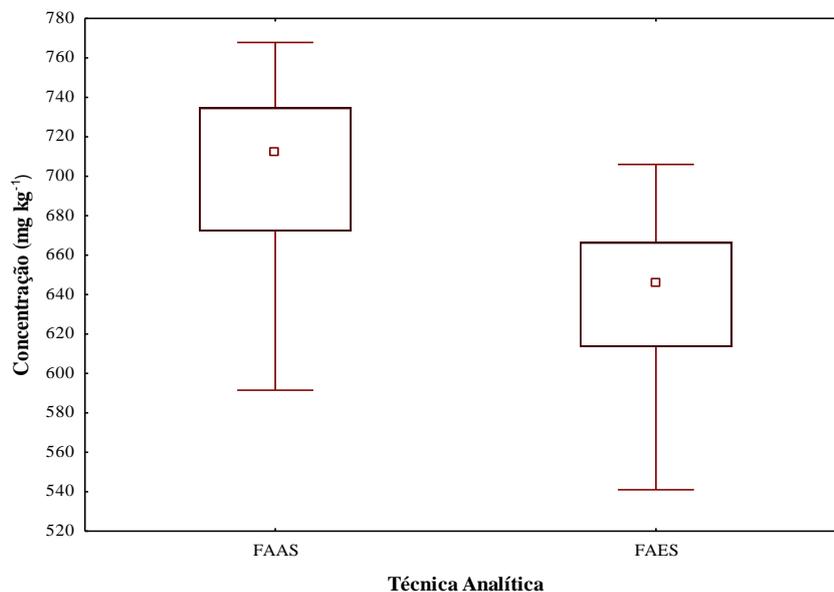
Analito	Valor obtido		Valor certificado		E _n
	(mg/kg)		(mg/kg)		
	Média	DP	Média	DP	
Cu	11,8	± 1,3	11,3	± 1,7	0,23
Fe	620	± 50	593	± 53	0,35
Mn	21,9	± 1,7	22,7	± 3,7	-0,21
Zn	118,5	± 11,0	118,5	± 9,5	0,01

Fonte: O Autor.

Nas Figuras 46 a 50, estão presentes os valores de concentrações médias (10 replicatas) e suas respectivas incertezas analíticas em nível de 95% de confiança obtidos no ensaio de certificação dos elementos químicos Ca, Cu, Fe, Mn e Zn, amostras independentes do candidato a MR CRCN2, bem como brancos analíticos e Material de Referência TM 1, utilizando as técnicas analíticas FAAS, FAES e GFAAS. Sendo assim, verificou-se facilmente a adequação ou não dos resultados destas concentrações determinadas por duas técnicas analíticas diferentes, além de averiguar se foram compatíveis dentro do nível metrológico esperado.

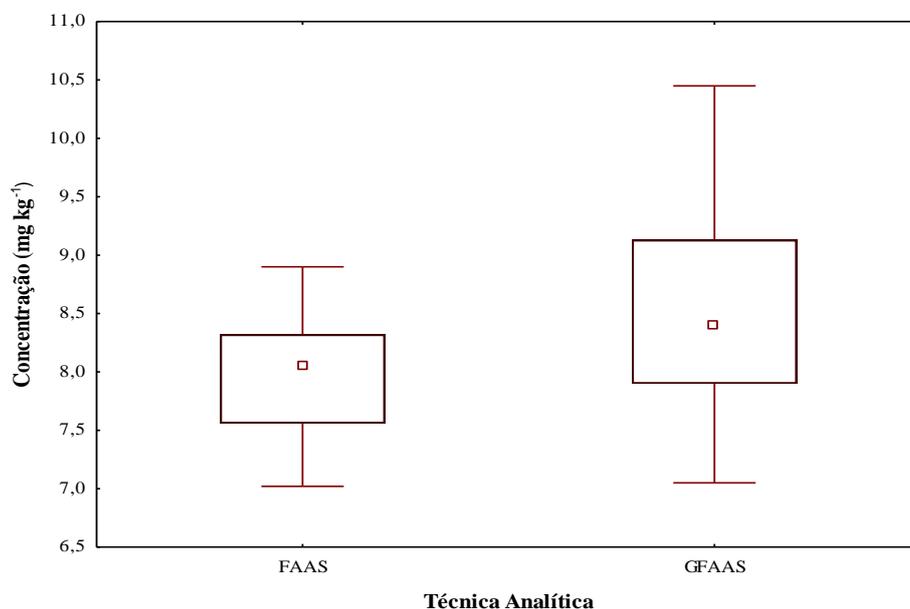
As concentrações de cálcio foram obtidas utilizando as técnicas de FAAS e FAES, ambas com atomização com chama, nota-se com clareza que os valores obtidos são compatíveis quando foram observadas as incertezas analíticas em nível de 95% de confiança para os dois resultados. Deste modo, pode-se realizar a certificação do valor de concentração e sua respectiva incerteza analítica associada para este elemento químico.

Figura 46 – Comparação entre médias e suas respectivas incertezas em nível de 95% de confiança para Ca utilizando amostras independentes para Candidato a MR CRCN2 por FAAS e FAES.



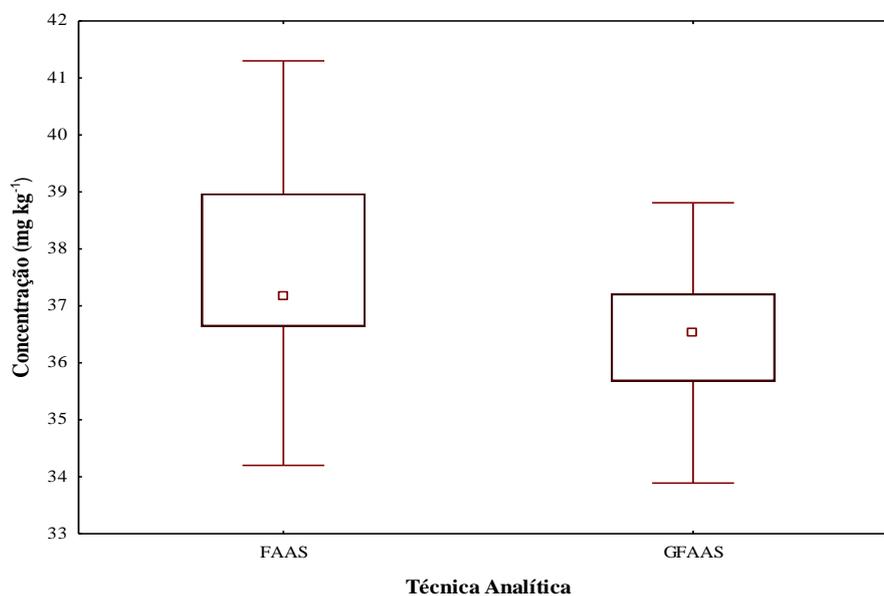
Fonte: O Autor.

Figura 47 – Comparação entre médias e suas respectivas incertezas em nível de 95% de confiança para Cu utilizando amostras independentes para Candidato a MR CRCN2 por FAAS e GFAAS.



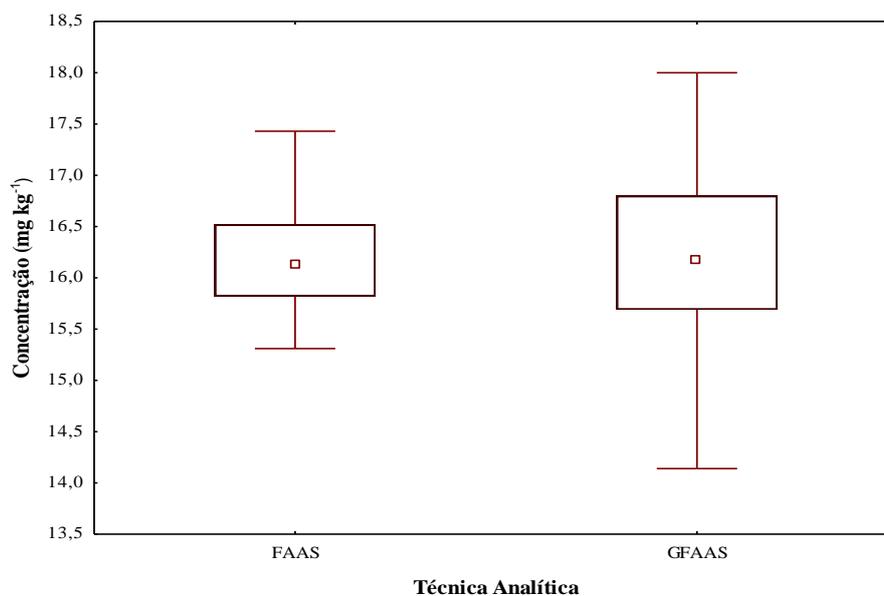
Fonte: O Autor.

Figura 48 – Comparação entre médias e suas respectivas incertezas em nível de 95% de confiança para Fe utilizando amostras independentes para Candidato a MR CRCN2 por FAAS e GFAAS.



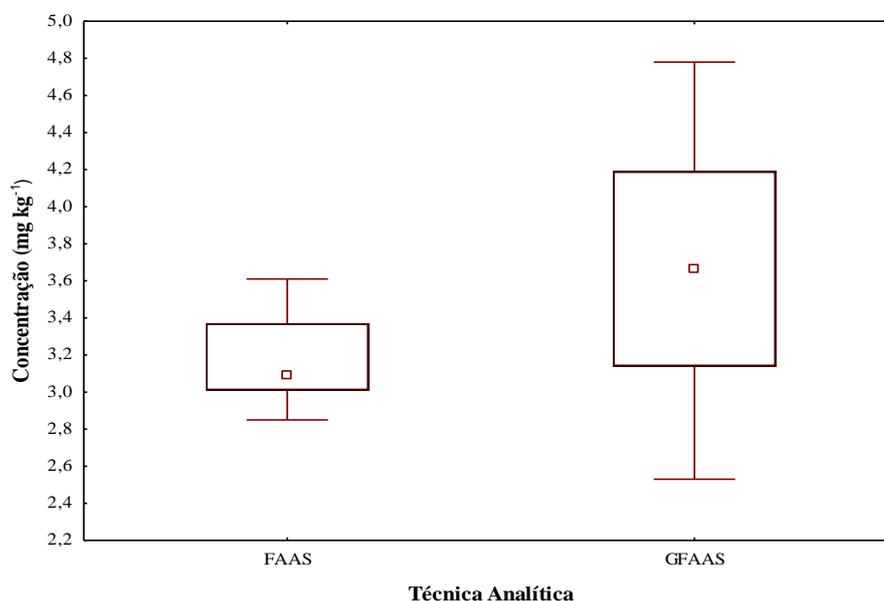
Fonte: O Autor.

Figura 49 – Comparação entre médias e suas respectivas incertezas em nível de 95% de confiança para Mn utilizando amostras independentes para Candidato a MR CRCN2 por FAAS e GFAAS.



Fonte: O Autor.

Figura 50 – Comparação entre médias e suas respectivas incertezas em nível de 95% de confiança para Zn utilizando amostras independentes para Candidato a MR CRCN2 por FAAS e GFAAS.



Fonte: O Autor.

Para os elementos químicos Cu, Fe, Mn e Zn foram utilizadas as técnicas analíticas de FAAS e GFAAS. De acordo com os resultados das Figuras 47, 48 49 e 50, é possível inferir que, para todos estes elementos químicos, obteve-se resultado desejado, quanto a obtenção de valores utilizando subamostras independentes do candidato a Material de Referência CRCN 2. Assim como ocorreu para Ca, nota-se que estes valores também podem ter sua média e incertezas atribuídas, proporcionando concentrações certificadas para este material.

Para estimar a incerteza analítica dos valores certificados (ABNT, 2012a), foram combinadas a incerteza relativa à estabilidade a longo prazo, a incerteza de caracterização dos elementos químicos e a incerteza associada a homogeneidade entre frascos por meio da Equação 2 apresentada na Seção 3.4.3.5, obtendo-se os valores apresentados na Tabela 24.

Tabela 24 – Estimativa das incertezas estimadas para cada elemento químico certificado.

Analito	U_{car}(%)	U_{longo}(%)	U_{entre}(%)	Incerteza certificação (%)
Ca	4,73	2,28	3,9	11,4
Cu	5,12	3,41	4,28	15,0
Fe	3,73	2,28	3,28	10,9
Mn	3,55	2,2	3,9	11,4
Zn	4,46	2,28	3,9	11,4

Fonte: O Autor.

As incertezas associadas à certificação dos elementos químicos Ca, Cu, Fe, Mn e Zn, são consideradas adequadas (ABNT, 2012a), e são compatíveis com as apresentadas nos certificados de MR de matrizes biológicas do IAEA, como o IAEA 336 *Lichen*, IAEA 392 *Algae*, IAEA 436 *Tuna fish*, IAEA V-8 *Rye flour* na quantificação destes elementos químicos. Deste modo pode-se afirmar que o candidato a Material de Referência CRCN2 pode ser considerado adequado para comprovação de qualidade analítica na quantificação destes elementos químicos em insetos.

5 CONCLUSÕES

Neste estudo foram desenvolvidas todas as etapas necessárias para a preparação, definição de propriedades físicas e químicas e certificação de um Material de Referência de insetos como preconizam as normas da *International Organization for Standardization* – ISO. A partir deste trabalho, conclui-se que:

1. Todas as propriedades e etapas para a preparação de um Material de Referência foram alcançadas, porém foram identificadas oportunidades de melhoria, principalmente na preparação do material de referência (moagem e homogeneização). Nesse caso, as propriedades químicas e físicas seriam mais fidedignas sem a utilização de aditivos.
2. Nos estudos de propriedades físicas de granulometria e umidade residual foram obtidos resultados satisfatórios para os candidatos a Material de Referência CRCN 1 e CRCN 2, tendo umidade em torno de, no máximo 3%, e de tamanho de partículas distribuídas em uma faixa estreita.
3. Dentre as massas avaliadas no estudo de massa mínima, as análises químicas com a massa de 1,25 g produziram resultados mais confiáveis e com erros de amostragem menores, porém não foram consideradas satisfatórias para o candidato CRCN1. Entretanto, pode ser considerada uma quantidade um pouco elevada, devido à necessidade de utilização de sulfato de sódio, em comparação a outros materiais de matrizes biológicas.
4. Conseguiu-se obter o candidato a material CRCN2 homogêneo quanto à distribuição das concentrações de Cu, Fe e Mn. Contudo, o material CRCN1 foi homogêneo apenas para Fe.
5. Apenas o candidato à Material de Referência CRCN2 apresentou estabilidade nos testes aplicados para a simulação das condições de transporte e armazenamento, tendo como parâmetros diferentes temperaturas e tempos de estocagem.
6. Foi possível a certificação das concentrações dos elementos químicos cálcio, cobre, ferro, manganês e zinco assim como a estimativa das suas respectivas incertezas analíticas expandidas associadas, apenas para o CRCN2.
7. O Candidato à Material de Referência CRCN2 (Farinha de grilo negro) mostrou-se mais adequado para a produção de material de referência com resultados

robustos em relação aos parâmetros exigidos pelas normas vigentes, que preconizam as propriedades para a produção e utilização de um Material de Referência Certificado.

REFERÊNCIAS

- ABNT, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Termos e definições relacionados com materiais de referência**. 1 ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2016 (ABNT ISO Guia 30).
- ABNT, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência**. Rio de Janeiro: ABNT, 2012 (ABNT ISO Guia 34).
- ABNT, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Materiais de referência – Princípios gerais e estatísticos para certificação**. Rio de Janeiro: ABNT, 2012a (ABNT ISO Guia 35).
- ABNT, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS ABNT ISO/IEC 17025. **Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de Ensaios de Calibração**. Rio de Janeiro: ABNT, 2001 (ABNT ISO/IEC 17025).
- ALVES, N. P.; MORAES, D. N. **Metrologia química e a utilização de materiais de referência em medições químicas**, 2002. Disponível em: <<http://www.quimlab.com.br>>. Acesso em: 20 de julho de 2015.
- AQUINO, A. M. **Manual para macrofauna do solo**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 21 p. 2001.
- ARDESTANI, M. M.; NICO, M.; VAN STRAALE.; CORNELIS, A.M. VAN GESTEL. Uptake and elimination kinetics of metals in soil invertebrates: A Review. **Environmental Pollution**. Department of Ecological Science, Faculty of Earth and Life Sciences, 2014.
- AWRAHMAN, Z. A.; RAINBOW, P. S.; SMITH, B. D.; FARHAN, R. K.; FIALKOWSKI, W. Caddisflies *Hydropsyche* spp. as biomonitors of trace metal bioavailability thresholds causing disturbance in freshwater stream benthic communities. **Environmental Pollution**, in press, p. 1-13, 2016.
- BARNES, R. M.; SANTOS JÚNIOR, D.; KRUG, F. J. Introduction to sample preparation for trace element determination. In: FLORES, E. M. M. (ed.) **Microwave-assisted sample preparation for trace element determination**. 1a ed. Elsevier, p. 1 - 58, 2014.
- BAM, Bundesanstalt für Materialforschung und –prüfung. **Certified Reference Materials catalogue**. Berlin: BAM, 2019.
- BAYLE, S.; AZÉMA, N.; BERHO, C.; POUET, M. F.; LOPEZ-CUESTA, J. M.; THOMAS, O. Study of heterogeneous suspensions: A new quantitative approach coupling laser granulometry and UV-vis spectrophotometry. **Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 262, p.242–250, 2005.
- BINGHAM, N. H.; FRY, J. M. **Regression: Linear Models in Statistics (Springer Undergraduate Mathematics Series)**. 1ª ed, New York: Springer, 2010, 300p.

BODE, P.; FERNANDES, E.A.N.; GREENBERG, R.R. **Metrology for chemical measurements and the position of INAA**. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v. 245 p.109–114, 2000.

BROWN, J. K. S. Diversity, disturbance, and sustainable use of Neotropical forests: Insects as indicators for conservation monitoring. **Journal of Insect Conservation**, v. 1, p. 25 –42, 1997.

BUTCHER, D. J.; SNEDDON, J.A **A practical guide to graphite furnace atomic absorption spectrometry**. New York: John Wiley & Sons, 1998. 255 p.

CAMPBELL-PLATT, G. (Ed.) *Ciência e tecnologia dos alimentos*. São Paulo: Manole, 2015, 548 p.

CARDOSO, M. H. W. M.; NÓBREGA, A. W.; VITAL, H. C.; ABRANTES, S. **Preparação de um material de referência certificado para controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros: estudo da homogeneidade**. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 2, p. 429-438, 2010.

CASTRO, L. **Preparo e caracterização de um Material de Referência de rim bovino**. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2017, 2721p. Tese de Doutorado.

COLEY, P. D.; BARONE, J. A. Herbivory and plant defenses in tropical forests. **Ecology and Systematics**, v. 37, p. 305 – 335, 1996.

COMAR. **International Database for Certified Reference Materials**. Disponível em: <<http://www.comar.bam.de/en/>>. Acesso em: 18 de julho 2019.

CORREIA, M. E. F.; OLIVEIRA, L. C. M. **Fauna de Solo: aspectos gerais e metodológicos**. Seropédica: EmbrapaAgrobiologia. 2000. 46 p.

DATE, A. R.; GRAY, A. L. **Applications of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry**, London: Blackie & Son Ltd., 1989. 254 p.

DE SMET, S.; VOSSEN, E. Meat: The balance between nutrition and health. A review. **Meat Science**, v. 120, p. 145–156, 2016.

ELLISON, S. L. R.; WILLIAMS, A. (Eds). **Eurachem/CITAC guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement**, 3^{ed}, 2012. Disponível em: <www.eurachem.org>. Acesso em 17 de abril de 2016.

EMOMS, H.; FAJGELJ, A.; VEEN, A. M. H. New definitions on reference materials. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 10, p. 576 – 578, 2006.

EURACHEM. **Determinando a Incerteza na Medição Analítica**. 2^a ed. Disponível em: <<http://allchemy.iq.usp.br/pub/metabolizando/Beta021115.pdf>>. Acesso em: 17 junho 2016.

EWING, G. W. **Métodos Instrumentais de Análise Química**. 5. reimp., São Paulo: Edgard Blucher, 1989.

FAO Regional Office for Asia and the Pacific. **Six-legged livestock: edible insect farming, collection and marketing in Thailand**. Bangkok, Thailand: Food and Agriculture Organization of the United Nations, Regional Office for Asia and the Pacific. 2013.

FAURE, U.; WAGSTAFFE, P. J. **Stability of reference materials**. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, v. 345, p. 124-126. 1993.

FELIX, M.; ALMEIDA, C. E.; SERRA-FREIRE, N. M.; COSTA, J. **Insetos uma aventura pela biodiversidade**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2010, 376 p.

FELLOWS, P.J. Food processing technology. Principles and practice, 4th ed., Amsterdam: Elsevier, 2017, 1152p.

FERREIRA, R. G.; MONTEIRO, M. A.; PEREIRA, M. U.; DA COSTA, R. P.; SPISSO, B. F.; CALADO, V. A feasibility study for producing an egg matrix candidate reference material for the polyether ionophore salinomycin. **Talanta**, v. 155, p. 222–228, 2016.

GARCIA, A. E.; SANTOS, M. E. Fluorescência de raios X por excitação radioisotópica: uma promissora técnica de análise. **Publicação IAEA**. Vienna: International Atomic Energy Agency, n. 330,1974, 37 p.

GINÉ-ROSIAS, M. F. **Espectrometria de massas com fonte de plasma (ICP-MS)**. Piracicaba: CENA, USP, 1999. 118p.

GONGALSKY, K. B. Bioaccumulation of metals by soil-dwelling insects in a uranium production area. **European Journal of Soil Biology**, p.180-185, 2006.

HOLL, K.; KAPPELLE, M. Tropical forest recovery and restoration. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 14, p. 378 - 379, 1999.

HOUK, R. S.; FASSEL, V. A.; FLESCHE, G. D.; SVEC, H. J.; GRAY, A.L.; TAYLOR, C. E. Inductively Coupled Argon Plasma as an ion source for mass spectrometric determination of trace elements, **Analytical Chemistry**, v.52, p. 2283 – 2289, 1980.

INGAMELLS, C. O. New approaches to geochemical analysis and sampling. **Talanta**. London, v.21, p. 141-155, 1974.

INGAMELLS, C. O.; SWITZER, P. A proposed sampling constant for use in geochemical analysis. **Talanta**. London, v.20, p. 547-568, 1973.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY – IAEA. **Development and use of reference materials and quality control materials**. Vienna, International Atomic Energy Agency, 2003, 113p.

ISO 13528- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION – **ISO Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons**. Genebra: ISO, 2005, 66p (ISO 13528).

ISO, INTERNATIONAL ORGANIZATION OF STANDADIZATION. **Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Practical guidance for the use of ISO 5725-2:1994 in designing, implementing and statistically analyzing interlaboratory repeatability reproducibility results**. Geneva, 2005a, 33p (ISO/TR 22971)

JACKSON, K.W. **Electrothermal atomization for analytical atomic spectrometry**, Chichester: John Wiley & Sons Ltda., 1999, 484p.

JANSSENS, K.; VINCZE L.; ADAMS, F.; JONES, K. W. Synchrotron radiation induced X-ray micro analysis. **Analytica Chimica Acta**, v.283, 1993, 98p.

JANZEN, D. H. When is it coevolution? **Evolution**, v. 34, p. 611 – 612, 1980.

JCGM. **International vocabulary of metrology: Basic and general concepts and associated terms (VIM)**. 3. ed. Paris, 2012. (JCGM 200: 2012). Disponível em: <http://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM_200_2012.pdf>. Acesso em: 30 de junho 2018.

KRAMER. K. J. M.; KRAMER, G. N.; MUNTAU, H. **Practical manual for the production of laboratory reference materials**. 2^a ed. Bergen: Mermayde, 2003.

KRUG, F. J., NOBREGA, J. A., OLIVEIRA, P. V. Espectrômetro de absorção atômica Parte 1. **Fundamentos e atomização com chama**. Apostila, Universidade de São Paulo, 2004. 40p.

KUPIEC, K.; KONIECZKA P.; NAMIEŚNIK J. Critical Reviews in Analytical Chemistry. **Crit Rev Anal Chem** , v. 39, p. 311 - 322, 2009.

LAJUNEN, L. H. J. **Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission**, Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1992, 241 p.

LISINGER, T. P. J.; PAUWELS, J.; VAN DER VEEN, A. M. H.; SCHIMEL, H.; LAMBERTY, A. Homogeneity and stability of reference materials. **Accreditation and Quality Assurance**, v.6, p. 20-25, 2001.

MAGALHÃES, M. R. L. **Concentrações naturais de elementos químicos da classe Insecta do fragmento florestal de Mata Atlântica Reserva Charles Darwin**. Recife: Departamento de Energia Nuclear, Universidade Federal de Pernambuco, 2015, 98p. Dissertação de Mestrado.

MAKKAR, H.P.S.; TRAN, G.; HEUZÉ, V.; ANKERS, P. State-of-the-art on use of insects as animal feed. **Animal Feed Science and Technology**, v. 197, p. 1–33, 2014.

MAKISHIMA, A.; YAMAKAWA; YAMASHITA, K.; NAKAMURA Z. E. Precise determination of Cr, Mn, Fe, Co and Ni concentration by an isotope dilution–internal

standardization method employing high resolution MC–ICP–MS. **Chemical Geology**, v. 274, p. 82 – 86, 2010.

MASUKO, K. Analysis of brood development in the ant *Amblyopone silvestrii*, with special reference to colony bionomics. **Entomological Science**, v.6, p.237–245, 2003.

MEGIDO, R. C.; GIERTS, C.; BLECKER, C.; BROSTAU, Y. HAUBRUGE, E.; ALABI, T.; FRANCIS, F. Consumer acceptance of insect-based alternative meat products in Western countries. **Food Quality and Preference**. v.52, p.237–243, 2016.

MÉLO, J. T. B. **Moluscos terrestres *Littoraria angulifera* e *Melampus coffea* como biomonitorios da qualidade ambiental de manguezais pernambucanos**, Recife: Departamento de Energia Nuclear, Universidade Federal de Pernambuco, 2014, 76p. Dissertação de Mestrado.

MONTASER, A. **Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry**, Weinheim: Wiley-VCH, 1998. 966 p.

MOREIRA, E. G. **Preparo e caracterização de um Material de Referência de Mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758)**, São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN, 2010, 283p. Tese de Doutorado.

NAKAGAKI, B. J.; DEFOLIART, G. R. Comparison of Diets for Mass-Rearing *Acheta domesticus* (Orthoptera: Gryllidae) as of Food Conversion Efficiency with Values Reported for Livestock. **J. Econ. Entomol.**, v. 84, p.891–896, 1991.

NUORTEVA, P. Synanthropy of blowflies (Diptera: *Calliphoridae*) in Finland. *Entomologica Fennica*, p. 1-49, 1963.

PAIS, M. P. **Artrópodes e suas relações de herbivoria como bioindicadores nos primeiros estágios de uma recomposição de floresta estacional decidual em Ribeirão Preto, SP**. Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2003, 125p. Tese de Doutorado.

PANITZ, M. A. **Dicionário técnico: português-inglês**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 227.

PERKINELMER SCIEX. **Do Things the way you want. NexION 300 ICP-MS**. Disponível em: <<http://www.drogallega.es/u/ficheros/representaciones/0x6E4F2EDE514911DF92BE9F8C96DD28F4.11.pdf>>. Acesso em 17 de julho 2017.

QUINÁGLIA, G. A. **Caracterização dos níveis basais de concentração de metais**. São Paulo: Biblioteca 24horas, 2012. 262 p.

RADBOUD UNIVERSITY. ICP-MS. Disponível em: <<http://www.ru.nl/science/gi/facilities/elemental-analysis/icp-ms/>>. Acesso em 12 de dezembro de 2017.

REDUS, R.; PANTAZIS, T.; PANTAZIS, J.; HUBER, A.; CROSS, B. Benefits of improved resolution for EDXRF. In: **International Centre for Diffraction Data**, JCPDS, Pennsylvania, 2009.

RSC. Atomic absorption spectrometry. The Royal Society of Chemistry. Disponível em: <<http://faculty.rmu.edu/~short/chem3550-references/RSC-AA-Leaflet.pdf>>. Acesso em: 07 de maio de 2017.

RUMPOLD, B. A.; SCHLÜTER, O. K. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 57(5), p.802–823, 2013.

SANTOS, A. M. P.; SANTOS, L. O.; BRANDÃO, G. C.; LEÃO, D. J.; BERNEDO, A. V. B.; LOPES, R. T.; LEMOS, V. A. Homogeneity study of a corn flour laboratory reference material candidate for inorganic analysis. **Food Chemistry**, v. 178, p. 287-291. 2015.

SANTOS, M. L. O. **Elementos químicos em invertebrados terrestres como indicadores de qualidade ambiental de áreas urbanas**, Recife: Departamento de Energia Nuclear, Universidade Federal de Pernambuco, 2016, 99p. Dissertação de Mestrado.

SILVA NETO, J. C. **Metrologia e controle dimensional: conceitos, normas e aplicações**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 264 p.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5^a ed, Bookman, Porto Alegre, Brasil, 2002.

SKOOG, D. A, WEST, D. M., HOLLER, F. J., CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**, Editora Thomson, São Paulo, 2006. 1055p.

SOUSA, E. E.; PAIVA, J. D. S.; FRANÇA, E. J.; ALMEIDA, M. E. S.; CANTINHA, R. S.; HAZIN, C. A. Qualidade nas análises químicas de matrizes biológicas pela fluorescência de raios-X por dispersão de energia. In: **International Nuclear Atlantic Conference - INAC 2013**. Recife, 2013.1 DVD-Rom.

STATSOFT. **Statistica 10**. Tulsa: StatSoft, 2011.

STEINFELD, H.; GERBER, P.; WASSENAAR, T.; CASTEL, V.; ROSALES, M.; DE HAAN, C. **Livestock's long shadow: Environmental issues and options**, FAO: Rome, Italy. P. 38-51, 2006.

TALARICO, F.; BRANDMAYR, P.; GIULIANINI, P.G.; IETTO, F.; NACCARATO, A.; PERROTTA, E.; TAGARELLI, A.; GIGLIO, A. Effects of metal pollution on survival and physiological responses in *Carabus (Chaetocarabus) lefebvrei* (Coleoptera, Carabidae). **European Journal of Soil Biology**, p. 80-89, 2014.

UNIVERSITY FOUNDATION. Insect protein: feed for the future. Bruxelas. **Proceedings...** Bruxelas: PROteINSECT, 2016. 15p.

VAN HUIS, A.; VAN ITTERBEECK, J.; KLUNDER, H.; MERTENS, E.; HALLORAN, A.; MUIR, G.; VANTOMME, P. **Edible insects: future prospects for food and feed security**. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2013, 201p.

VESPER, H. W.; MILLER, W. G.; MYERS, G. L. Reference materials and commutability. **The Clinical Biochemist Reviews**, v. 28, p. 139-147, 2007.

VIVALDI, L. J. **Análise de experimentos com dados repetidos ao longo do tempo ou espaço**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 1999, 52p.

VOGEL, A. I. **Química Analítica Qualitativa**, São Paulo: Mestre Jou, 1981, 665p.

VOX. 6 reasons you should consider eating insects. Disponível em: <<http://www.vox.com/2014/4/30/5664782/insects>>. Acesso em: 04 de julho de 2018.

WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry**, 3^a ed., Weinheim: VCH, 1999, 964 p.

WILSON, E. O. **The diversity of life**. New York: Belknap Press, 1992, 440p.

WONG, K. C. Using an Ishikawa diagram as a tool to assist memory and retrieval of relevant medical cases from the medical literature. **Journal of Medical Case Report**, v. 5, 2011.

WU, D.; LEGG, D. Responses of benthic insect communities to effluent from the abandoned Ferris-Haggarty copper mine in southeast Wyoming, USA. **Journal of Environmental Sciences**, v. 23, p. 1894-1903 2011.

ZEILLER, E.; SHAKHASHIRO, A. **Report on the Characterization of the Naturally Grown Algae Reference Material IAEA 392**. Seibersdorf: IAEA, 2005, 32p.