



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**GRILO PRETO (*Gryllus assimilis*) COMO CANDIDATO A  
MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO: UM ESTUDO  
DE HOMOGENEIDADE E MASSA MÍNIMA**

Raphael Henrique de Moura Pereira

Recife

Dezembro/2019

Raphael Henrique de Moura Pereira

**GRILO PRETO (*Gryllus assimilis*) COMO CANDIDATO A MATERIAL  
DE REFERÊNCIA CERTIFICADO: UM ESTUDO DE  
HOMOGENEIDADE E MASSA MÍNIMA**

Dissertação de mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Química como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Mestre em  
Química pela Universidade Federal  
Rural de Pernambuco.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. André Fernando Lavorante

Co-Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Elvis Joacir de França

Co-Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria José de Filgueiras Gomes

Bolsista CAPES

Recife

Dezembro/2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- P436g      Pereira, Raphael Henrique de Moura  
              Grilo preto (*Gryllus assimilis*) como candidato a material de referência certificado: um estudo de  
              homogeneidade e massa mínima / Raphael Henrique de Moura Pereira. - 2019.  
              108 f. : il.
- Orientador: Andre Fernando Lavorante.  
              Coorientadora: Maria Jose de Filgueiras Gomes.  
              Inclui referências e apêndice(s).
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em  
              Química, Recife, 2020.
1. Inseto. 2. Orthoptera. 3. Metrologia em química. 4. Nutrientes. I. Lavorante, Andre Fernando, orient. II.  
              Gomes, Maria Jose de Filgueiras, coorient. III. Título

Raphael Henrique de Moura Pereira

**GRILO PRETO (*Gryllus assimilis*) COMO CANDIDATO A MATERIAL  
DE REFERÊNCIA CERTIFICADO: UM ESTUDO DE HOMOGENEIDA  
DE MASSA MÍNIMA**

DISSERTAÇÃO AVALIADA E APROVADA PELA BANCA EM:

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. André Fernando Lavorante (Departamento de Química - UFRPE)

**Orientador(a)**

---

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Alex Souza Moraes (Departamento de Química – UFRPE)

**1º Examinador**

---

Dr<sup>o</sup>. Marcelo da Rocha Leão de Magalhães (CRCN/NE - CNEN)

**2º Examinador**

Aos Professores,  
Amigos que contribuíram a esse trabalho

Dedico

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha Mãe e à minha avó Francisquinha, figuras que me ajudaram a chegar onde cheguei.

Agradeço ao Professor André Lavorante pela ajuda e disponibilidade.

Agradeço a Professora Maria José pela oportunidade e por ter achado um lugar para mim nesse mestrado.

Agradeço ao Professor Elvis de França pela confiança, ensinamentos e paciência (muita paciência) nesse longo e curto período de trabalho.

Agradeço à minha amiga Ingrid Freire pelo companheirismo ao longo dessa pós-graduação.

Agradeço à minha amiga Jéssica Daniella por toda a força e dedicação em me ajudar com o projeto. Tem muito dela nesse trabalho.

Agradeço a Thais Mendes pelas dicas, auxílio e horas de desabafo.

Agradeço a turma do SEAMB: July, Marcelo Magalhães, Ednaldo e Matheus pela ajuda nas análises realizadas. Vocês são show!

À FACEPE pelo suporte financeiro para o desenvolvimento de pesquisa científica.

E por fim agradeço a CAPES e a Secretaria do Curso de Pós-Graduação em Química.

## RESUMO

A exatidão e a precisão são os parâmetros mais relevantes nas análises químicas, pois garante a confiabilidade e rastreabilidade dos resultados analíticos. Normalmente, esses parâmetros são alcançados pela utilização de Materiais de Referência Certificados - MRC. Porém, nem todas as matrizes estão contempladas pelos MRC disponíveis no mercado. Como os insetos comestíveis são considerados o alimento do futuro por serem substitutos das carnes, a produção de MRC utilizando esse tipo matriz torna-se fundamental. O presente trabalho avaliou o emprego do inseto grilo-preto (*Gryllus assimilis*) como candidato a MR a partir da sua preparação, envase e ensaios de determinação de massa mínima e de homogeneidade, bem como a caracterização química de nutrientes dessa matriz. O processo de preparação da amostra consistiu em moagem, peneiramento e secagem em liofilizador, seguido de quarteamento e envase do material com posterior irradiação. O lote obtido foi composto por 40 frascos contendo 4 g de material seco e de tamanho máximo de partículas de 80 µm. A determinação de umidade residual foi realizada pela comparação de dois métodos de secagem (estufa e liofilizador), enquanto a determinação da massa mínima foi realizada comparando-se os valores obtidos para porções analíticas de 20 mg, 150 mg e 500 mg pelo uso das técnicas por EDXRF (Cl, P e S) e FAAS (Cu, Fe, Mn e Zn). Como a principal propriedade de um candidato a MR, a homogeneidade foi avaliada pela técnica FAAS para a distribuição de Cu, Fe, Mn e Zn no material. A caracterização química do candidato foi realizada a partir da técnica de EDXRF e ICP-OES. O candidato apresentou teor de água residual de 7%, sendo o método de secagem em estufa mais indicado para essa determinação. Os resultados do ensaio de massa mínima indicaram que, dentre as porções analíticas estudadas, 500 mg foi a massa mínima recomendada para uso do candidato a MR, contudo, para alguns elementos químicos, massas menores poderiam ser utilizadas (entre 150 e 500 mg). O método de preparação e envase do candidato a MR foi considerado adequado uma vez que foi demonstrada a homogeneidade da distribuição de Cu, Fe, Mn e Zn em nível de 95% de confiança. Com a caracterização química, o material, além de ser fonte de proteínas, teve altas concentrações dos nutrientes Ca, Cl, K, Mg, Na, P e S, mostrando grande relevância nutricional.

**Palavras-chave:** Inseto, Orthoptera, Metrologia em Química, Nutrientes.

## ABSTRACT

The analytical quality is a parameter of relevance in chemical analyses for guaranteeing the reliability and traceability of analytical results. Normally, it is achieved using Certified Reference Materials – CRM. However, not all matrices are available as CRMs in the market. As the edible insects are considered the future food in terms of meat substitution, the CRM production using this matrix type becomes fundamental. The present work has studied the utilization of black cricket insect (*Gryllus assimilis*) as a RM candidate by means of preparation, bottling and minimum mass determination and homogeneity assays, as well as the nutrient determination of this matrix. The sample preparation process consisted of milling, sieving and freeze-drying, followed by quartering and bottling of the material with posterior irradiation. The obtained batch was composed by 40 bottles containing 4 g of dried material and with maximum particle size of 80  $\mu\text{m}$ . The residual humidity determination was carried out by the comparison of two drying methods (oven and freeze-dryer), while the mass minimum determination was performed by comparing the obtained values for analytical portions of 20 mg, 150 mg and 500 mg, applying the EDXRF (Cl, P and S) and FAAS (Cu, Fe, Mn and Zn) techniques. As the main property of the RM candidate, the homogeneity was assessed by the FAAS technique for evaluating the distribution of Cu, Fe, Mn and Zn in the material. The chemical characterization of the candidate was carried out through the EDXRF and ICP-OES techniques. The candidate showed residual water content of 7%, in which the best method for this determination was oven-drying. The results of minimum mass assay indicated that, among the analytical portions studied, 500 mg was the recommended minimum mass for the use of RM candidate, however, for some chemical elements, lower masses could be employed (between 150 e 500 mg). The preparation and bottling of the RM candidate was considered adequate since the homogeneity has been demonstrated for Cu, Fe, Mn and Zn at the 95% confidence level. With the chemical characterization, the material, besides of being protein source, had high concentrations of the Ca, Cl, K, Mg, Na, P and S nutrients, showing nutritional relevance.

**Keywords:** Insect, Orthoptera, Metrology in Chemistry, Nutrients.



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
2.1. Materiais de Referência Certificados (MRC) .....	17
2.1.1. Seleção do material .....	19
2.1.2. Esterilização .....	24
2.1.3. Umidade Residual (UR) .....	25
2.1.4. Massa mínima .....	25
2.1.5. Homogeneidade .....	26
2.2. Matriz inseto como candidato a material de referência certificado.....	28
2.3. Técnica Analíticas Aplicadas aos Ensaios de Propriedades de um Candidato a Material de Referência.....	33
2.3.1. Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia (EDXRF) .....	33
2.3.2. Espectrometria de Absorção Atômica (AAS) .....	36
2.3.3. Espectrometria de Emissão Atômica com Fonte de Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES) .....	38
2.4. Incerteza analítica .....	42
2.5. Erro Normalizado - Número En .....	44
2.6. Análise Estatística Aplicada a Ensaio com Materiais de Referência .....	46
2.7. Massa Mínima e a Constante de Amostragem ( $K_s$ ) .....	47
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
3.1. Preparação, homogeneização e envase do candidato a material de referência.. ..	49
3.1.1. Seleção da matriz .....	49
3.1.2. Limpeza de material/vidraria .....	51
3.1.3. Preparação da amostra .....	52
3.1.4. Envase do candidato a material de referência .....	54

3.1.5.	Esterilização do lote do candidato a material de referência certificado	54
3.2.	Determinação de umidade residual	55
3.3.	Ensaio de Massa Mínima por EDXRF e FAAS	56
3.4.	Ensaio de homogeneidade	56
3.5.	Caracterização química do candidato a MR	56
3.6.	Análises Químicas	57
3.6.1.	Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia (EDXRF)	57
3.6.2.	Tratamento Químico do Candidato a MR	59
3.6.3.	Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS)	60
3.6.4.	Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES)	61
3.7.	Qualidade do Procedimento Analítico	62
3.7.1.	Incerteza Analítica	62
3.7.2.	Número $E_n$	63
3.8.	Análise dos Resultados	63
3.8.1.	Índice z	63
3.8.2.	Análise de Variância - ANOVA	64
3.8.3.	Constante de amostragem para Ensaio de Massa Mínima	64
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1.	Umidade Residual	65
4.2.	Estudo da Massa Mínima	67
4.2.1.	Qualidade do Procedimento Analítico no Estudo da Massa Mínima por EDXRF	67
4.2.2.	Resultados obtidos por EDXRF	69
4.2.3.	Qualidade do Procedimento Analítico no Estudo da Massa Mínima por FAAS	71
4.2.4.	Estudo da Massa Mínima por Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS)	72

4.3. Ensaio da Homogeneidade .....	75
4.4. Caracterização Química do Candidato a Material de Referência .....	79
4.4.1. Caracterização Química por EDXRF .....	80
4.4.2. Caracterização Química por ICP OES .....	82
5. CONCLUSÕES .....	85
6. PERSPECTIVAS .....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	87
APÊNDICE A .....	108

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Pontos a serem considerados para a disponibilidade de material de referência certificado.....	20
Tabela 2 - Parâmetros utilizados para a quantificação de elementos químicos no candidato a RM.....	58
Tabela 3 - Condições analíticas para a determinação de elementos químicos por FAAS. ....	60
Tabela 4 - Parâmetros definidos no equipamento ICP-OES para a análise química. ....	61
Tabela 5 - Condições analíticas para a quantificação dos elementos químicos por ICP-OES. ....	62
Tabela 6 - Valores obtidos e certificados para o material certificado TM01 e as respectivas incertezas analíticas em nível de 95%. Número $E_n$ para a porção analítica de 20 mg.....	68
Tabela 7 - Valores obtidos e certificados para o material certificado TM01 e as respectivas incertezas analíticas em nível de 95%. Número $E_n$ para a porção analítica de 500 mg.....	68
Tabela 8 - Parâmetros avaliados para o ensaio de massa mínima para Cl, P e S (n = 25). ....	69
Tabela 9 - Valores obtidos e certificados para o RM TM01 e as respectivas incertezas analíticas em nível de 95%, assim como os valores de Número $E_n$ . ....	71
Tabela 10 - Parâmetros empregados na avaliação do ensaio de massa mínima para Cu, Fe, Mn e Zn (n = 25).....	73
Tabela 11 - Resultados de ANOVA para os elementos Cu, Fe, Mn e Zn obtidas para o candidato a MR. ....	78
Tabela 12 - Concentração média dos elementos Cl, P e S para amostras de 500mg analisadas por EDXRF. n = 5.....	81
Tabela 13 - Concentração média dos elementos químicos por ICP-OES (n = 10). ..	83

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Guias ISO envolvidos na produção de material de referência. ....	18
Figura 2 – Etapas envolvidas na produção de um MRC.....	19
Figura 3 – Número de publicações referentes a produção de MRC em diversas áreas de pesquisa no ano de 2018. ....	21
Figura 4 – Progressão no número de publicações referentes a produção de MRC. .	22
Figura 5 – Materiais de referência categorizados por propriedades e aplicações do COMAR (2019). ....	23
Figura 6 – Esquema experimental para ensaio de homogeneidade intra e inter frascos de um candidato a RM. ....	27
Figura 7 – Distribuição de espécies vivas conhecidas no mundo. ....	28
Figura 8 – Número de espécies de insetos consumidos por continente. ....	30
Figura 9 – Eficiência na produção e conversão de alimentar de grilos comparado outras culturas alimentares. ....	31
Figura 10 – Principais grupos de insetos comestíveis. ....	32
Figura 11 – Excitação de raios-X por uma fonte externa de raios-X incidentes. ....	34
Figura 12 – Esquema de funcionamento de um equipamento de EDXRF.....	35
Figura 13 – Esquema de funcionamento de um espectrômetro de absorção atômica com chama. ....	36
Figura 14 – Esquema do processo de excitação e emissão na técnica de ICP-OES. ....	39
Figura 15 – Funcionamento simplificado de equipamento de ICP-OES. ....	39
Figura 16 – Esquema de funcionamento de um plasma.....	40
Figura 17 – Exemplo de Diagrama de Ishikawa. ....	43
Figura 18 – Procedimento experimental realizado no estudo do candidato a MR. ...	50
Figura 19 – Amostra de grilo preto ( <i>Gryllus assimilis</i> ). ....	51
Figura 20 – Amostra liofilizada após a pré-homogeneização (a) e amostra cominuída em moinho de bolas (b). ....	52
Figura 21 – Moinho utilizado na cominuição do candidato a MRC (a). Sistema de moagem (b).....	53
Figura 22 – Recipiente com amostra cominuída (a) e betoneira (b) utilizados para homogeneização da amostra. ....	53

Figura 23 – Quarteador de aço inoxidável utilizado no envase do candidato a MR (a) e frascos contendo o candidato a MR – grilo-preto (b). .....	54
Figura 24 – Irradiador com fonte de $\text{Co}^{60}$ Gammacell 220 Excel-MDS Nordion. ....	55
Figura 25 – Equipamento EDX-720 da Shimadzu. ....	58
Figura 26 – Forno micro-ondas utilizado na digestão das amostras, brancos e materiais de referência. ....	59
Figura 27 – Valores médios de umidade residual obtidos pelos diferentes métodos estudados. Barras de erro são referentes ao desvio padrão ( $n = 3$ ). ....	66
Figura 28 – Comparação entre os valores obtidos de coeficiente de variação e repetitividade do método analítico para os elementos Cl, P e S. ....	70
Figura 29 – Comparação entre os valores obtidos de coeficiente de variação e repetitividade do método analítico para os elementos Cu, Fe, Mn e Zn. ....	74
Figura 30 – Valores de índices z obtidos para cobre (A), ferro (B), manganês (C) e zinco (D). ....	76
Figura 31 – Histograma de resíduos para cobre (A), ferro (B), manganês (C) e zinco (D). ....	77
Figura 32 – Teste de comparações múltiplas ( <i>LS Means</i> ) para os resultados de Cu, Fe, Mn e Zn. ....	79
Figura 33 – Valores do índice z obtidos para Cl, P e S nos frascos analisados por EDXRF. ....	80
Figura 34 – Índice z para Al, Ca, K, Mg e Na. ....	82

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ANOVA – Análise de Variância

CENAPESQ – Centro de Apoio à Pesquisa

COMAR - *The Code d'Indexation des Matériaux de Référence*

CRCN/NE – Centro Regional de Ciências Nucleares – Nordeste.

EDXRF – Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia (do inglês Energy Dispersive X-Ray Fluorescence)

FAAS – Espectrometria de Absorção Atômica por Chama (do inglês Flame Atomic Absorption Spectroscopy)

ICP OES – Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Acoplado Indutivamente (do inglês Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry)

IPEN – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

ISO – International Organization for Standardization

MRC – Material de Referência Certificado.

## 1. INTRODUÇÃO

O conceito de qualidade está associado à percepção de um produto com tal característica que deve atender a alguma necessidade e expectativas do consumidor (OLIVARES, 2015). De acordo com a ISO – International Standardization Organization, qualidade é a adequação ao uso; é a conformidade às exigências. Em laboratórios, tal conceito está ligado, principalmente, à confiabilidade e à rastreabilidade de resultados analíticos, sendo, portanto, de extrema importância em áreas como indústria, comércio e pesquisas científicas (ZSCHUNKE, 2000).

Em análises químicas, a qualidade dos procedimentos analíticos adotados deve ser criteriosa, o que permite a prevenção de erros durante o processo analítico, resultando em um aumento do grau de confiabilidade dos resultados (MAGALHÃES, 2019). Uma forma de atender essa exigência é a comparação dos resultados com um valor de referência em um material conhecido – Material de Referência (RM), se possível com matriz semelhante ao objeto de análise. Esse material deve apresentar homogeneidade comprovada de seus constituintes, tornando possível a quantificação e identificação de analitos de interesse na amostra, dentro dos padrões em medições (ABNT, 2000). MR são utilizados para a validação de métodos analíticos, comparações Inter laboratoriais de resultados e ensaios de proficiência (MOREIRA, 2010).

Estão disponíveis comercialmente mais de 10.000 MRs com as mais variadas propriedades físicas e químicas e aplicações diversas conforme *The Code d'Indexation des Matériaux de Référence* – COMAR (COMAR, 2019), um banco de dados internacional que reúne todos os MRs produzidos em diversos países. Considerando o grande número de análises químicas realizadas, ainda é nítida a escassez de materiais de referência que atendam a demanda em função variedade de matrizes a serem analisadas (MAGALHÃES, 2019), principalmente as análises que utilizam insetos como matriz.

A potencialidade dos insetos como matriz para a produção e uso como materiais de referência certificados está baseada na importância desse grupo de animais como fontes de alimento (AWRAHMAN, 2016; MAGALHÃES, 2015; SANTOS, 2016; ARAÚJO, 2019; NOWAK, 2016). Estudos sugerem esta fonte



alimentícia devido à sua grande adaptação ambiental, ampla distribuição, alta capacidade reprodutiva e sustentabilidade na sua produção, reduzindo o consumo de água e gases de efeito estufa (UNIVERSITY FOUNDATION, 2016).

Contudo, a produção de MR da matriz inseto pode ser prejudicada pelas peculiaridades da matriz escolhida (MAGALHÃES, 2019). Portanto, é essencial que os procedimentos de preparação da amostra e técnica analíticas adotadas levem em consideração as características do material a ser utilizado (KRUG, 2004). Técnicas como Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS), Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES) e Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia (EDXRF) são comumente empregadas em diversas análises que envolvem a caracterização e quantificação de nutrientes em matrizes biológicas, incluindo insetos (MAGALHÃES, 2015; SANTOS, 2016; MÉLO, 2014).

Nesse sentido, a matriz inseto foi escolhida por não ser encontrada como Material de Referência, internacionalmente. Para tal, foram estabelecidas as condições adequadas de preparo do candidato a RM de grilo-preto (*Gryllus assimilis*) in natura, a partir de ensaios de massa mínima e de homogeneidade. Como objetivos específicos, têm-se:

- Determinar a massa mínima de amostra apropriada para a quantificação dos nutrientes no candidato a RM por EDXRF e por FAAS;
- Avaliar a homogeneidade das concentrações dos elementos químicos no candidato a RM por FAAS,
- Realizar a caracterização química do candidato a RM a partir da aplicação de EDXRF e ICP-OES.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1. Materiais de Referência Certificados (MRC)

Um Material de Referência Certificado (MRC) é definido, segundo o Vocabulário Internacional de Metrologia, como um material de referência – RM (*reference material*) acompanhado de uma documentação a qual fornece um ou mais valores de propriedades especificadas com as incertezas e rastreabilidades associadas a partir da utilização de procedimentos de medição validados (JCGM, 2012; INMETRO, 2016). O *National Institute of Standards and Technology* - NIST utiliza como definição de um Material de Referência Padrão – SRM (*Standard Reference Material*) para a indicação de MRC com elevado nível metrológico (QUINÁGLIA, 2012).

Por reduzir perdas causadas por resultados analíticos incorretos, pois permite a verificação da exatidão das medições, o uso de materiais de referência certificados é essencial para a garantia de qualidade em laboratórios de ensaios e calibração (ABNT, 2001; ISO 13528, 2005; EURACHEM, 2002). Esses materiais são utilizados para a calibração de equipamentos de medição, validações e desempenho de métodos de análise, atribuição de valores a outros materiais ou padrões de medição e rastreabilidade<sup>1</sup> de determinação de incertezas de resultados (ABNT/ISO 30, 2011; PANITZ, 2003; SILVA NETO, 2012).

Em química analítica, os materiais de referência certificados são fundamentais para estabelecer a rastreabilidade, assegurando confiabilidade e exatidão aos resultados de medição, assim como propiciam credibilidade aos resultados de análises quantitativas, garantindo a comparabilidade dos resultados nos programas de controle da qualidade em laboratórios (BOSSU, 2013).

A *International Organization for Standardization* - ISO elaborou uma série de guias (Figura 1) as quais atribuem requisitos gerais para competência de produtores

---

<sup>1</sup> Rastreabilidade: Propriedade dum resultado de medição pela qual tal resultado pode ser relacionado a uma referência a partir de uma cadeia ininterrupta e documentada de calibrações, cada uma contribuindo para a incerteza de medição (VIM, 2012).

de MRCs abordando diversos aspectos referentes a produção, caracterização, certificação, tratamentos estatísticos durante a produção de um MRC (ABNT/ISO Guia, 30-35, 2012)

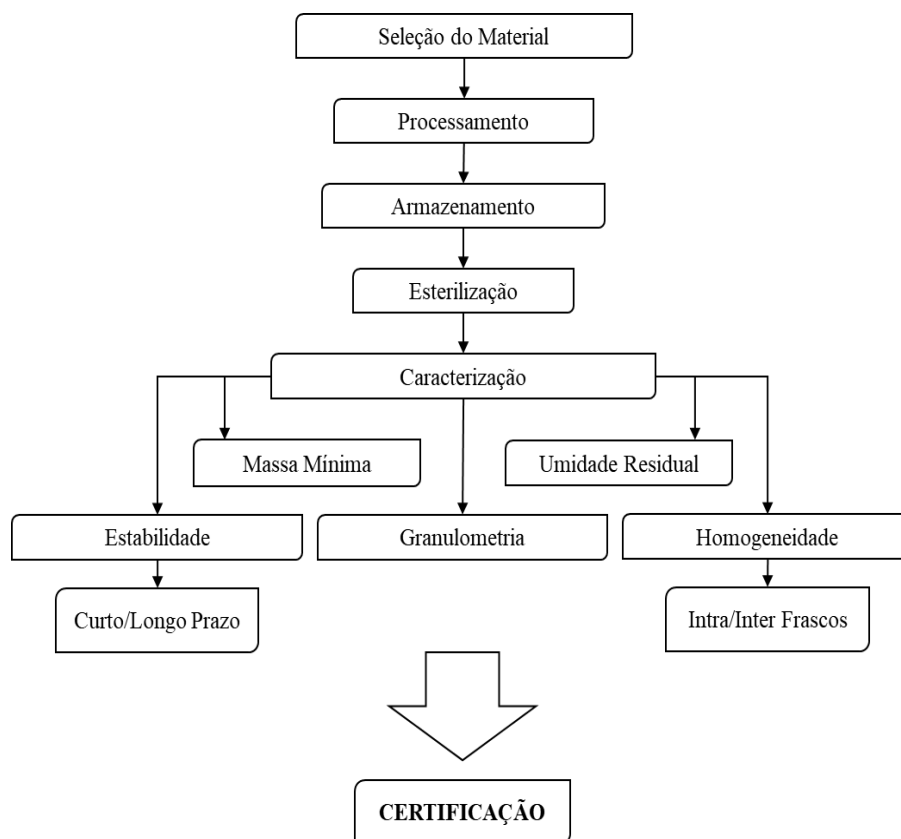
A ABNT ISO GUIA 35 - Materiais de referência - Princípios gerais e estatísticos para a certificação relaciona todos os testes e as determinações que devem ser realizados para que um material de referência produzido seja considerado adequado para liberação e possa ser utilizado como referência para ensaios laboratoriais (ABNT/ISO Guia 34, 2012). A Figura 2 demonstra as etapas envolvidas na produção de um MRC.

Figura 1 – Guias ISO envolvidos na produção de material de referência.

ISO GUIDE 30:2011	• Termos e definições selecionados
ISO GUIDE 31:2004	• Conteúdo de certificados, rótulos e documentação associada
ISO GUIDE 32:2000	• Calibração em química analítica e uso de materiais de referência certificados
ISO GUIDE 33:2002	• Utilização de materiais de referência certificados.
ISO GUIDE 34:2012	• Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência
ISO GUIDE 35:2012	• Princípios gerais e estatísticos para certificação

Fonte: ABNT/ISO Guias 30, 31, 32, 33, 34, 35.

Figura 2 – Etapas envolvidas na produção de um MRC.



Fonte: Adaptado de Emons (2004).

A produção de um MRC é um processo laborioso envolvendo diversas etapas as quais devem garantir propriedades como: homogeneidade, estabilidade, o tamanho de partículas homogêneos, a composição química e as incertezas analíticas de medição (SILVA NETO, 2012), destacando-se as seguintes etapas:

#### 2.1.1. Seleção do material

A produção de um MR envolve diversas etapas e requer diversos procedimentos os quais acarretam custos associados à sua produção. Assim, a escolha da matriz deve ser avaliada segundo critérios que levem em conta a necessidade do uso do MRC, disponibilidade da matriz a ser selecionada na produção do MRC e a viabilidade da produção. Em um documento publicado em 2003, a

Agência Internacional de Energia Atômica (*International Atomic Energy Agency – IAEA*) elencou pontos relacionados com a disponibilidade do MR (Tabela 1), os quais afetam a escolha do tipo matriz a ser trabalhada.

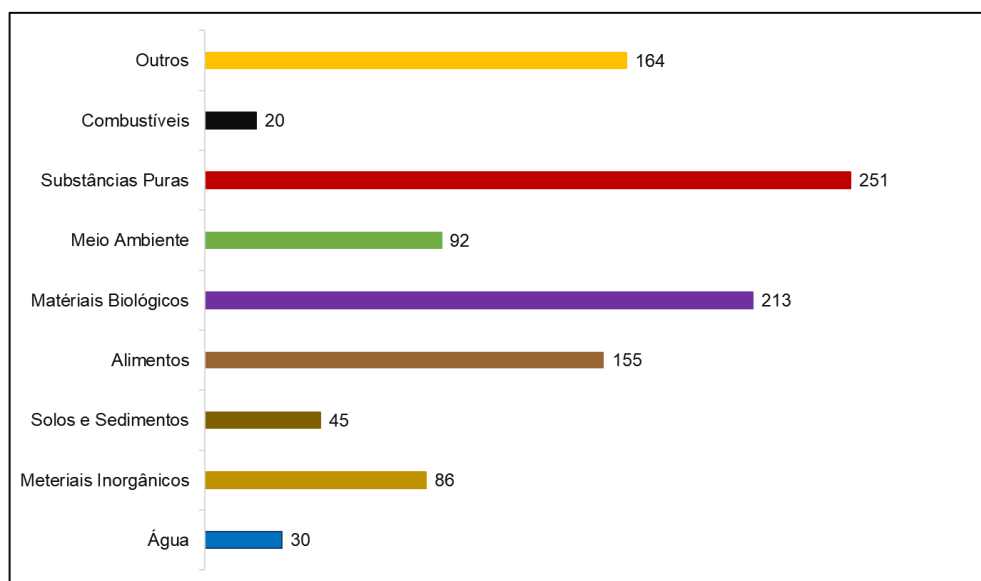
Tabela 1 - Pontos a serem considerados para a disponibilidade de material de referência certificado.

Pontos	Consideração
<b>Disponibilidade dos MRCs</b>	<p>Existe MRC apropriado disponível no que diz respeito à:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Matriz (composição química, propriedades físicas e estabilidade)</li> <li>• Forma química e nível metrológico adequado</li> <li>• Presença de outras substâncias e elementos químicos (eventuais interferências na medição)</li> </ul>
<b>Atribuição de valores de propriedades</b>	<p>Como foram determinados os valores de propriedades de MRC específico (caracterização)?</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Existe alguma informação quantitativa da distribuição de elementos no material? Homogeneidade do material?</li> <li>• São os valores de propriedades atribuídos rastreáveis para alguma referência estabelecida, por exemplo, o SI?</li> <li>• A rastreabilidade foi demonstrada?</li> <li>• Este MRC pode ser usado para calibração?</li> </ul>
<b>Custos do RM</b>	<p>Quanto do MRC é realmente necessário para o propósito pretendido? Qual o custo relacionado a esse propósito?</p>

Fonte: Adaptado de IAEA (2003).

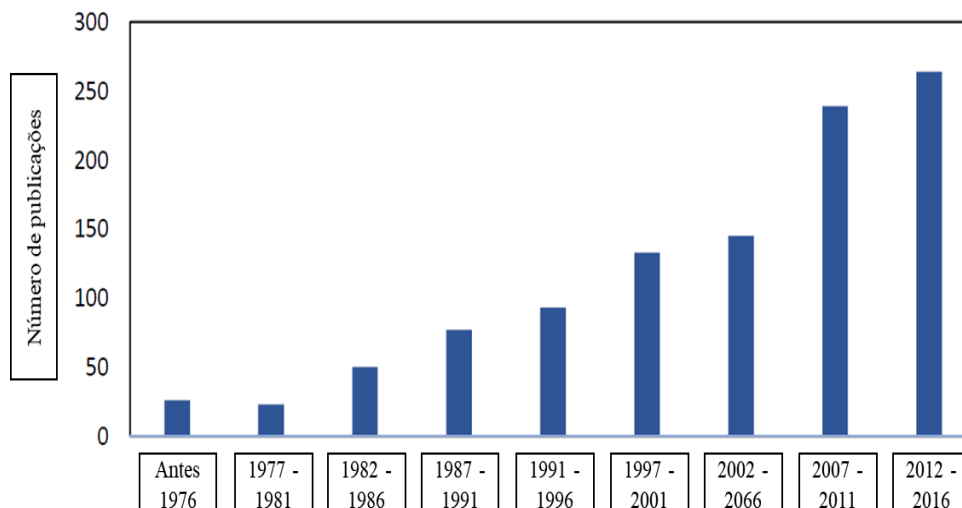
Tendo em vista a grande importância que os MRC representam para a garantia da qualidade das análises químicas, são encontrados diversos trabalhos utilizando vários tipos de materiais que são avaliados como candidatos a Materiais de Referência Certificado (OLIVARES, 2018). Olivares (2018) conseguiram classificar diversas publicações referentes a produção de MRC em diversas áreas de pesquisa (Figura 3), bem como demonstraram um aumento de trabalhos publicados ao longo dos anos que abordam essa temática (Figura 4).

Figura 3 – Número de publicações referentes a produção de MRC em diversas áreas de pesquisa no ano de 2018.



Fonte: Adaptado de Olivares (2018).

Figura 4 – Progressão no número de publicações referentes a produção de MRC.



Fonte: Modificado de Olivares (2018).

A produção desses materiais no Brasil conta com programas de incentivos desde década de 90 como a “Implementação da Metrologia em Química no Brasil: Organização de redes de laboratórios e estruturação das atividades de produção de Materiais de Referência”, contribuindo para o desenvolvimento da área em nível nacional (ULRICH, 2011). O Programa Brasileiro de Metrologia em Química, PBMQ, teve como proposta o preparo de diversos MRCs, para utilização em medidas físicas, e destacando um MRC de mercúrio em peixe pelo Laboratório de Caracterização Química e Isotópica do IPEN - CNEN/SP (PONÇANO, 2003). No Laboratório de Radioisótopos do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, CENA/USP, para o preparo de um MRC de café (TAGLIAFERRO, 2003).

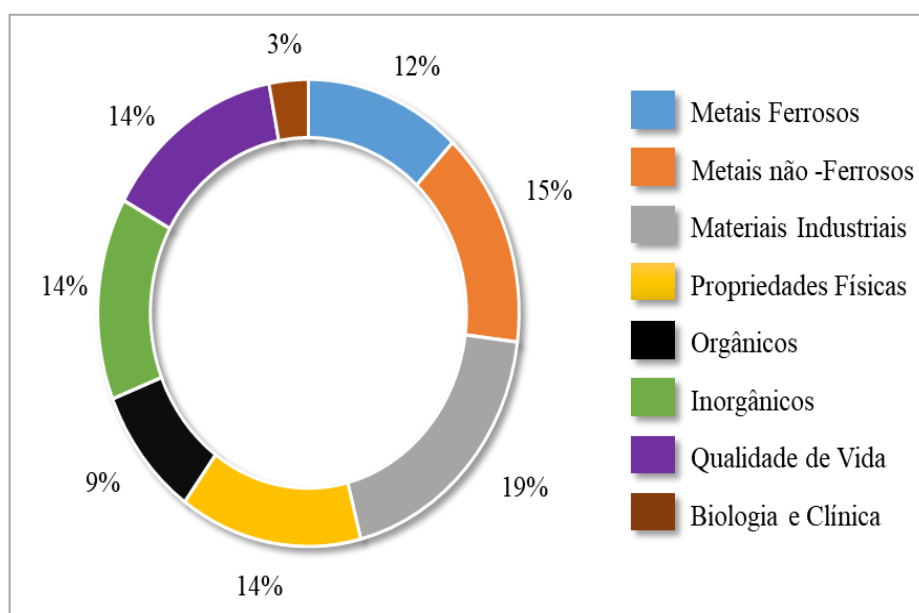
Os MRCs produzidos no país são obtidos a partir de diferentes matrizes como Isótopos de Urânio e materiais biológicos (*Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares de Estado de São Paulo – IPEN/SP*; suplemento mineral para bovinos, materiais rochosos e solo arenosos (*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA*); alimentos como feijão, tomate e leite em pó (*Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP*) e matrizes farináceas (*Instituto de Química/Universidade Federal da Bahia – UFBA*) (BIANCHI, 2016; DOS SANTOS, 2011; DOS SANTOS, 2016; KATO, 2013; KATO, 2014; LIMA, 2010; MAIHARA, 2003; MARTINEZ, 2012;

MOREIRA, 2010; OLIVEIRA JUNIOR, 2006; SANTANA, 2013; ULRICH, 2011; VEGA MARTINEZ, 2016).

Apesar da participação desses diversos centros e instituições de pesquisa espalhados pelo território nacional, o desenvolvimento e estudos de candidatos a Materiais de Referência Certificados ainda pode ser considerado incipiente. Nesse contexto, o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO, além de atuar na produção e comercialização desses materiais, viabiliza o processo de certificação dos MRCs produzidos em território nacional pela acreditação de laboratórios de ensaio que se adequem a exigências estabelecidas na ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 (MOREIRA, 2010; ULRICH, 2011).

Atualmente, INMETRO faz parte, como representante brasileiro, do COMAR – *Code d'Indexation des MATériaux de Référence*, que consiste em um banco de Materiais de Referência Certificados formado por 27 países, com cerca de 240 produtores. Esse banco possui, atualmente, aproximadamente 11.000 MRCs disponíveis para consulta *on-line*, desse total 138 são MRCs produzidos no Brasil (COMAR, 2019), os quais são classificados em diferentes áreas (Figura 5).

Figura 5 – Materiais de referência categorizados por propriedades e aplicações do COMAR (2019).



Fonte: Adaptado de Comar (2019).



As condições de análises químicas de MR podem ser desfavorecidas, pois cada matriz possui peculiaridades analíticas como, por exemplo, amostras biológicas, que podem conter gorduras, fibras musculares e outros componentes dificultadores de tratamento químico e análise (BARNES, 2014). O efeito de matriz também prejudica a comutatividade do material de referência, definida como a propriedade do MR em atender diversos métodos analíticos para diversos tipos de amostras de matrizes semelhantes. Assim, tornam-se necessárias a produção e disponibilização de Materiais de Referência com homogeneidade e estabilidade garantidas com características semelhantes às das amostras de rotina, seja na composição ou na própria natureza (FERREIRA, 2016; CASTRO, 2017).

### 2.1.2. Esterilização

Após a etapa de armazenamento (envase do MRC), faz-se necessário a realização de procedimento de esterilização, principalmente para materiais de origem biológica. Este processo consiste na utilização de métodos físicos para a diminuição do nível de contaminação com micro-organismos que possam ocasionar degradação ou alteração da composição do material. A degradação microbiológica pode comprometer os resultados de ensaios posteriores como, por exemplo, a homogeneidade e estabilidade do material (FAN; SOMMERS, 2013; FARKAS, 1998).

A utilização de radiações ionizantes é amplamente aplicada na esterilização de alimentos, pois apresenta certas vantagens que tornam a técnica atrativa para esse segmento (MOREIRA, 2010; CASTRO, 2017). Nesse processo, é utilizada a fonte de Co-60 para a geração de radiação gama que, por ser altamente penetrante, permite a esterilização de materiais sem que necessite a violação de embalagens ou recipientes contendo a amostra (SILVA, 2014).

A escolha da dose de radiação a ser utilizada é um fator de grande relevância, pois deve garantir a eliminação ou a inativação de micro-organismos presentes no material a ser irradiado. Silva et al. (2014) constataram que doses entre 1 e 10 kGy apresentaram efeito de pasteurização com redução ou total destruição de agentes microbianos em até 90% do número de sobreviventes. Doses de 2 a 10 kGy são

recorrentes em trabalhos relacionado a esterilização de materiais de referência certificados (MOREIRA, 2010; CASTRO, 2017).

### 2.1.3. Umidade Residual (UR)

Propriedade que se refere à quantidade de água presente na amostra prepara após processos de secagem (PANITZ, 2003). O teor de água em uma amostra depende da umidade do ambiente e do grau higroscópico do material. Os valores de referência de um MR são expressos em função da matéria seca, realizando-se correções a partir da determinação de umidade com precisão e acurácia. Alguns dos métodos mais utilizados na determinação de umidade residual são secagem em estufa, liofilização e secagem a vácuo (CAMPBELL-PLATT, 2015). É recomendado que as porções-testes analisadas em outros ensaios também sejam avaliadas quanto à umidade residual (CARDOSO et al., 2010).

### 2.1.4. Massa mínima

A ABNT/ISO Guia 34 recomenda e considera a definição da massa mínima de amostra para a utilização do material de referência, evitando, assim, erros e discrepâncias referentes aos resultados analíticos. O ensaio é realizado a partir de diferentes porções do candidato a RM, empregando métodos de análise de dados estatísticos, para estimar a massa mínima necessária para realização de uma determinada aplicação. Com esse ensaio, evita-se a utilização desnecessária do material, reduzindo-se seu desperdício (ABNT/ISO 34, 2012).

A massa mínima do material de referência pode variar com o tipo ou, para um mesmo material, diferentes massas podem ser definidas para diferentes métodos de quantificação ou medição de propriedade. Matrizes geológicas, por exemplo, apresentam porções analíticas menores, devido ao seu grau natural de enriquecimento em elementos químicos. Todavia, para matrizes biológicas, são encontradas variações de massas, geralmente entre 100 mg e 500 mg (IAEA 336 *Lichen*, IAEA 392 *Algae*, IAEA 436 *Tuna fish* e IAEA V-8 *Rye flour*), atingindo até 2,5 g

em material de referência de leite – SRM 1549a *Whole Milk Powder* para a análise de vitaminas.

#### 2.1.5. Homogeneidade

Segundo a norma ABNT/ISO Guia 30, a Homogeneidade é definida como grau de “uniformidade” de estrutura ou composição com respeito a uma ou mais propriedades específicas. Um MRC é dito homogêneo se a diferença entre os valores medidos de uma propriedade específica, obtida a partir de diferentes porções do material, é desprezível quando comparada a uma das componentes de incerteza do material. Isto é, diferentes porções do material estão em concordância com os valores e incertezas pré-estabelecidas pela caracterização e quantificação de parâmetros macroscópicas, físicos e químicos (ULRICH, 2011; MARCKI, 2017; CARDOSO, 2010).

Sendo considerada a característica mais importante de um material de referência certificado, a avaliação da homogeneidade é de grande importância na produção de um MR, pois indica possíveis variações na composição do material permitindo detectar impurezas, interferências ou irregularidades que podem surgir em etapas iniciais como preparação e envase (MARCKI, 2017; VAN DER VEEN, 2001a).

Para a avaliação da homogeneidade, é importante que o número de amostras a serem analisadas sejam estatisticamente representativas do lote<sup>2</sup> do MRC. A ABNT/ISO Guia 35 recomenda que os números de frascos sejam utilizados de 10 a 30 frascos para avaliação da homogeneidade (ABNT/ISO 35, 2012; MARCKI, 2017), que podem ser selecionados por amostragem aleatória estratificada ou amostragem sistemática, sendo o plano de amostragem aleatório estratificado recomendado, uma vez que garante que os frascos escolhidos para o estudo estejam igualmente distribuídos no lote.

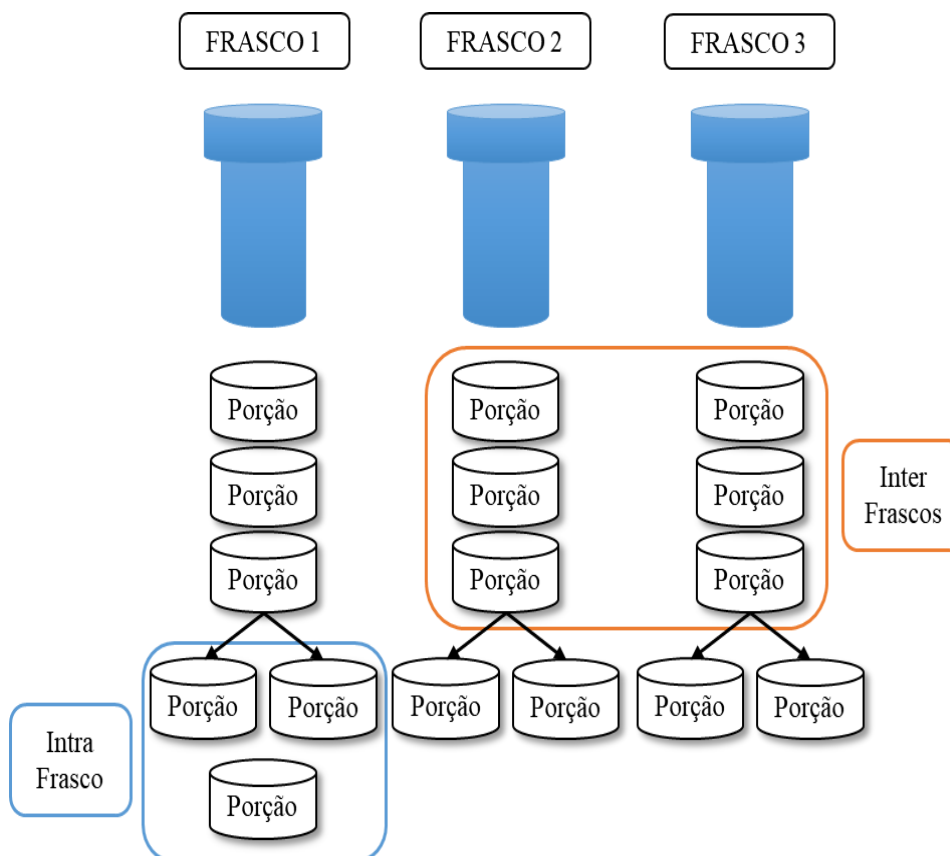
Um esquema experimental de avaliação de homogeneidade é ilustrado na Figura 6, em que é possível avaliar a concordância entre as propriedades medidas em diferentes porções de diferentes frascos, definida como homogeneidade inter frascos,

---

<sup>2</sup> Lote: definido como o conjunto de unidades (frascos/recipientes) utilizados para armazenamento do Material de Referência.

e/ou comparando resultados em sub porções pertencentes a um mesmo frasco, denominada homogeneidade intra-frasco (Figura 06).

Figura 6 – Esquema experimental para ensaio de homogeneidade intra e inter frascos de um candidato a RM.



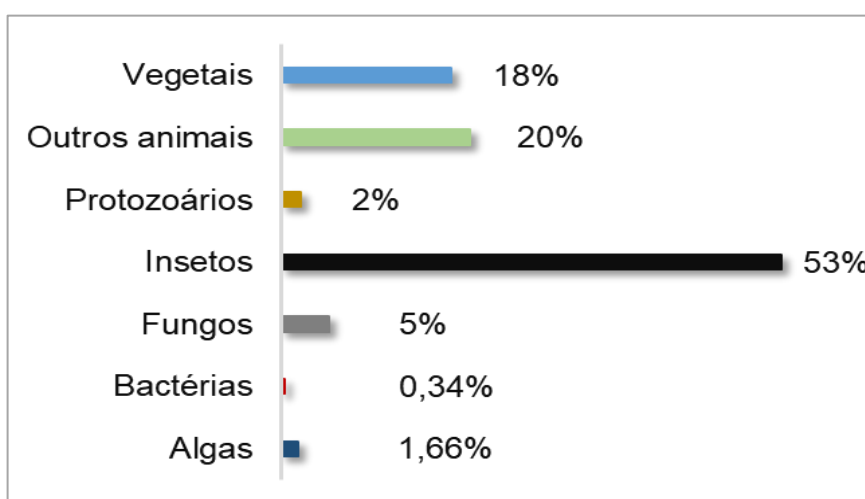
Fonte: O Autor.

Considerando-se a necessidade de comparações múltiplas, a avaliação da homogeneidade é realizada pelo uso de métodos estatísticos como a Análise de Variâncias - ANOVA e/ou Análise de Variância Multivariada - MANOVA. A variação entre as unidades analisadas deve ser incluída na incerteza analítica expressa no certificado (SANTOS, 2015, ABNT/ISO 35, 2012, THOMPSON, 2006, VAN DER VEEN, 2001b).

## 2.2. Matriz inseto como candidato a material de referência certificado

Os insetos são invertebrados com exoesqueleto quitinoso, corpo dividido em cabeça, tórax e abdômen, três pares de patas articuladas, olhos compostos e um par de antenas (LOPES, 2005). São conhecidas cerca de 1 milhão de espécies, embora seja estimado que existam entre 2,5 e 10 milhões de espécies, tornando-os os animais mais abundantes do planeta (Figura 7) (WILSON, 1992; FELIX, 2010).

Figura 7 – Distribuição de espécies vivas conhecidas no mundo.



Fonte: Felix (2010).

Insetos são considerados a classe de animais mais bem-sucedida de todos os tempos com ampla distribuição e resiliência em condições adversas, sendo encontrados em diversos habitats como recursos hídricos, florestas, solo, ambientes cavernosos, Ilhas e ambientes urbanizados (RESH, 2009). Os insetos atuam em diversos processos ecológicos, proporcionando a manutenção de diversos ecossistemas. Esses animais desempenham funções de bastante relevância no meio ambiente como a regulação de comunidades microbianas, a fragmentação do material vegetal, a decomposição da matéria orgânica, a ciclagem de nutrientes e a estruturação do solo (AQUINO, 2001; CORREIA; OLIVEIRA, 2000). Por desempenharem um importante papel no ambiente, é de conhecimento que a eliminação total seres vivos do solo acarretaria grandes prejuízos ao ambiente

(RESH, 2009; CHAMPAN, 2012), resultando na perturbação de cadeias alimentares, desequilíbrio biogeoquímicos do solo, causando extinções de diversas espécies de outros animais e plantas (HOLL; KAPPELLE, 1999, CORREIA; OLIVEIRA, 2000; SANTOS, 2016; MAGALHÃES, 2015).

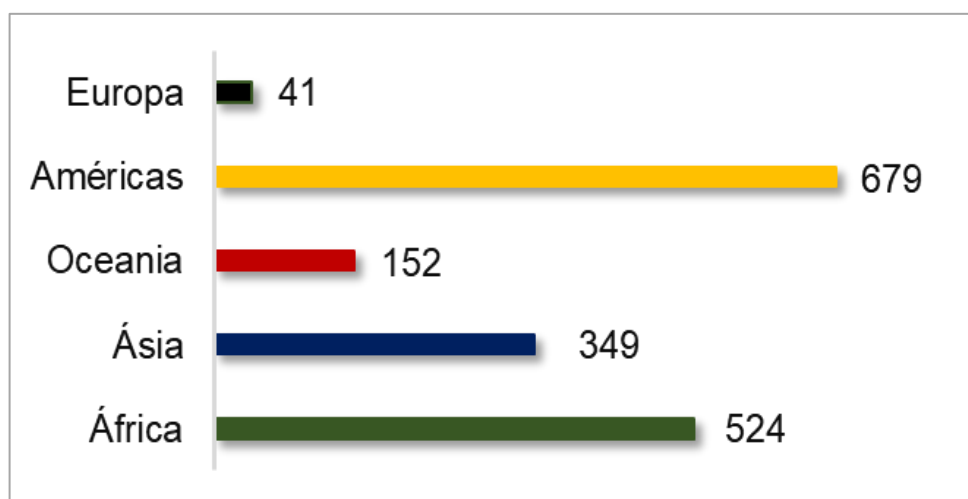
Os insetos podem obter nutrientes e outras substâncias necessárias a manutenção do seu organismo a partir de diversas fontes. A disponibilidade dessas fontes e, conseqüentemente, dessas substâncias dependem das características do ambiente ao qual o animal está inserido, bem como podem ser afetadas por fatores naturais (BRADLEY, 2015; SANTOS, 2016). Com base nisso, esse tipo de matriz é amplamente empregado em diversos estudos que avaliam a qualidade ambiental de diversos ecossistemas (AWRAHMAN, 2016; MAGALHÃES, 2015; SANTOS, 2016; NETO, 1995; THOMANZINI; THOMANZINI, 2002; PAIS, 2003; JULIÃO, 2005; SILVEIRA, 2011).

Diversos trabalhos demonstraram a potencialidade desses animais na monitoração de impactos ambientais, além da utilização dos mesmos para definição valores de referência de elementos químicos para serem usados como padrão (ARDESTANI, 2014; PEARCE; VENIER, 2006; FREITAS, 2006; NICHOLS, 2007; OTAVO, 2013; BROWN, 1997). Tal potencialidade pode ser atribuída às características fisiológicas dos insetos (tamanho, adaptabilidade e períodos curtos de gestação) que conferem aos mesmos uma rápida resposta frente a diversas mudanças, principalmente as associadas a degradação ambiental por meio de atividades antropogênicas (PAIS, 2003; NUORTEVA, 1963).

Santos (2016) realizou um estudo envolvendo 16 elementos químicos (macro e micronutrientes) com o objetivo de avaliar a qualidade ambiental de áreas urbanas utilizando diversas espécies de insetos. Magalhães (2015), em seu estudo, estabeleceu concentrações naturais de elementos químicos (As, Cd, Cl, Cu, Fe, Mo, P, Pb, S, Sb, Th e Zn), definindo uma metodologia de tratamento químico empregando diversos procedimentos químicos. Gongalsky (2006) analisou, em insetos, a bioacumulação de Sc, Cr, Co, Ni, Cu, Zn, As, Rb, Sr, Mo, Pb, Ba, Th e U resultantes dos resíduos da mineração de urânio para produção de energia. Os estudos de Fletcher (2014) e Talarico (2014) tiveram como foco utilização de insetos para avaliar a deposição química proveniente da queima de carvão e lixo urbano, respectivamente.

Um outro ponto relevante associado aos insetos é seu uso por seres humanos como fonte de alimento, prática chamada de Entomofagia. Essa atividade é, ainda, pouco praticada nos países do ocidente, principalmente devido à fobia alimentar e às pobres qualidades sensoriais em comparação com a carne, porém vem crescendo muito em importância em todo o mundo (MEGIDO, 2016). Apesar disso, estima-se que cerca de 2 bilhões de pessoas, em cerca de 80% dos países consumam insetos (ROMEIRO, 2018), sendo relatado um grande número de espécies de insetos consumidas, principalmente, na África e em cerca de 23 países do continente americano (Figura 8).

Figura 8 – Número de espécies de insetos consumidos por continente.



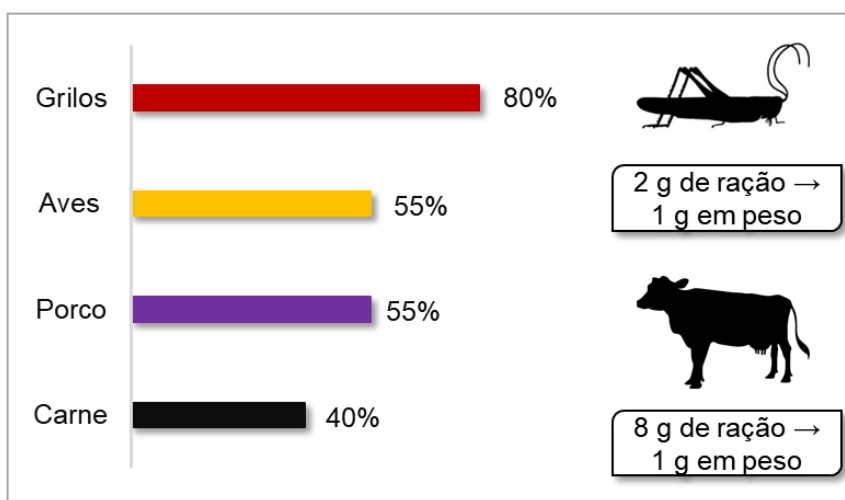
Fonte: Adaptado de Romeiro (2018).

A aceitação ou rejeição de um alimento é baseada nas características do alimento (propriedades sensoriais) e influências culturais, ao qual o consumidor está inserido e características próprias do consumidor (RUBY, 2015). Com isso, os insetos podem representar “perigos” e “riscos” à saúde, sendo, assim, rejeitados como fonte alimentícia (HARTMANN, 2016; TAN, 2016).

Contudo, preocupações relacionadas com a sustentabilidade, consumo e produção de carne requerem urgência na mudança de hábitos alimentares em nível mundial para um sistema de produção mais sustentável e que garanta um estilo de vida saudável para gerações presentes e futuras (BURLINGAME, 2012), principalmente pelas doenças associadas ao consumo da carne vermelha (AYKAN, 2015; PAN, 2012).

A alta capacidade de reprodução e porte reduzido criam inúmeras possibilidades de fontes sustentáveis para a alimentação humana (UNIVERSITY FOUNDATION, 2016). Os insetos apresentam, geralmente, elevados teores de proteína, aminoácidos, contendo uma grande variedade de minerais como cobre, ferro, magnésio, manganês, fósforo, selênio e zinco, além de vitaminas e, em alguns casos, ácido fólico. Desse modo, são considerados como os principais substitutos da carne (ARAÚJO, 2019; NOWAK, 2016), bem como, apresentam alta eficiência de conversão alimentar. Por exemplo, os grilos, quando comparados a outros tipos de sistemas de produção (Figura 9), promovem maior eficiência na sua produção, dependem de espaço de terras bastante inferiores à pecuária tradicional e reduzem grandemente o consumo de água (RUMPOLD; SCHLÜTER, 2013; VOX, 2016).

Figura 9 – Eficiência na produção e conversão de alimentar de grilos comparado outras culturas alimentares.



Fonte: Adaptado de Vox (2018).

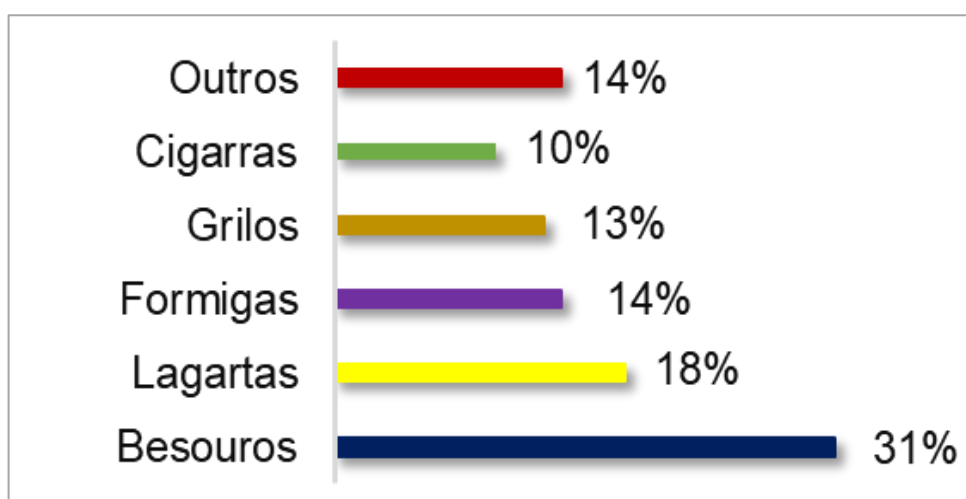
De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura – FAO, mais de 1.900 espécies de insetos são consumidas no mundo todo (FAO, 2015). Esse número tende a crescer à medida que os novos estudos e resultados de pesquisas ao longo dos anos trazem as mais diversas potencialidades alimentares desses animais (BERNARD, 1997; DEFOLIART, 1997 PUNZO, 2003;



FAO, 2010; VAN HUIS, 2013; RUMPOLD, 2013; JONGEMA, 2013; ONU, 2013; FAO, 2015).

Os grupos de insetos mais consumidos são, respectivamente: os Coleoptera (besouros), Lepidoptera (as lagartas de mariposas ou borboletas), Hymenoptera (abelhas, vespas e formigas), Orthoptera (gafanhotos, esperanças e grilos), Hemiptera (cigarras, cigarrinhas, cochonilhas e percevejos), Isoptera (cupins), Odonatas (libélulas), Diptera (moscas) e outras ordens (Figura 10) (NOWAK, 2016; FAO, 2015).

Figura 10 – Principais grupos de insetos comestíveis.



Fonte: Adaptado de FAO (2015).

Sendo assim, a matriz inseto apresenta bastante relevância como Candidato a Material de Referência. Para tal, é necessário a elaboração e uso de métodos para produção e análise desse tipo de matéria-prima, que garantam todas as propriedades especificadas a um MR.

## **2.3. Técnica Analíticas Aplicadas aos Ensaio de Propriedades de um Candidato a Material de Referência**

Técnicas analíticas são primordiais para promover a seleção de matriz apropriada para a produção de um material de referência certificado. Pesquisas envolvendo a busca por padrões de referência necessitam das mais variadas técnicas analíticas para determinar as concentrações do maior número de elementos químicos possíveis (MOREIRA, 2010; ULRICH, 2011; KATO, 2014; CASTRO, 2017; MARCKI, 2017).

Nos estudos envolvendo a produção de candidatos a material de referência certificado, a confiabilidade e a qualidade dos resultados estão intimamente relacionadas com a escolha da técnica analítica. É importante que o método analítico apresente as mais altas qualidades metrológicas e, aos seus resultados, estejam associadas incertezas analíticas suficientemente pequenas (MARQUES, 2008; EURACHEM, 2002).

As técnicas analíticas de Fluorescência de Raios-X por Energia Dispersiva (EDXRF), Espectrometria de Absorção Atômica (AAS) e Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP OES) merecem destaque devido à gama de elementos químicos passíveis de determinação, bem como por apresentarem limites de detecção, seletividade e resolução adequadas para as matrizes ambientais (MAGALHÃES, 2015; SANTOS, 2016; SKOOG, 2009).

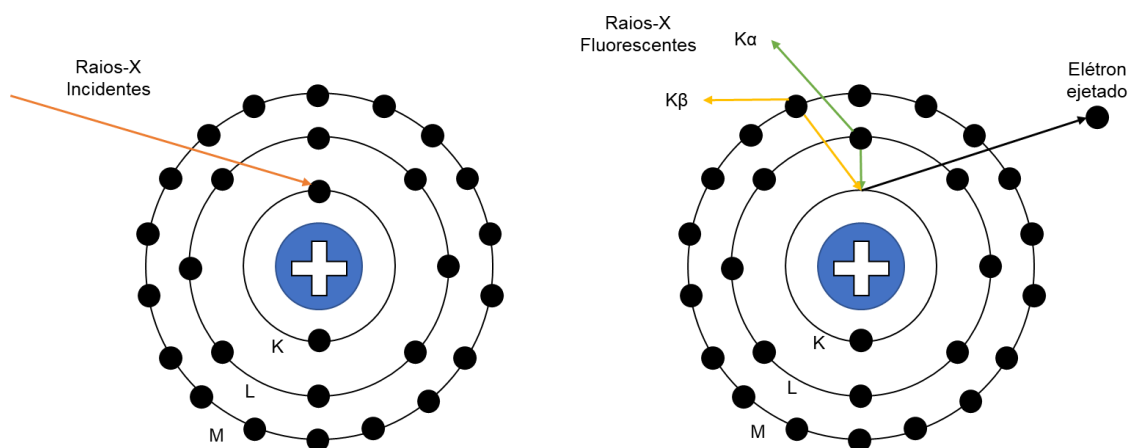
### **2.3.1. Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia (EDXRF)**

A Fluorescência de Raios X (XRF) é uma técnica de ensaio não destrutiva, multielementar, que possibilita a identificação e quantificação dos constituintes presentes na amostra em fase sólida ou líquida. A XRF baseia-se nas medidas de intensidades dos raios-X característicos detectados por unidade de tempo (SANTOS, 2012; POTTS, 2008; SILVA, 2009).

A modalidade de Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia - EDXRF baseia-se na detecção dos raios-X emitidos, por um detector que gera um espectro

em função da energia – dispersão de energia (SANTOS, 2012; KRUMMENAUER, 2017). O fenômeno de fluorescência ocorre quando os elétrons de camadas eletrônicas mais internas dos átomos são ejetados, a partir de uma fonte de excitação (JANSSENS, 2004; NASCIMENTO, 1999; BECKHOFF, 2006). Os elétrons de camadas mais externas ocupam o espaço dos elétrons ejetados e, nesse processo, ocorre a emissão de um fóton de energia na faixa dos raios-X característicos, como demonstrado na Figura 11.

Figura 11 – Excitação de raios-X por uma fonte externa de raios-X incidentes.



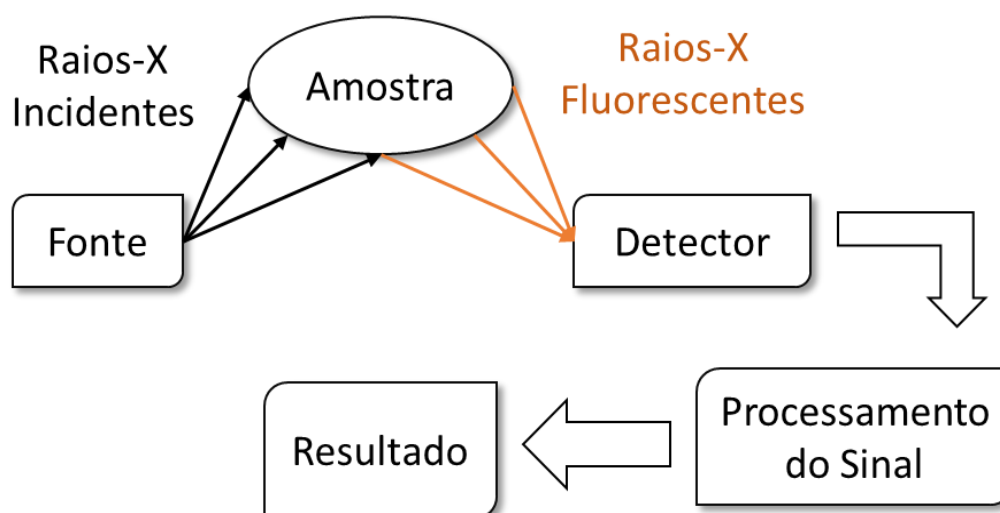
Fonte: O Autor.

A intensidade dos raios-X fluorescentes, medida pelo detector, é relacionada com a concentração de cada elemento químico na amostra por meio de curvas analíticas (JANSSEN, 1993; CLAPER, 2006; SKOOG, 2009; KLEIN; DUTROW, 2012; SHARMA, 2012; SOUSA, 2013). É empregado o detector de Si-Li para a quantificação de raios-X emitidos pelos elementos químicos com número atômico variando entre 13 (Al) e 50 (Sn). A Figura 12 representa o funcionamento de um equipamento de EDXRF.

Esta técnica analítica tem ampla aplicabilidade em áreas como indústria de metais, petróleo, polímeros, alimentos, além de pesquisas de análise ambiental e indústria farmacêutica (ANJOS, 2002; SKOOG, 2009; MARGUÍ, 2005; PATACA, 2005; BROWER, 2010). Baptista (2011) e Aguiar (2009) determinaram macro e micro

e nutrientes em amostras de sangue de cavalo e hamster, respectivamente; Custódio (2005) avaliou a saúde de recém-nascidos pela quantificação de diversos elementos químicos como Mn, Fe, Cu, Zn, Rb, As, Se e Pb em sangue; Santos (2016) e Magalhães (2015) utilizaram EXRDF para avaliar a qualidade de áreas urbanas e definição de parâmetros de concentração dos elementos químicos em diversas classes de invertebrados e ordens de insetos.

Figura 12 – Esquema de funcionamento de um equipamento de EDXRF.



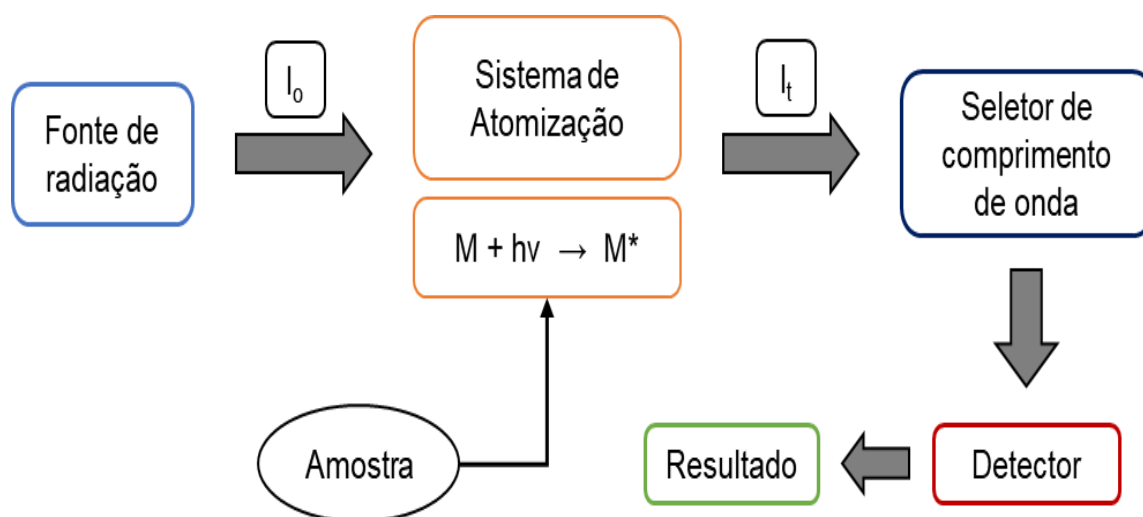
Fonte: O Autor.

A técnica de EDXRF requer uma definição e padronização dos parâmetros para cada rotina experimental (MAGALHÃES, 2015). Cada amostra a ser analisada deve ser avaliada com base em curvas estabelecidas previamente com materiais de referência certificados (REDUS, 2009; SOUSA, 2013), principalmente para insetos, cujas composições químicas e variedade de matrizes são incalculáveis (MAGALHÃES, 2015).

### 2.3.2. Espectrometria de Absorção Atômica (AAS)

Esta técnica parte do princípio fundamental de realizar a medição da absorção da intensidade de uma radiação eletromagnética por átomos gasosos no estado fundamental, relacionando-a com a concentração na amostra (MAGALHÃES, 2015; SKOOG, 2009; MEYERS, 2006). Os principais componentes de um espectrômetro de absorção atômica são, simplificadamente: Fonte de radiação, Sistema de Atomização, Detector e Registrador de Sinal (Figura 13).

Figura 13 – Esquema de funcionamento de um espectrômetro de absorção atômica com chama.



Fonte: O Autor.

A fonte produz um feixe de radiação com comprimento(s) de onda específico(s) para cada elemento químico, podendo ser fontes mono ou multielementar (WELZ; SPERLING, 1999; BORGES, 2005; SKOOG, 2006). As principais fontes de radiação nas quais se promove a excitação de elementos capazes de emitir radiação nas regiões visível e ultravioleta do espectro eletromagnético são as lâmpadas de cátodo oco (HCL), fontes de espectros contínuos e lâmpadas de descarga sem eletrodos (EDL) (WELZ, 1999; SKOOG, 2006; MAGALHÃES, 2015), sendo as fontes HCL as mais utilizadas em rotinas de análises por absorção atômica.

O funcionamento básico de uma HCL consiste na ionização do gás, pela aplicação de uma diferença de potencial entre o cátodo e o ânodo, geralmente de 150 a 400 V. Os íons gasosos (cátions) formados são atraídos e acelerados em direção ao catodo (negativo), contendo o metal, o resultado desse choque arranca átomos do metal que ficam no estado vapor. Esses átomos metálicos sofrem colisões com os íons do gás ionizado, os quais transferem energia suficiente para que a excitação do metal. O átomo metálico excitado é instável e ao readquirir sua estabilidade, ao retornar ao estado fundamental, emite a energia armazenada na forma de radiação eletromagnética, cujo(s) comprimento(s) de onda é (são) característico (s) do elemento que constitui o cátodo (SKOOG, 2006; SKOOG, 2002).

A solução da amostra é aspirada para o equipamento empregando um nebulizador e direcionada ao sistema de atomização, que converte os constituintes presentes da amostra em espécies gasosas que absorvem a radiação de proveniente da fonte de radiação, possibilitando a determinação da concentração do analito. Os principais sistemas de atomização são: por chama (FAAS), em tubo aquecido acoplado a um gerador de hidretos (HGAAS), por meio da geração de vapor a frio (CVAAS) ou em forno de grafite (GFAAS) (SKOOG, 2009; MÉLO, 2014; MAGALHÃES, 2015).

O sistema de seleção de comprimentos de onda consiste em um conjunto de monocromadores que separa a linha espectral de interesse das outras linhas emitidas pela fonte de radiação, por meio do monocromador. O prisma ou a rede de difração (quartzo ou holográfica) irá decompor o feixe de radiação em discretos comprimentos de onda, com diferentes ângulos, dessa forma, através da fenda de saída, é possível selecionar apenas a linha de comprimento de onda desejado, sendo os monocromadores do tipo Echelle, os quais combinam o uso de um prisma e uma rede de difração, mais utilizados (KRUG, 2004; SKOOG 2009).

O detector consiste em um dispositivo capaz de medir a corrente proveniente detector. O principal detector encontrado nos espectrômetros de absorção atômica são as válvulas fotomultiplicadoras. Os equipamentos modernos apresentam interfaces que executam funções que permitem registrar e converter os sinais eletrônicos em resultados mensuráveis, o sinal em absorbância ou concentração (SKOOG, 2009; KRUG, 2004).

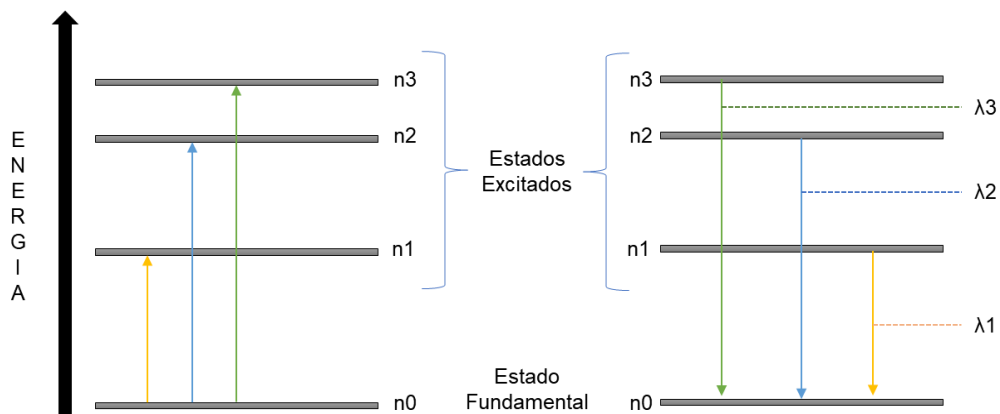
A Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS) é empregada para a quantificação de diversos elementos químicos nas mais variadas matrizes como amostras biológicas, ambientais, geológicas e alimentos (KANG, 1999; ALEIXO; NÓBREGA, 2000; BEIRAS, 2003; KRUG, 2004). É uma técnica analítica versátil, pois permite a análise diversos elementos químicos, apresentando limites de detecção e quantificação adequados para os analitos (SKOOG, 2006; MEYERS, 2006), além de ser uma técnica recorrente na certificação de diversos materiais de referências. Contudo, o sistema de atomização requer a utilização de gases como combustíveis, o que acaba acarretando um custo maior na sua operação, bem como, necessita que os analitos presentes na amostra estejam em solução por meio de tratamentos químicos acelerados por técnicas térmicas (micro-ondas, por exemplo), quando a matriz se apresenta na forma sólida.

### 2.3.3. Espectrometria de Emissão Atômica com Fonte de Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES)

A Espectrometria de Emissão Atômica com Fonte de Plasma Acoplado Indutivamente (ICP OES) é uma técnica que permite a identificação e quantificação de espécies químicas pela medição da radiação eletromagnética proveniente de átomos ou íons gerados por uma fonte plasma (SKOOG, 2009; TAVARES, 2013; MEYERS, 2000).

Nesta técnica, os átomos que constituem a amostra se encontram no estado fundamental, ou seja, estão no nível de energia mais baixo. Após aplicação de uma energia externa, os elétrons passam a ocupar estados de maior energia (estado excitado) e ao retornarem ao estado fundamental emitem energia na forma de fóton, que é proporcional a diferença entre os dois estado energéticos, produzindo um comprimento de onda, ou espectro de emissão, específico para cada analito, como descrito na figura 14 (TAVARES, 2013; FAUSTINO, 2015; SKOOG, 2006).

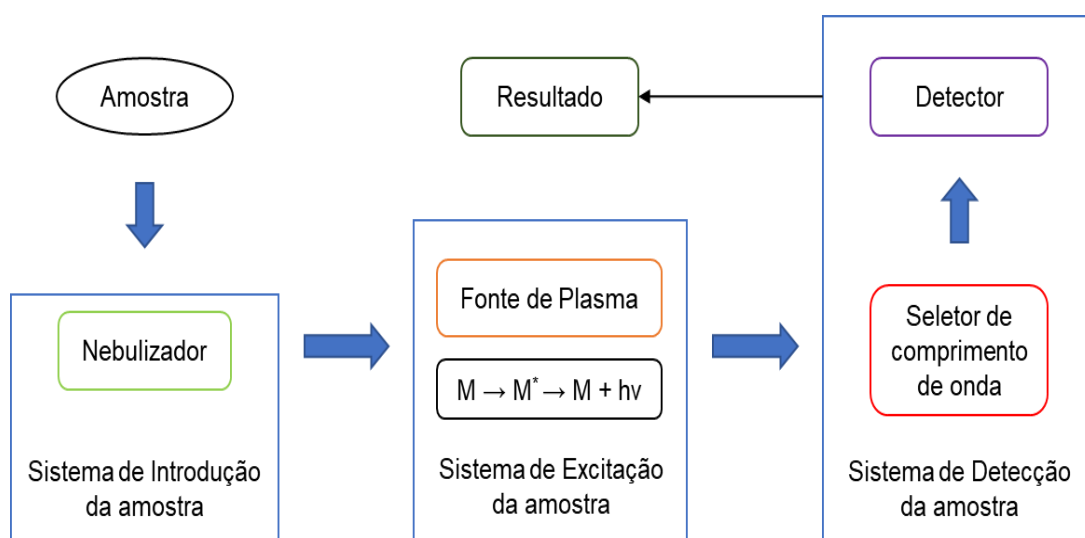
Figura 14 – Esquema do processo de excitação e emissão na técnica de ICP-OES.



Fonte: O Autor.

A Figura 15 representa, de maneira simplificada, o funcionamento de um ICP-OES, que conta com um sistema de injeção da amostra, de excitação da amostra e de detecção da radiação eletromagnética.

Figura 15 – Funcionamento simplificado de equipamento de ICP-OES.



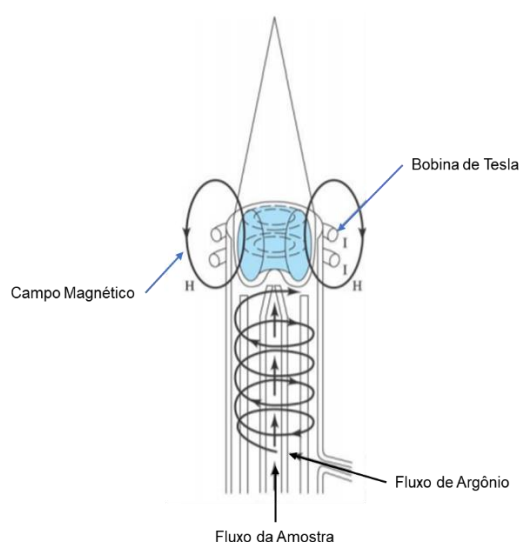
Fonte: O Autor.



O inserção da solução de amostra é realizado por meio de um nebulizador, que converte a solução em um aerossol. Nesse processo, apenas uma pequena parte da amostra é convertida, cerca de 5% de amostra utilizando nebulizadores pneumáticos, a qual se mistura com um gás utilizado no transporte até o sistema de excitação do equipamento (MARQUES, 2015).

No sistema de excitação da amostra, ocorre a atomização e a excitação dos analitos da amostra, quando o aerossol entra em contato com o plasma<sup>3</sup>, em um compartimento denominado Tocha (Figura 16). A tocha consiste de 3 tubos concêntricos de quartzo. No tubo mais externo é encontrado gás utilizado na refrigeração, no tubo intermediário circunda um fluxo de gás auxiliar de argônio, que é responsável pela estabilização do plasma. No terceiro tubo, também conhecido por tudo injetor, passa o gás de nebulização. Esse gás passa através do nebulizador, arrastando o aerossol até o plasma (TAVARES, 2013).

Figura 16 – Esquema de funcionamento de um plasma.



Fonte: Modificado de

<https://www.sas.upenn.edu/~seanjw/Inductive%20Heating%20and%20Plasma%20Index.html>

<sup>3</sup> O plasma pode ser definido como descargas elétricas em forma de gases, parcialmente ionizados, no qual há elétrons livres e íons positivos em constante movimento, ocorrendo assim uma transferência de energia, podendo ser por radiação ou condução (FAUSTINO, 2015)

Para formação do plasma, é utilizado gás argônio como combustível, o qual é injetado na tocha. Posteriormente, é aplicado um campo de radiofrequência (24 – 40 Mhz), seguido de uma descarga elétrica por uma bobina de Tesla, formando as primeiras ionizações do gás. Os elétrons provenientes da ionização são acelerados pelo campo magnético aumentando sua energia cinética que é transferida a outros átomos por colisões, resultando na formação de novas partículas carregadas. Assim, o plasma é formado a partir da cadeia de colisões (MARQUES, 2015; HOU, 2019; SKOOG, 2006). O plasma pode atingir temperaturas que variam de 4.000 e 10.000 K (dependendo da região do plasma), o que garante uma atomização e excitação mais eficiente, quando comparada a outra técnica que utilizam sistemas de chama como atomizadores (MARQUES, 2015, SKOOG, TAVARES, 2013).

O sistema de detecção apresenta componentes que possibilitam isolar comprimentos de onda emitida pelos constituintes da amostra e detectar os sinais gerados pelo equipamento, convertendo-os em dados analíticos para quantificação dos analitos. Os dispositivos utilizados na seleção de comprimentos de onda podem ser os monocromadores, que isolam somente uma banda de comprimento de onda para ser detectada) ou policromadores, que permitem a detecção de múltiplos comprimentos de onda simultaneamente. Esses últimos são ideais para análises multielementares por ICP-OES (SKOOG, 2009; HOU, 2000). De maneira geral, a detecção propriamente dita é realizada por dispositivos que convertem os sinais elétricos oriundos do mono/policromador em sinais de intensidade, que se relacionam proporcionalmente com a concentração da substância em análise (FAUSTINO, 2015; MEYERS, 2006).

A técnica de ICP OES é utilizada na indústria mineradora, metalúrgica, agrícola e alimentos, por exemplo (ARGEKAR, 2002; GORECKA, 2006; KRACHLER, 2012; SANTANA, 2013; WANG, 2010). É um método de análise que permite a quantificação de diversos elementos químicos, como metais alcalinos e alcalinos terrosos, elementos terras raras e metais de transição de forma simultânea (HOU, 2000; SKOOG, 2009). Contudo, o método por ICP OES apresentam como desvantagem o custo associado ao alto consumo de gases necessários para as análises químicas.

Para as técnicas que utilizam a absorção e emissão de radiação como FAAS e ICP-OES, a quantificação dos analitos pode ser afetada por efeitos que provocam a

alteração nos sinais, proporcionalmente à presença de determinadas substâncias. Tal inconveniente, chamado de interferente, pode ser associada a diversos fatores tais como: interferência provocada por coincidência de linhas espectrais de diferentes elementos químicos (interferente espectral); efeitos ocasionados pelas características físicas e químicas da amostra (efeito de matriz) e a presença de substâncias, que interferem na ionização de outras espécies, aumentando ou diminuindo o sinal associado a esta (interferência não espectral) (FAUSTINO, 2015; SKOOG, 2009).

Nesse sentido, é de extrema importância o conhecimento da composição da matriz a ser utilizada, bem como o estudo e planejamento da metodologia a respeito das condições a serem utilizadas no tratamento da amostra. Além disso, é importante estimar as incertezas analíticas e avaliar a qualidade do procedimento analítico nas determinações realizadas.

#### **2.4. Incerteza analítica**

Segundo o Vocabulário Internacional de Metrologia VIM (JCGM, JCGN, 2012), a incerteza é definida como parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas na medição. São relatadas diversas fontes de incerteza em uma medição como, por exemplo, amostragem não representativa, valores inexatos de padrões de medição e materiais de referência, as quais estão relacionadas as várias etapas de um processo analítico (ULRICH, 2001).

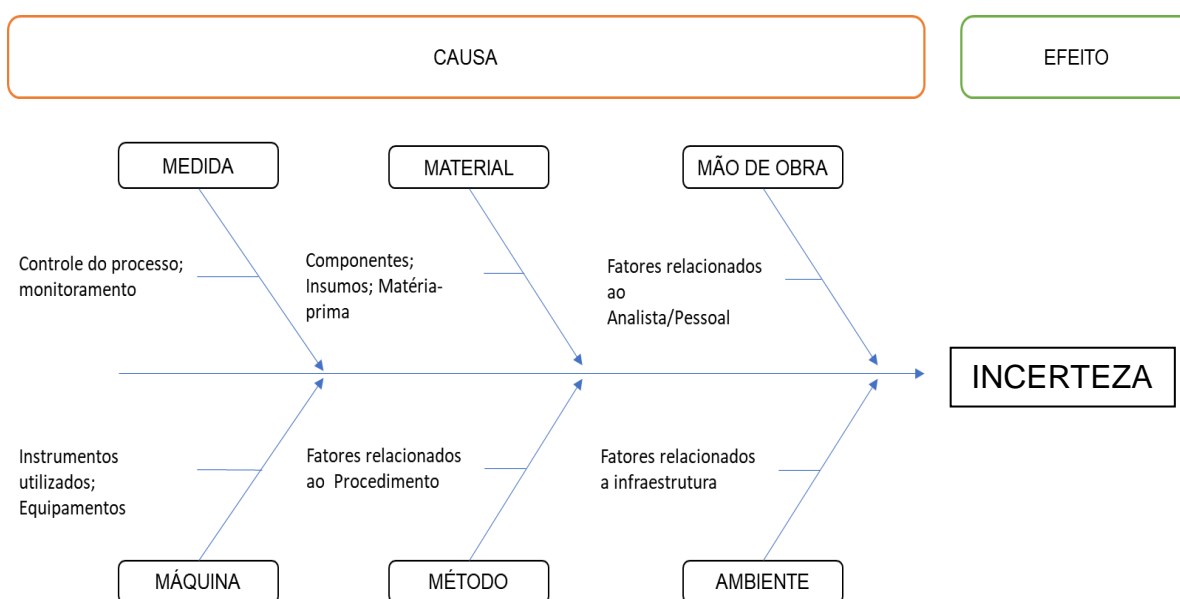
O Guia para a Expressão da Incerteza de Medição (GUM) preconiza uma maneira de estimar a incerteza de medição envolvendo as seguintes etapas: especificação do mensurando, identificação das fontes de incerteza, quantificação dos componentes de incerteza, cálculo da incerteza padrão combinada e cálculo da incerteza expandida (DE LA CRUZ, 2010; BUCHMANN, 2002).

A especificação do mensurando requer um estabelecimento claro do que está sendo medido, incluindo a relação do mensurando e as grandezas associadas (DE LA CRUZ, 2010), podendo ser outras grandezas que não são mensuráveis ou constantes, assim como deve ser informado quando a etapa de amostragem foi incluída no

procedimento, ou não. Caso seja, a estimativa das incertezas associadas ao procedimento amostral deve ser considerada (EURACHEM, 2012).

As fontes de incertezas podem ser listadas e identificadas convenientemente a partir de um diagrama de causa e efeito - Diagrama de Ishikawa (Figura 17), o qual descreve o modo como essas diferentes fontes se relacionam entre si, indicando sua influência na incerteza do resultado (ELLISON, 2012; VAN DER VEEN, 2001a; VAN DER VEEN, 2001b).

Figura 17 – Exemplo de Diagrama de Ishikawa.



Fonte: Silva Neto (2019).

Depois de identificar as fontes de incerteza, é importante a quantificação das incertezas originadas a partir de cada fonte individual. Essas contribuições devem ser expressadas como incerteza padrão ( $u$ ), isto é, desvios padrão (ELLISON, 2002). Após a estimativa individual das componentes ou grupos de componentes de incertezas ( $u$ ), a última etapa é o cálculo da incerteza padrão combinada ( $u_c$ ), que consiste na raiz quadrada da soma de todas as fontes de  $u_n$  (Equação 1), porém nem todos os componentes podem ter contribuição significativa para a estimativa da incerteza combinada (EURACHEM/CITAC, 2002).

$$u_c = \sqrt{u_1^2 + u_2^2 + u_3^2 + \dots + u_n^2} \quad (1)$$

Embora a incerteza combinada seja comumente utilizada para expressar a incerteza de um resultado da medição, é recomendado que tal medida seja definida em um intervalo de confiança sobre o resultado de medição – Incerteza Expandida, a qual se estima que contenha uma fração significativa da distribuição de valores que podem razoavelmente ser atribuídos à medida (PORTAL ACTION, 2018). Essa fração pode ser vista como a probabilidade de cobertura ou o nível de confiança do intervalo. Para se associar um determinado nível de confiança ao intervalo definido pela incerteza expandida (Equação 2), é necessário indicar qual a distribuição de probabilidades está associada ao resultado da medição e à sua incerteza padrão combinada (CABRAL, 2004).

$$U = u_c \cdot K \quad (2)$$

U é calculado pela multiplicação da incerteza combinada,  $u_c$ , por um fator de abrangência  $k$ , que é obtido a partir de uma tabela da distribuição  $t$  para a probabilidade de abrangência ( $P$ ) desejada, geralmente para um intervalo de confiança de 95% (CABRAL, 2004). Tipicamente, o valor do fator de abrangência é igual a 2.

## 2.5. Erro Normalizado - Número En

Um ponto importante, se tratando de análises químicas, é a seleção de uma metodologia a qual produza resultados confiáveis. Nesse sentido, a metodologia analítica escolhida deve ser avaliada em função sua exatidão, parâmetro que, segundo Ribani (2004): “representa o grau de concordância entre os resultados

individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro”, sendo associada à qualidade do procedimento analítico.

A validação da metodologia, comumente, é realizada pela análise de um material de referência (certificado), os quais os valores de sua composição são conhecidos (valores certificados), submetendo-o ao mesmo roteiro experimental escolhido (valor observado) para a amostra estudada. Diversas estratégias estatísticas são utilizadas para avaliar a qualidade do procedimento analítico, como Teste F e Teste t de Student, que utilizam média dos valores de composição, desvio padrão e variância dos resultados para atestar a qualidade do procedimento adotado (VOGEL, 2008; SKOOG, 2006; VALDERRAMA, 2009).

Uma outra forma de analisar tal mérito analítico, é pela avaliação do Erro Normalizado ou Número  $E_n$ , o qual utiliza dados das médias dos valores obtidos e de referência e suas respectivas incertezas analíticas (MÉLO, 2014; MAGALHÃES, 2015; SANTOS, 2016, INMETRO, 2016; EURACHEM, 2002) conforme a Equação 3:

$$E_n = \frac{X_{\text{obs}} - X_{\text{ref}}}{\sqrt{U_{\text{obs}}^2 + U_{\text{ref}}^2}} \quad (3)$$

em que,  $X_{\text{obs}}$  é valor obtido experimentalmente do material certificado;  $X_{\text{ref}}$  é o valor certificado do material de referência;  $U_{\text{obs}}^2$  e  $U_{\text{ref}}^2$  são, respectivamente, os valores quadráticos das incertezas obtidas experimentalmente e recomendadas pelo certificado de análise do material de referência. Valores de  $E_n$  estando entre  $-1$  e  $1$  conferem ao procedimento analítico escolhido, a exatidão exigida na validação da metodologia para um nível de confiança de 95 % (INMETRO, 2016).

## 2.6. Análise Estatística Aplicada a Ensaio com Materiais de Referência

Como mencionado anteriormente, a homogeneidade é a propriedade mais importante que um material de referência deve apresentar, por isso ensaios de performance em candidatos a materiais de referência devem ser realizados (MARCKI, 2017). A avaliação de tal propriedade é realizada por métodos estatísticos que forneçam resultados condizentes com a propriedade a ser mensurada. De acordo com a ABNT/ISO Guia 35, a avaliação da homogeneidade deve ser realizada por meio da Análise de Variância (ANOVA).

A Análise de Variância é um método estatístico que possibilita inferir se há ou não diferenças entre médias populacionais, baseado na análise de suas variâncias (SKOOG, 2006 MORETTIN, 2010; MAGALHÃES, 2009). ANOVA permite avaliar a importância de um ou mais fatores, comparando as médias de variáveis de resposta nos diferentes tratamentos. Nesse sentido, a hipótese nula ( $H_0$ ) afirma que as médias da população são iguais, enquanto a hipótese alternativa ( $H_a$ ) afirma que, pelo menos, uma é diferente (MARTINS, 2011; SKOOG, 2006).

Nos ensaios de homogeneidade de candidatos a MR, o lote de frascos é tratado como fator e a concentração é o tratamento de cada analito na amostra. Os valores diferentes dentro do fator são chamados de níveis ou grupos. Dessa forma, a comparação entre os frascos que compõem o lote é realizada a partir dos resultados obtidos nas análises de cada frasco de candidato a MR (MARCKI, 2017). Para que os resultados da Análise de Variância sejam considerados no estudo, é importante assegurar que os dados em análise estejam de acordo com os pressupostos do teste estatístico, principalmente pela aproximação da distribuição dos resíduos à uma função de densidade de probabilidade normal (MORETTIN, 2010; MARTINS, 2011), que também pode estar associada à homocedasticidade de variâncias.

Uma distribuição normal ou distribuição Gaussiana é aquela que apresenta uma distribuição simétrica dos dados em torno da média de um conjunto infinito de dados (SKOOG, 2009), ou seja, é aquela em que a maioria dos dados apresentam o mesmo valor ou próximo de valor médio das observações. A representação dessa distribuição é realizada mediante construção de um histograma (variável *versus*

frequência), o qual, para dados normalmente distribuídos, deve resultar em uma curva em formato de sino (BINGHAM, 2010; SKOOG, 2002; MARTINS, 2011).

Diversos testes estatísticos como Shapiro-Wilk, Anderson-Darling, Kolmogorov-Smirnov e Raina-Joiner, por exemplo, podem ser utilizados para testar se os resíduos seguem uma distribuição normal (PORTAL ACTION, 2019). O desempenho desses testes diferencia-se, principalmente, pela robustez associada ao número de observações. Diversos trabalhos compararam a eficiência desses testes aplicando-os em diferentes análises de dados (CIRILLO, 2003; ÖZTUNA, 2006; LEOTTI, 2005), sendo o teste de Shapiro-Wilk (SW) o mais indicado para diferentes distribuições e tamanhos de amostras (PINO, 2014; MIOT, 2017; LOPES, 2013).

A ANOVA e o teste de SW fornecem como parâmetro de prova o valor de p (p-valor), o qual indica a significância da estatística aplicada. O p-valor pode ser interpretado como uma forma de avaliar o grau de concordância entre os dados e  $H_0$ . A tomada de decisão é feita comparando-se p-valor com o nível de significância<sup>4</sup>, alfa ( $\alpha$ ), adotado para o cálculo estatístico, de modo que, para  $H_0 < \alpha$ , aceita-se a hipótese alternativa ou, para  $H_0 > \alpha$ , a hipótese nula é aceita, a qual infere uma distribuição normal dos dados (Teste de Normalidade) e igualdade entre as variâncias (ANOVA) (FERREIRA, 2015; OLIVEIRA, 2014).

Todos esses cálculos podem ser efetuados manualmente pela consulta de livros ou manuais estatísticos, os quais demonstram o passo a passo das operações matemáticas envolvidas, bem como pelo uso de Softwares específicos para tal finalidade como o Statistica®, MINITAB®, SPSS, Microsoft Excel® entre outros.

## **2.7. Massa Mínima e a Constante de Amostragem ( $K_s$ )**

Um dos parâmetros de grande importância no estudo e produção de candidatos a materiais de referência certificados é a determinação do erro associado à utilização de uma determinada massa para as análises em função da variação dos resultados

---

<sup>4</sup> Nível de significância ( $\alpha$ ): é o valor expresso em que para um p-valor do teste estatístico aplicado estando abaixo, a hipótese nula deve ser rejeitada. Comumente  $\alpha$  assume valor de 0,05 quando a análise estatística trabalha em um nível de confiança de 95% (SCHLOTZHAUER, 2007).



nas diferentes massas testadas (ABNT/ISO 34, 2012). Comumente, são comparados os coeficientes de variação com a repetitividade do método analítico para a determinação da massa mínima recomendada para a análise de um MRC (MOREIRA, 2010; SILVA, 2016). Contudo, a Constante de Amostragem –  $K_s$  pode ser útil na compreensão dos erros analíticos envolvidos na escolha de uma determinada massa mínima (KRUG, 2004; BARSOSA, 2009; MAGALHÃES, 2019).

A imprecisão dos resultados devido a erros de amostragem foi estimada por Ingamells e Switzer (INGAMELLS; SWITZER, 1973) quando, ao utilizar a constante de amostragem,  $K_s$ , propuseram informações a respeito da homogeneidade da amostra mediante uso da Equação 4.

$$K_s = R^2 w = \frac{10^4 w \sum (x_i - \bar{X})^2}{(M - 1)^2} \quad (4)$$

em que,  $\bar{X}$  é a média aritmética das  $M$  determinações;  $R$  é o coeficiente de variação dos resultados obtidos e  $w$  é massa, em gramas, da amostra analisada. De maneira geral, a constante de amostragem estima a imprecisão devido a heterogeneidade da amostra. Em que, a partir da relação entre o coeficiente de variação e massa da amostra, para diversas determinações consecutivas, a constante  $K_s$  representa a massa necessária para garantir um erro de 1% ao realizar um subamostragem (BARSOSA, 2009; MAGALHÃES, 2019). Ao extrair a raiz quadrada da constante de amostragem -  $K_s^{0,5}$ , tem-se o coeficiente de variação esperado para a análise de 1 grama de amostra. Ainda, com a constante de amostragem, é possível estimar o coeficiente de variação esperado –  $R$  para a análise de uma amostra de determinada massa (INGAMELLS; SWITZER, 1973), parâmetro considerado interessante para a avaliação da preparação de um candidato a MR (MAGALHÃES, 2019).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

A produção de material de referência perfaz diversas etapas, incluindo a seleção da matriz, baseada na disponibilidade comercial de material de referência da matriz selecionada, metodologia de preparo das amostras, definição da estratégia de cominuição, ensaios de massa mínima e de homogeneidade e caracterização química conforme os Guias ISO 30 e 35 (ABNT, ). Neste trabalho, as etapas foram adaptadas a partir do estudo realizado por Magalhães (2019) para a verificação da adequabilidade da matriz insetos para a produção de material de referência:

- Etapa I – Preparação, homogeneização e envase do candidato a material de referência
- Etapa II – Ensaio de Massa Mínima
- Etapa III – Ensaio de Homogeneidade das concentrações de elementos químicos
- Etapa IV – Caracterização química do candidato a material de referência

Na Figura 18, ilustra-se o procedimento experimental e a seleção dos frascos para amostragem, de acordo com as atividades descritas acima. Detalhes metodológicos serão discutidos nas próximas seções para preparação, homogeneização e envase, assim como os ensaios realizados após o envase a partir da seleção aleatória de frascos.

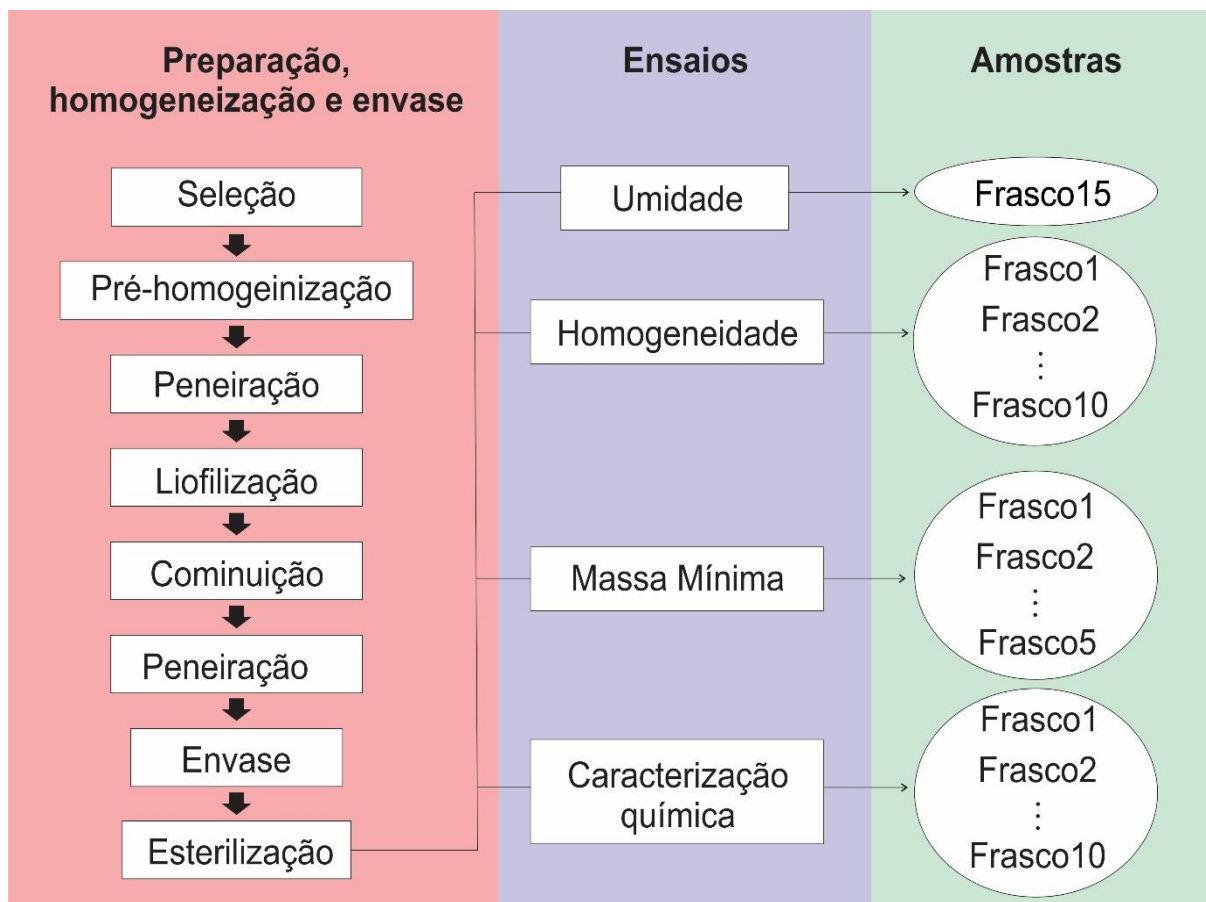
#### **3.1. Preparação, homogeneização e envase do candidato a material de referência**

##### 3.1.1. Seleção da matriz

A seleção do candidato a material de referência – MR foi realizada a partir da aplicabilidade e potencialidade do uso de insetos (em diversos estudos) como alimentos, biomonitores e agentes de controle de pragas. Mais ainda, os estudos de Magalhães (2019) confirmaram a potencialidade da farinha grilo-preto (*Gryllus assimilis*) como candidato a MR. Contudo, ao considerar a problemática enfrentada

por Magalhães (2019) para o trabalho desenvolvido com farinhas comerciais, optou-se para o emprego de insetos congelados.

Figura 18 – Procedimento experimental realizado no estudo do candidato a MR.



Fonte: O Autor

Para tanto, as amostras foram adquiridas do produtor Insetos Brasil, Camaragibe – PE. Para facilitar a preparação do material conforme discutido por Magalhães (2019), foram adquiridos 2 kg de insetos adultos *in natura* (congelados) conforme mostra a Figura 19, seguindo-se com a preparação conforme mostra a Figura 20.

Figura 19 – Amostra de grilo preto (*Gryllus assimilis*).



Fonte: MAGALHÃES (2019).

### 3.1.2. Limpeza de material/vidraria

Todos os materiais/vidrarias utilizados no desenvolvimento deste estudo foram descontaminados utilizando procedimento descrito abaixo, empregando Extran, ácido nítrico e água ultrapura:

- Submersão dos materiais/vidrarias em solução de detergente científico Extran (Merk) 5% v/v por 24 horas;
- Enxague com água ultrapura até a retirada completa do Extran;
- Submersão em solução de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) destilado a 10% (v/v) por 24 horas com posterior enxague em água ultrapura Milli-Q,
- Secagem do material em capela de fluxo laminar.

### 3.1.3. Preparação da amostra

Aproximadamente 2 kg da amostra de grilo preto foram levados para a capela de fluxo laminar Veco (modelo Biosafe – 12) equipada com filtro HEPA (do inglês: *High Efficiency Particulate Arrestance*) para evitar contaminação de materiais exógenos proveniente do ambiente externo ao equipamento. Para o procedimento de pré-homogeneização, 8 porções de 250 g do material foram misturadas a uma mesma massa de água ultrapura (Milli-Q) em um liquidificador modificado com lâminas de titânio. Em seguida, a mistura foi tamisada em uma peneira de PVC com abertura de 1 mm, para eliminação de material proveniente do exoesqueleto do animal. Posteriormente, o material peneirado foi liofilizado por um período de 72 h, enquanto o particulado grosseiro foi reservado para a estimativa de eficiência a partir de gravimetria.

Após a liofilização, o material seco (Figura 20a) foi levado ao liquidificador adaptado para homogeneização e, posteriormente, cominuição em moinho de bolas de material coríndon sinterizado (Figura 21). A amostra cominuída foi novamente tamisada para tamanho de partículas de 80  $\mu\text{m}$ . O material obtido (Figura 20b) foi transferido para um recipiente descontaminado devidamente selado e protegido com espuma (Figura 22a), sendo levado a uma betoneira adaptada como equipamento de homogeneização (Figura 22b) por um período de 48 h.

Figura 20 – Amostra liofilizada após a pré-homogeneização (a) e amostra cominuída em moinho de bolas (b).

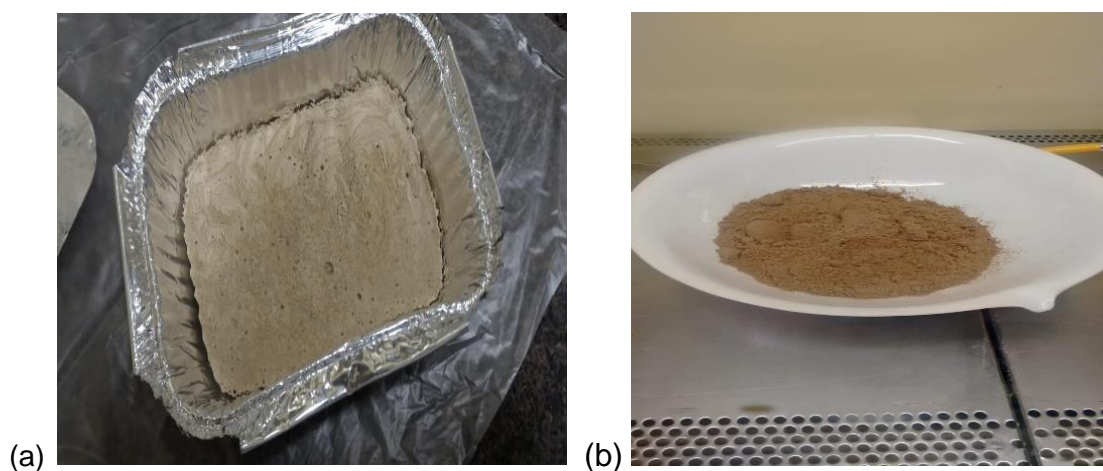
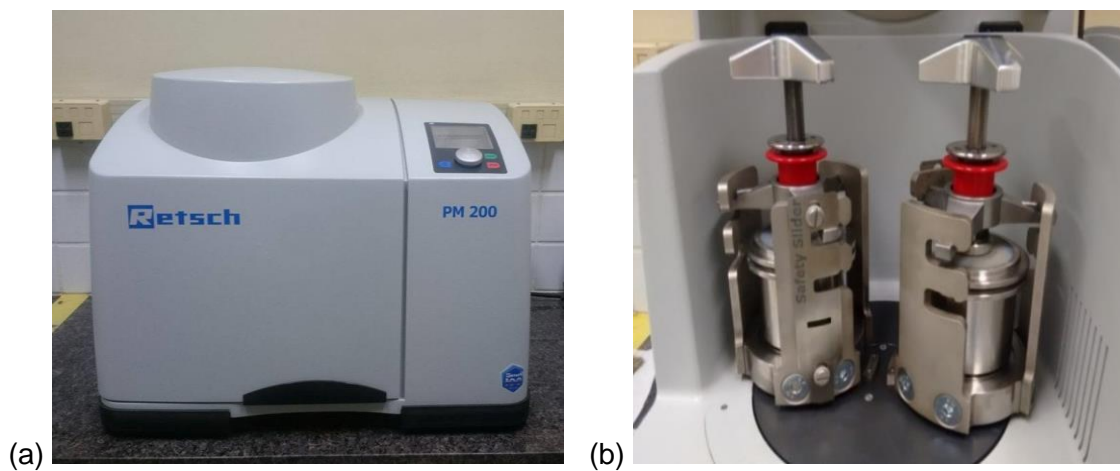
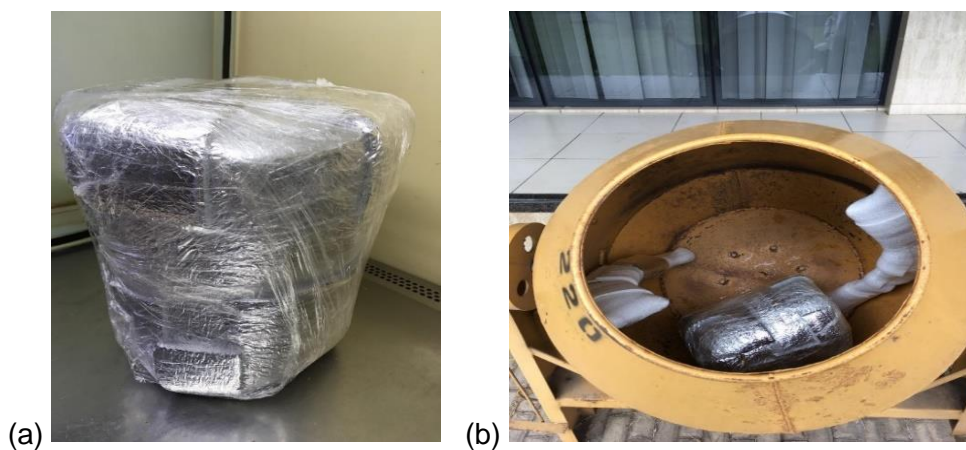


Figura 21 – Moinho utilizado na cominuição do candidato a MRC (a). Sistema de moagem (b).



Fonte: O Autor.

Figura 22 – Recipiente com amostra cominuída (a) e betoneira (b) utilizados para homogeneização da amostra.

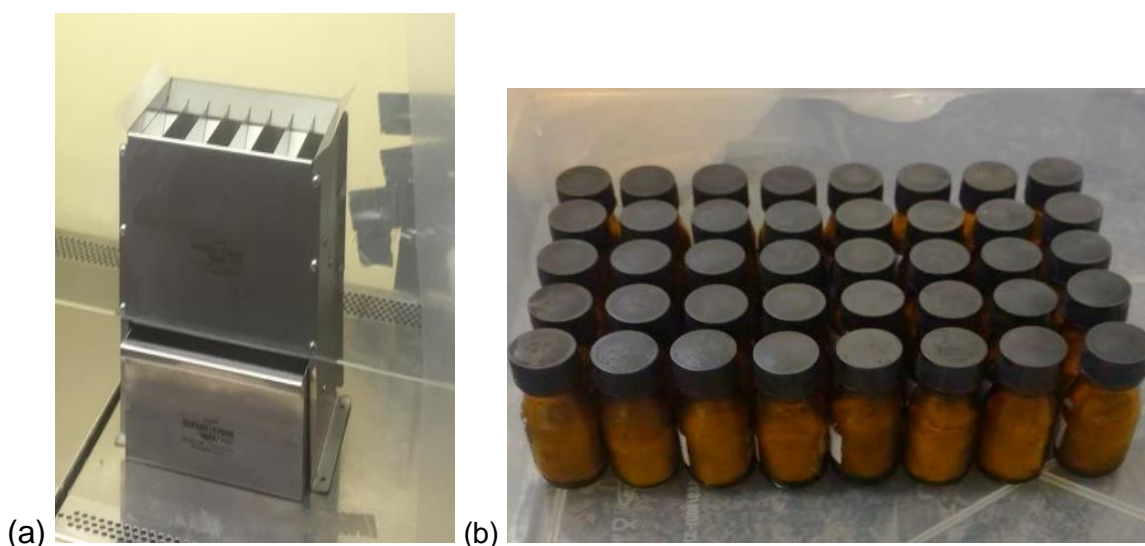


Fonte: O Autor

### 3.1.4. Envase do candidato a material de referência

A amostra do candidato a MRC já homogeneizada foi levada a um quarteador de aço inoxidável (Figura 23a), em que porções de, aproximadamente, 4 g foram distribuídas em 40 frascos que compuseram o lote do candidato a MR (Figura 23b).

Figura 23 – Quarteador de aço inoxidável utilizado no envase do candidato a MR (a) e frascos contendo o candidato a MR – grilo-preto (b).



Fonte: O Autor.

### 3.1.5. Esterilização do lote do candidato a material de referência certificado

A esterilização do lote do candidato a MR foi realizada a partir da irradiação dos frascos preenchidos com o candidato a MR em uma fonte de Co-60 Gammacell 220 Excel-MDS Nordion (Figura 24) na dose de 5 kGy. O equipamento para a irradiação foi gentilmente cedido pelo Departamento de Energia Nuclear na Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

Figura 24 – Irradiador com fonte de  $\text{Co}^{60}$  Gammacell 220 Excel-MDS Nordion.



Fonte: O Autor

### 3.2. Determinação de umidade residual

Para a determinação de umidade do candidato a MR, foi escolhido, de maneira aleatória, o frasco número 15 para esse ensaio, em que porções em triplicata de 500 mg foram pesados em recipientes de alumínio em balança analítica DenverM-220D (precisão de 0,0001 g). Neste estudo, a secagem foi realizada em estufa de circulação forçada à 85°C e em liofilizador (MOREIRA, 2010). A determinação do tempo mínimo de secagem foi feita a partir de sucessivas pesagens até peso constante (diferença entre as pesagens < 10 mg). Para cada pesagem, as amostras foram primeiramente colocadas em dissecador até atingir equilíbrio térmico. Para o cálculo da umidade residual, foi utilizada a Equação 5.

$$\%umidade = \left(1 - \frac{peso_{seco}}{peso_{úmido}}\right) \times 100 \quad (5)$$



### **3.3. Ensaio de Massa Mínima por EDXRF e FAAS**

Esse estudo foi realizado a partir da determinação de Cl, P e S por Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia (EDXRF) e de Cu, Fe, Mn e Zn por Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS). As técnicas analíticas foram escolhidas devido à rapidez e aos baixos custos de execução das análises químicas.

Para EDXRF, foram selecionados, aleatoriamente, 5 frascos do lote esterilizado na Seção 3.1.5 do candidato a MR, em que, para cada frasco, foram amostradas 5 porções-teste de 500 mg e 5 porções analíticas de 20 mg. A análise química está detalhada na Seção 3.6.1.

Semelhantemente, para o estudo de massa mínima por FAAS, 10 frascos diferentes daqueles selecionados para o ensaio anterior por EDXRF foram selecionados. De cada um deles, foram retiradas 5 porções-teste de 500 mg e 150 mg do candidato a MRC para o tratamento químico com ácido nítrico e aquecimento em micro-ondas (Seção 3.6.2). A análise química por FAAS foi realizada de acordo com o procedimento descrito na Seção 3.6.3.

### **3.4. Ensaio de homogeneidade**

A homogeneidade inter-frascos para o candidato a MR foi realizada a partir da determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em um equipamento de FAAS, após o tratamento químico com ácido nítrico e aquecimento em micro-ondas (Seção 3.6.2). Para esse ensaio, 10 frascos provenientes do lote do candidato a MR foram selecionados para a análise de 5 porções analíticas de 500 mg.

### **3.5. Caracterização química do candidato a MR**

Aos resultados dos ensaios de massa mínima por EDXRF e àqueles de homogeneidade por FAAS, foram adicionadas as concentrações de Al, Ca, K, Mg e Na quantificados por Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Acoplado

Indutivamente – ICP-OES (Seção 3.6.4) para a complementação da caracterização química do candidato a RM com relação aos nutrientes. Para isso, foram analisadas as mesmas amostras do ensaio de homogeneidade inter-frascos (Seção 3.4).

### **3.6. Análises Químicas**

Para as análises químicas sobre a produção de candidato a MR, foram utilizadas as técnicas de Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia (EDXRF) e Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS) no Serviço de Monitoração Ambiental (SEAMB) localizado no Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN-NE) e Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES) no Centro de Apoio à Pesquisa (CENAPESQ) na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE – Campus Recife). O material de referência TM01 - *Mussel Tissue* produzido pelo IPEN-CNEN/SP foi utilizado para o controle da qualidade do procedimento analítico.

#### **3.6.1. Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia (EDXRF)**

As amostras do candidato a MR descritas na Seção 3.3 e do MR TM01 foram transferidas para portas-amostras confeccionados em polietileno cobertos por filme de polipropileno específico para a análise por EDXRF. O equipamento utilizado para as análises químicas foi o EDX-720 da Shimadzu Scientific Instruments, INC (Figura 25). Previamente, o equipamento foi calibrado em energia e resolução utilizando o padrão A-750 fornecido pelo fabricante do equipamento, seguindo-se com a verificação da calibração a partir da análise do padrão SUS, também fornecido pela fabricante.

Figura 25 – Equipamento EDX-720 da Shimadzu.



Fonte: O Autor

As curvas analíticas foram ajustadas para melhor quantificação dos analitos estudados, utilizando diversos outros materiais certificados de matrizes biológicas (SOUSA et al., 2013). A Tabela 2 apresenta as condições analíticas utilizadas na determinação dos elementos químicos de interesse (MÉLO, 2014; MAGALHÃES, 2015; SANTOS, 2016).

Tabela 2 - Parâmetros utilizados para a quantificação de elementos químicos no candidato a RM.

Analito	Tensão (kV)	Corrente elétrica ( $\mu\text{A}$ )	Energia do fotopico (keV)	Filtro
Cl	15	1000	2,62	Alumínio
P	15	100	2,01	Nenhum
S	15	100	2,31	Nenhum

Fonte: O Autor.

### 3.6.2. Tratamento Químico do Candidato a MR

As amostras do candidato a MR, brancos analíticos e o material certificado TM01 foram submetidos a um tratamento químico para obtenção de soluções contendo os elementos químicos de interesse. O procedimento adotado consistiu na transferência das porções analíticas da amostra e do material certificado (Seções 3.3 e 3.4) para recipientes de Teflon® próprios para uso em forno digestor.

Posteriormente, foi adicionado 8 mL de ácido nítrico destilado (HNO<sub>3</sub> p.a.) seguido pelo aquecimento em forno micro-ondas Provecto Analítica modelo DGT 100 plus (Figura 26). As condições operacionais do forno foram:

- Procedimento 1: 5 minutos em potência de 300 W;
- Procedimento 2: 10 minutos em potência de 800 W,
- Procedimento 3: 15 minutos em potência de 0 W.

Figura 26 – Forno micro-ondas utilizado na digestão das amostras, brancos e materiais de referência.



Fonte: O Autor

Os tubos contendo as amostras, material de referência e brancos analíticos digeridos foram levados a capela de fluxo laminar até atingir equilíbrio térmico e filtrados em papel filtro quantitativo para remoção de material particulado remanescente. Os volumes finais dessas soluções foram ajustados individualmente para cada massa trabalhada, utilizando uma solução de HNO<sub>3</sub> destilado a 2% para aferição das diluições. Após esse procedimento, as soluções das amostras permaneceram límpidas com baixa turbidez e sem a formação de precipitados. As soluções finais foram encaminhadas para análises por FAAS e ICP-OES.

### 3.6.3. Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS)

As soluções das amostras, do material certificado TM01 e dos brancos analíticos (~1mL) foram analisadas utilizando o equipamento FAAS Varian (Agilent) modelo 220FS. O tempo de injeção das para leitura das amostras foi de 3 segundos e a correção do “background” foi feita utilizando lâmpada de deutério. Os parâmetros operacionais de análise e comprimentos de onda dos elementos químicos de interesse estão apresentados na Tabela 3. As curvas analíticas foram construídas a partir de soluções de referência de alto nível metrológico (1000 mg L<sup>-1</sup>) (Merck®) nas faixas de concentrações pré-estabelecidas. Durante as análises, foi utilizada soluções de referência para a verificação da curva analítica do elemento químico a ser determinado a cada 20 amostras analisadas.

Tabela 3 - Condições analíticas para a determinação de elementos químicos por FAAS.

Analito	Comprimento de onda (nm)	Abertura da janela (nm)	Tipo de chama
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

As frações de massa e incertezas analíticas expandidas em nível de 95% de confiança foram obtidas em planilha Microsoft Excel após os cálculos dos fatores de diluição associado a cada amostra e as respectivas subtrações dos brancos analíticos.

#### 3.6.4. Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES)

As soluções das amostras do candidato a MR, do material certificado TM01 e os brancos analíticos foram também analisados, utilizando o equipamento ICP-OES modelo 5100 (Agilent). Os parâmetros operacionais de análise (Tabela 4) e comprimentos de onda dos elementos químicos determinados estão apresentados na Tabela 5. Como realizado para FAAS, o cálculo das frações de massa e incertezas analíticas expandidas em nível de 95% de confiança foram realizadas utilizando planilha Microsoft Excel.

Tabela 4 - Parâmetros definidos no equipamento ICP-OES para a análise química.

Parâmetros	Especificações
Potência de radiofrequência (kW)	1,2
Vazão do gás auxiliar (L min <sup>-1</sup> )	1,0
Vazão de nebulização do gás (L min <sup>-1</sup> )	0,7
Tempo de Leitura (s)	20
Número de replicatas	5
Nebulizador	Concêntrico
Câmara de nebulização	Ciclônica
Vista de observação do plasma	Axial
Leitura multielementar	Simultânea

Fonte: O Autor

Tabela 5 - Condições analíticas para a quantificação dos elementos químicos por ICP-OES.

Analitos	Comprimento de onda (nm)
Al	237,312
Ca	315,887
K	769,897
Mg	285,213
Na	568,821

Fonte: O Autor.

### 3.7. Qualidade do Procedimento Analítico

Para a avaliação da qualidade do procedimento analítico, foram estimados os erros normalizados (Números  $E_n$ ), contudo, para esse cálculo, foi necessária a estimativa das incertezas analíticas conforme mostra as seções abaixo.

#### 3.7.1. Incerteza Analítica

Devido às diversas etapas na preparação química e a complexidade da determinação das incertezas individuais, optou-se, neste estudo, por estimar as incertezas analíticas como recomendado pelo EURACHEM/CITAC Guide CG (ELLISON, 2012). A estimativa da incerteza analítica dos resultados obtidos pelas diferentes técnicas analíticas foi realizada pela combinação das incertezas individuais relativas à precisão. As incertezas finais combinadas foram expandidas em um nível de confiança de 95% (fator de expansão = 2).

### 3.7.2. Número $E_n$

A qualidade do procedimento experimental para os estudos realizados pelas técnicas EDXRF, FAAS e ICP OES foi determinada pelo cálculo do Número  $E_n$  (Erro Normalizado) obtidos para o material certificado utilizado nas técnicas analíticas EDXRF, FAAS e ICP-OES aplicando-se a Equação 06:

$$E_n = \frac{X_{obs} - X_{ref}}{\sqrt{U_{obs}^2 + U_{ref}^2}} \quad (06)$$

Para este estudo foi utilizado o material certificado TM01 - *Mussel Tissue* (IPEN-CNEN/SP), em que massas de 500 mg e 20 mg foram utilizadas na análise de EDXRF e 300 mg para análise em FAAS.

## 3.8. Análise dos Resultados

### 3.8.1. Índice z

O índice z ou *z-score* foi utilizado para avaliar a precisão dos resultados nos ensaios pela comparando dos valores obtidos individualmente com o valor médio da população. Tal ferramenta estatística mede o afastamento dos valores medidos com o valor de referência em termos de desvios padrão. O cálculo do índice z é realizado conforme a Equação 7.

$$Z = \frac{x_i - \mu}{\sigma} \quad (7)$$

Em que,  $x_i$  consiste nos valores obtidos experimentalmente para as amostras,  $\mu$  é valor médio da população e  $\sigma$  é o desvio padrão para população. Considerando um intervalo de confiança de 95%, os valores de z devem apresentar valores entre -2 a 2, não sendo recomendado ultrapassar um valor de |3|, o qual corresponde a 99% de um intervalo de confiança.



### 3.8.2. Análise de Variância - ANOVA

A Análise de variância (ANOVA) foi utilizada para avaliar se havia diferenças significativas nas concentrações de elementos químicos nos diferentes fracos analisados (ABNT, 2012). Como pré-requisito da ANOVA, a avaliação da normalidade dos resultados e homocedasticidade das variâncias dos resíduos foi realizada por meio do teste de Shapiro-Wilk, em um nível de 95% de confiança, utilizado como ferramenta para atestar que a hipótese nula de que os dados apresentam uma distribuição normal. A aceitação dessa hipótese se deu quando o valor de probabilidade,  $p$  (calculado), foi maior que o valor de significância ( $\alpha = 0,05$ ).

### 3.8.3. Constante de amostragem para Ensaio de Massa Mínima

A determinação da Massa Mínima para o candidato a MRC foi realizado mediante o uso da constante de amostragem,  $K_s$ , proposta por Ingamells (INGAMELLS; SWITZER, 1973; INGAMELLS, 1974). Essa constante é utilizada para estimar uma massa a qual apresente um erro mínimo de 1% relacionando o coeficiente variação com a massa da amostra em consecutivas determinações. Onde a massa mínima do MRC recomendada para uso será a que apresentar menor valor para tal constante.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando a massa inicial de 2 kg de inseto *in natura*, utilizada para a preparação do candidato a RM, obteve-se uma massa final de material de 340 g (eficiência de 17%) com tamanho de partículas menor que 80  $\mu\text{m}$ . Moreira et al. (2018), em seu estudo, partiu de uma amostra de 36 kg e, após um procedimento similar ao utilizado neste trabalho, obteve 2,4 kg de material de referência (eficiência de preparo igual a 6,7%). Vale ressaltar que, embora ambos os animais sejam invertebrados, insetos possuem maior massa seca que moluscos como utilizado pelo autor, o que torna essa matriz factível de produção de material de referência certificado.

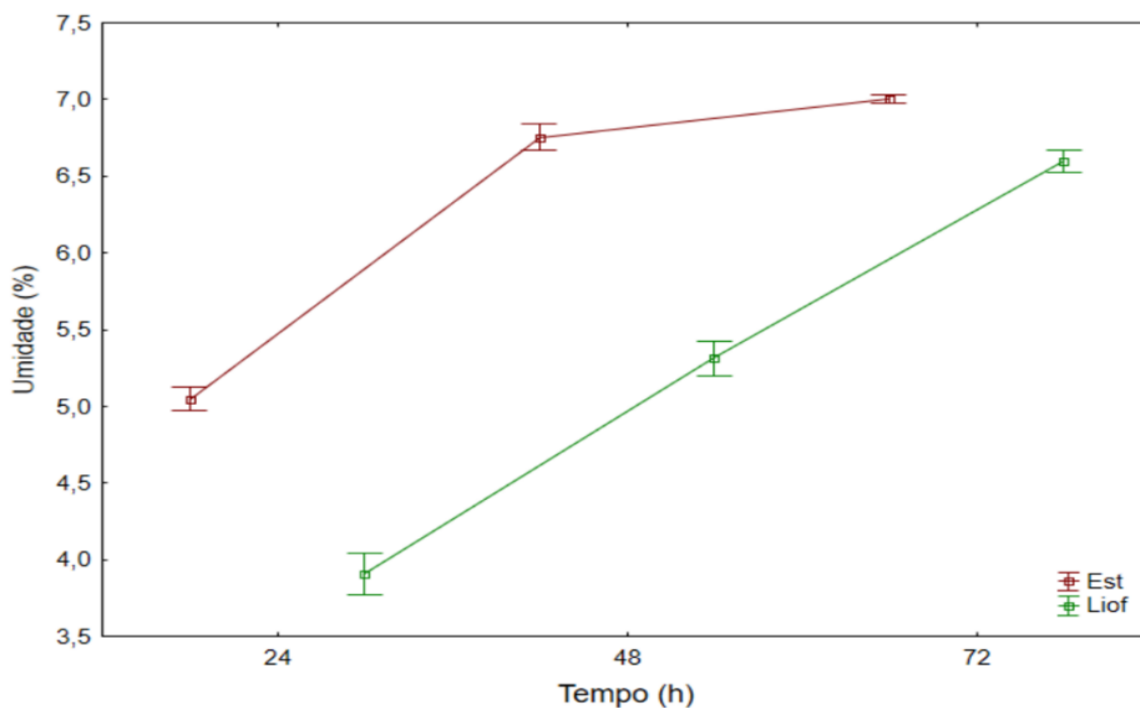
A seguir são apresentados os resultados obtidos quanto à umidade residual, o ensaio de massa mínima e de homogeneidade e a caracterização química prévia dos nutrientes a partir dos resultados de todas as técnicas analíticas empregadas.

### 4.1. Umidade Residual

A determinação de umidade residual para o candidato a MR foi realizada, utilizando métodos de secagem em estufa e em liofilizador, sendo acompanhado o teor de água em tempos de 24, 48 e 72 horas. A Figura 27 traz os valores médios de umidade residual e valores de desvio padrão em função do tempo de secagem. A comparação entre os resultados obtidos possibilitou indicar o melhor método de secagem para o candidato a MR.

Como observado, para o mesmo período, os métodos de secagem apresentaram valores médios de umidade bastante diferentes, em que o método por estufa resultou em maior porcentagem comparada aos resultados em liofilizador. A partir da tendência linear nos resultados de liofilização, acredita-se que o método não conseguiu alcançar a estabilidade, ou seja, deveria ter sido continuado. Contudo, devido à alta demanda de uso do liofilizador, optou-se por encerrar o ensaio, mesmo porque o método da estufa é muito empregado para a quantificação do teor de água residual de materiais de referência.

Figura 27 – Valores médios de umidade residual obtidos pelos diferentes métodos estudados. Barras de erro são referentes ao desvio padrão (n = 3).



Fonte: O Autor.

Uma hipótese para esse fenômeno é a presença de água ligada diretamente a matriz do candidato e que só seja liberada aplicando-se temperaturas mais altas, como a utilizada em estufa (MOREIRA, 2010). Além disso, existe um efeito na estabilização do percentual de umidade em estufa, efeito não observado pelo outro método, indicando a necessidade de um maior tempo (> 72 horas) para determinação de umidade em liofilizador. Pode-se notar, também, que a variação do teor de umidade em liofilizador foi maior quando comparada com método em estufa. Este fato pode ser justificado pela aderência de partículas do candidato aderidas no filme utilizado na embalagem das amostras para liofilização. Baseados nos resultados obtidos foi indicado a utilização da estufa como método de secagem por um período mínimo de 72h.

Segundo dados de literatura a umidade residual recomendada para amostras biológicas deve estar próximo ou inferior a 4,0%, o que reduz a degradação por ação de atividades microbiológicas (FARKAS, 1998 apud MOREIRA, 2010). O percentual de umidade estabelecido pelo método em estufa, 7,0%, está acima do valor

recomendado em literatura, resultado que pode ser explicado pela característica higroscópica de materiais biológicos liofilizados tentem a apresentar (AYROSA, 2007; ALVES, 2007; MARQUES, 2008). Nesse sentido, recomenda-se a determinação de umidade em uma porção independente da amostra no momento de retirada da porção analítica desse material (MOREIRA, 2010).

## 4.2. Estudo da Massa Mínima

Para esse estudo, foram compilados resultados das análises químicas de porções de 10, 150 e 500 mg do candidato a RM, obtidos por EDXRF e FAAS. Também são apresentados os resultados referentes às constantes de amostragem e comparação com a reprodutibilidade analítica.

### 4.2.1. Qualidade do Procedimento Analítico no Estudo da Massa Mínima por EDXRF

A qualidade do procedimento analítico foi avaliada a partir da quantificação de elementos químicos de interesse no material certificado TM01 – *Mussel Tissue* nas mesmas condições experimentais de análise para o candidato a MR. Este parâmetro foi medido em termos de valores de  $E_n$  (Erro normalizado) (PEREIRA, LACERDA E MAINER, 2006; ISO, 2005; INMETRO, 2016). Como a curva analítica utilizada para a determinação por EDXRF envolve diferentes tipos de matrizes, é imprescindível a demonstração da qualidade do procedimento analítico para a matriz invertebrados (MÉLO, 2014; MAGALHÃES, 2015; SANTOS, 2016).

As Tabelas 6 e 7 apresentam os valores obtidos pela análise por EDXRF do material certificado TM1 para ambas as massas utilizadas, assim como a estimativa de incerteza analítica expandida em nível de 95% de confiança e os valores do Número  $E_n$ .

Tabela 6 - Valores obtidos e certificados para o material certificado TM01 e as respectivas incertezas analíticas em nível de 95%. Número  $E_n$  para a porção analítica de 20 mg.

Analito	Valor obtido		Valor certificado		Número $E_n$	n
	(mg kg <sup>-1</sup> )		(mg kg <sup>-1</sup> )			
	Média	Incerteza	Média	Incerteza		
Cl	33600	800	36900	5700	-0,6	3
P	15000	250	15900	2500	-0,3	3
S	18600	600	21900	5400	-0,6	3

$E_n$  = Erro normalizado; n = número de repetições

Fonte: O Autor.

Tabela 7 - Valores obtidos e certificados para o material certificado TM01 e as respectivas incertezas analíticas em nível de 95%. Número  $E_n$  para a porção analítica de 500 mg.

Analitos	Valor obtido		Valor certificado		Número $E_n$	n
	(mg kg <sup>-1</sup> )		(mg kg <sup>-1</sup> )			
	Média	Incerteza	Média	Incerteza		
Cl	33100	500	36900	5700	-0,67	3
P	15900	250	15900	2500	0,01	3
S	19700	600	21900	5400	-0,40	3

Número  $E_n$  = Erro normalizado; n = número de repetições

Fonte: O Autor.

A partir dos valores de Número  $E_n$  obtidos para o material certificado analisado, foi possível inferir que, para os elementos químicos, o procedimento analítico mostrou-se confiável, pois os valores mantiveram-se dentro do intervalo de -1 a 1. Os resultados obtidos por EDXRF apresentaram valores de concentração menores que os resultados do material certificado para os elementos químicos quantificados. Contudo, resultaram em valores de incertezas menores em comparação com os valores certificados.

## 4.2.2. Resultados obtidos por EDXRF

A Tabela 8 apresenta os valores da constante de amostragem,  $K_s$ , para as massas utilizadas do candidato a MR, bem como valores médios das concentrações, valor do  $K_s^{(0,5)}$  referente à massa necessária para que o coeficiente de variação seja 1% e o coeficiente de variação esperado para a análise de toda a massa do frasco ( $R_{(4\text{ g})}$ ) obtidos para cloro, enxofre e fósforo.

Tabela 8 - Parâmetros avaliados para o ensaio de massa mínima para Cl, P e S (n = 25).

<b>Cloro</b>		
<b>Parâmetro</b>	<b>Massa de 20 mg</b>	<b>Massa de 500 mg</b>
Média (mg.kg <sup>-1</sup> )	5152	5197
$K_s$ (g)	0,91	7,5
$K_s^{(0,5)}$ (%)	0,95	2,7
$R_{(4\text{ g})}$ (%)	0,48	1,4
<b>Fósforo</b>		
<b>Parâmetro</b>	<b>Massa de 20 mg</b>	<b>Massa de 500 mg</b>
Média (mg.kg <sup>-1</sup> )	8085	9364
$K_s$ (g)	0,29	2,5
$K_s^{(0,5)}$ (%)	0,54	1,6
$R_{(4\text{ g})}$ (%)	0,27	0,8
<b>Enxofre</b>		
<b>Parâmetro</b>	<b>Massa de 20 mg</b>	<b>Massa de 500 mg</b>
Média (mg.kg <sup>-1</sup> )	5549	6561
$K_s$ (g)	0,55	2,0
$K_s^{(0,5)}$ (%)	0,74	1,4
$R_{(4\text{ g})}$ (%)	0,37	0,7

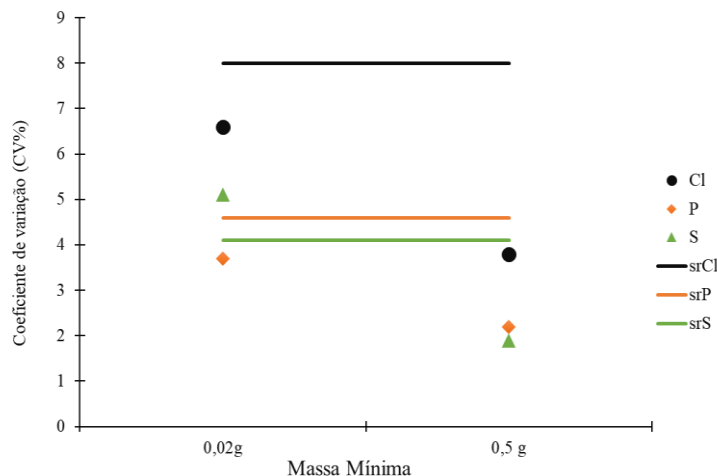
$K_s$  = constante de amostragem;  $K_s^{(0,5)}$  = coeficiente de variação para a análise de 1 g de amostra;  $R_{(4\text{ g})}$  (%) = coeficiente de variação esperado para análise de todo o frasco.

Fonte: O Autor.

Os resultados estatísticos referentes a constante de amostragem foram melhores para a massa de 20 mg, que apresentou valores de 0,91, 0,29 e 0,55 para elementos Cl, P e S respectivamente. O mesmo comportamento foi visto para os resultados de  $K_s^{(0,5)}$ , indicando que a menor massa foi recomendada para a análise do candidato por esta técnica analítica.

A Figura 28 representa uma outra forma de avaliar a massa mínima de candidatos a MR a partir da comparação entre o coeficiente de variação (CV), obtido na análise para uma determinada massa, com desvio padrão da repetitividade do método analítico -  $s_r$  (ISO, 2005; SCHARF, 2010; LINSINGER, 2001; CARDOSO, 2010), em que, um valor de CV menor ou igual a  $s_r$  indica a massa a qual terá informações válidas para a certificação (MOREIRA, 2010; ABNT, 2012a).

Figura 28 – Comparação entre os valores obtidos de coeficiente de variação e repetitividade do método analítico para os elementos Cl, P e S.



Fonte: O Autor.

A partir dos resultados da Figura 28, a massa de 500 mg apresentou valores do coeficiente de variação menores que a repetitividade quando comparada com a massa de 20 mg para cloro e enxofre. Para fósforo, ambas as massas apresentaram  $CV < s_r$ . Com isso, a menor massa não poderia ser utilizada para a certificação do candidato a MR como indicado pela constante de amostragem.

Essa diferença entre os resultados de  $K_s$  quando comparados com os valores de CV vs.  $S_r$  pode estar relacionada com as características do método analítico associados a efeitos de matriz do material analisado. A técnica EDXRF apresenta com principal vantagem a não precedência de tratamento químico em comparação a outras técnicas. Entretanto, efeitos de matriz, como espalhamento da radiação ou formação de radiações secundárias, podem interferir na análise causando variações indesejadas nos resultados. Tais inconvenientes são atenuados pela utilização de menores quantidades de material a ser analisado, resultando a formação de um 'filme fino' de amostra reduzindo tal efeito, o que pode justificar melhores resultados para massa de 20 mg como indicado pelos valores de  $K_s$  da Tabela 08 (TERTIAN, 1982; SIMABUCO, 1993; BICHINO, 2008; SKOOG, 2009; FONSECA, 2017).

#### 4.2.3. Qualidade do Procedimento Analítico no Estudo da Massa Mínima por FAAS

Como realizado para técnica EDXRF, o número  $E_n$  foi utilizado para atestar a qualidade do procedimento analítico adotado nas análises por FAAS. A Tabela 9 traz os resultados obtidos pela análise do material certificado TM01 para a porção analítica de 300 mg (massa recomendada pelo produtor), o qual foi submetido a tratamento químico descrito anteriormente.

Tabela 9 - Valores obtidos e certificados para o RM TM01 e as respectivas incertezas analíticas em nível de 95%, assim como os valores de Número  $E_n$ .

Analitos	Valor obtido (mg kg <sup>-1</sup> )		Valor certificado (mg kg <sup>-1</sup> )		Número $E_n$	n
	Média	Incerteza	Média	Incerteza		
Cu	12,5	2,4	11,3	1,7	0,4	6
Fe	595	82	593	53	-0,0	8
Mn	23,3	1,2	22,7	3,7	-0,0	8
Zn	121,4	14,6	118,5	9,5	-0,0	7

Número  $E_n$  = Erro normalizado; n = número de repetições.

Fonte: O Autor.



Os valores de Número  $E_n$ , para os analitos estudados, ficaram dentro do intervalo de -1 a 1, conforme recomendado por guias de acreditação e controle de qualidade de métodos analíticos (INMETRO, 2016; ELLISON, 2002). Como visto, os resultados obtidos experimentalmente mediante uso da técnica FAAS para o RM TM1 foram muito próximos aos valores certificados, bem como, para maioria de elementos químicos determinados, produziu incertezas de menor magnitude.

Considerando a importância do conhecimento da composição nutricional na avaliação de um candidato a MR, a metodologia aplicada produziu resultados satisfatórios mesmo levando em conta as limitações dos tipos de técnicas analíticas selecionadas quando comparadas a outros métodos de análise como Espectrometria de Massas, por exemplo, ao número de repetições e ao uso de um menor número de instrumentos de medição que são utilizados na certificação de um material de referência como aqueles produzidos pelo *National Institute of Standards and Technology* - NIST (MOREIRA, 2010; SOUSA ., 2013; SKOOG, 2009).

#### 4.2.4. Estudo da Massa Mínima por Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS)

Os dados estatísticos referentes a constante de amostragem  $K_s$  para as massas utilizadas do candidato a MR estão mostrados na Tabela 10, bem como os valores médios das concentrações, o valor do  $K_s^{(0,5)}$  referente ao coeficiente de variação na análise de 1 g de amostra e o coeficiente de variação esperado para análise de toda a massa do frasco (4 g) para Cu, Fe, Mn e Zn.

Os valores referentes a  $K_s$  para Cu, Fe, Mn e Zn foram menores para a massa de 300 mg. Comparando-se os valores de  $K_s^{(0,5)}$  para os analitos em questão, Cu e Fe apresentaram diferenças significativas de seus valores para as massas analisadas, indicando que, preferivelmente para esses dois elementos químicos, a massa de 500 mg é a recomendada para a certificação do candidato a material de referência.

Tabela 10 - Parâmetros empregados na avaliação do ensaio de massa mínima para Cu, Fe, Mn e Zn (n = 25).

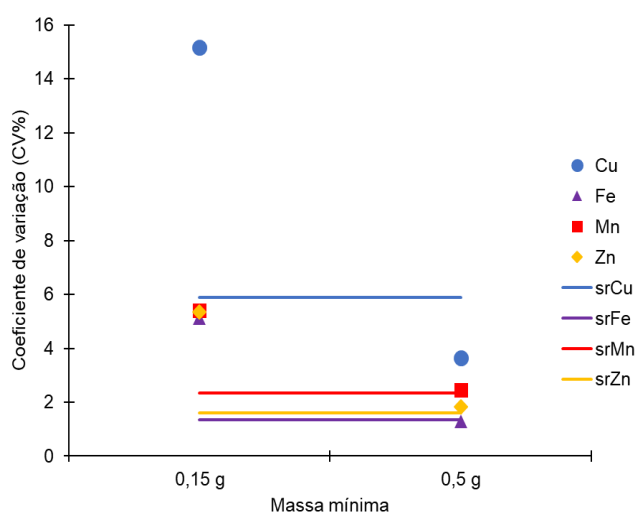
<b>Cu</b>		
<b>Parâmetro</b>	<b>Massa de 150 mg</b>	<b>Massa de 500 mg</b>
Média (mg.kg <sup>-1</sup> )	23,86	24,95
K <sub>s</sub> (g)	36,1	6,9
K <sub>s</sub> <sup>(0,5)</sup> (%)	6,0	2,6
R <sub>(4 g)</sub> (%)	3,0	1,3
<b>Fe</b>		
<b>Parâmetro</b>	<b>Massa de 150 mg</b>	<b>Massa de 500 mg</b>
Média (mg.kg <sup>-1</sup> )	98,40	92,40
K <sub>s</sub> (g)	4,1	0,89
K <sub>s</sub> <sup>(0,5)</sup> (%)	2,0	0,94
R <sub>(4 g)</sub> (%)	1,0	0,47
<b>Mn</b>		
<b>Parâmetro</b>	<b>Massa de 150 mg</b>	<b>Massa de 500 mg</b>
Média (mg.kg <sup>-1</sup> )	40,63	39,58
K <sub>s</sub> (g)	4,6	3,1
K <sub>s</sub> <sup>(0,5)</sup> (%)	2,1	1,8
R <sub>(4 g)</sub> (%)	1,1	0,9
<b>Zn</b>		
<b>Parâmetro</b>	<b>Massa de 150mg</b>	<b>Massa de 500mg</b>
Média (mg.kg <sup>-1</sup> )	157,7	153,5
K <sub>s</sub> (g)	4,5	1,7
K <sub>s</sub> <sup>(0,5)</sup> (%)	2,1	1,3
R <sub>(4 g)</sub> (%)	1,1	0,7

K<sub>s</sub> = constante de amostragem; K<sub>s</sub><sup>(0,5)</sup> = coeficiente de variação para a análise de 1 g de amostra;  
R<sub>(4 g)</sub> (%) = coeficiente de variação esperado para análise de todo o frasco.

Fonte: O Autor.

Como realizado para o Ensaio de Massa Mínima por EDXRF, os valores do coeficiente de variação (CV) e sr obtidos para as massas de 150 mg e 500 mg do candidato a MR foram comparados na Figura 29.

Figura 29 - Comparação entre os valores obtidos de coeficiente de variação e repetitividade do método analítico para os elementos Cu, Fe, Mn e Zn.



Fonte: O Autor.

De acordo com os resultados da Figura 29, os valores de CV foram bastante distintos para a massa de 150 mg, principalmente para Cu, cujo valor alcançou 15%. Para todos os elementos químicos, os CVs obtidos para a massa de 150 mg foram muito maiores que os respectivos valores da repetitividade do método analítico. Com relação aos resultados da massa de 500 mg, os valores de CVs estiveram na mesma ordem de grandeza ou inferiores às respectivas repetitividades (sr). Esse resultado é compatível com as massas utilizadas em rotinas de análises que empregam porções analíticas maiores que 200 mg em métodos clássico e instrumentais de análise (CASTRO, 2017).

Como os valores dos coeficientes de variação para Fe, Mn e Zn estimados para 500 mg estiveram próximos ou pouco acima do valor sr, esses resultados indicaram que, para tais elementos químicos, massas entre 150 mg e 500 mg poderiam apresentar valores de CV menores que sr. Tal fato pôde ser corroborado pela

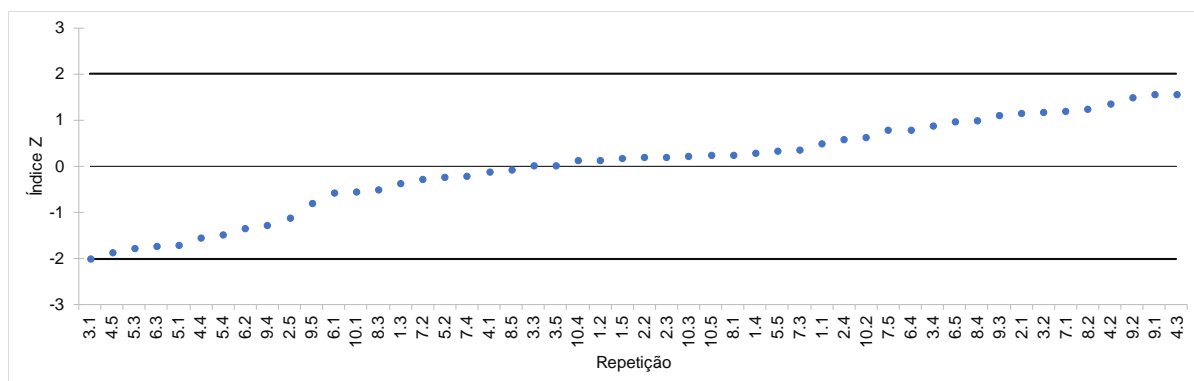
proximidade dos valores de  $K_s^{(0,5)}$  para Mn entre as duas massas analisadas (Tabela 9), indicando que um novo estudo de diferentes porções analíticas dentro dessa faixa de massas poderia ser realizado. Muitos dos materiais de referência certificados pelo NIST empregam massas na ordem de 200 mg conforme os certificados de materiais de referência de matrizes biológicas comercializados como NIST1570A-Spinach Leaves; NIST1575A-Trace Elements in Pine Needles; NIST1566b-Oyster Tissues; IAEAV8- Trace Elements in Rye Flour (SOUSA, 2013; NIST, 2019).

### 4.3. Ensaio da Homogeneidade

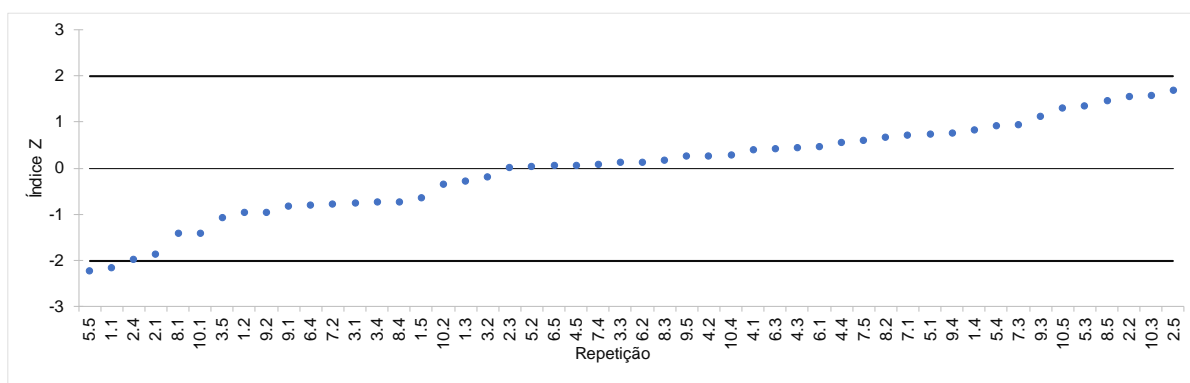
Para o estudo de homogeneidade para o candidato a RM, foram realizadas 5 repetições para cada frasco analisado (número de frasco = 10). Por isso, a precisão dos resultados foi avaliada a partir do índice z (z-scores) para cada repetição, no qual, para um intervalo de confiança de 95% os valores do z-score deveriam estar compreendidos entre -2 a 2, não recomendado ultrapassar valores  $|z|$  (INMETRO, 2016). Tomando-se o valor médio da população das medidas como referência, é possível inferir quais dados dentro do conjunto de repetições apresentaram resultados que poderiam comprometer as análises estatísticas conforme mostra a Figura 30 para os índices z de Cu, Fe, Mn e Zn.

Como observado na Figura 30, algumas repetições apresentaram valores do índice z acima/abaixo do intervalo recomendado de -2 a 2 como aconteceu para Fe (repetições 5.5 e 1.1) e Mn (repetição 10.2). Contudo, esses resultados foram encontrados em poucos números para o número total de repetições analisadas. Não foram detectadas tendências para as repetições de um mesmo frasco, indicando aleatoriedade das observações. Além disso, não houve a necessidade da remoção desses dados para os cálculos estatísticos empregados na avaliação da homogeneidade. Vale ressaltar que a homogeneidade da maior parte dos materiais de referência certificados pelo NIST é realizada por método não destrutivo como a Análise por Ativação Neutrônica Instrumental – INAA. Neste estudo, mesmo com o tratamento químico com ácido, observou-se elevado nível metrológico com relação à precisão da análise por FAAS.

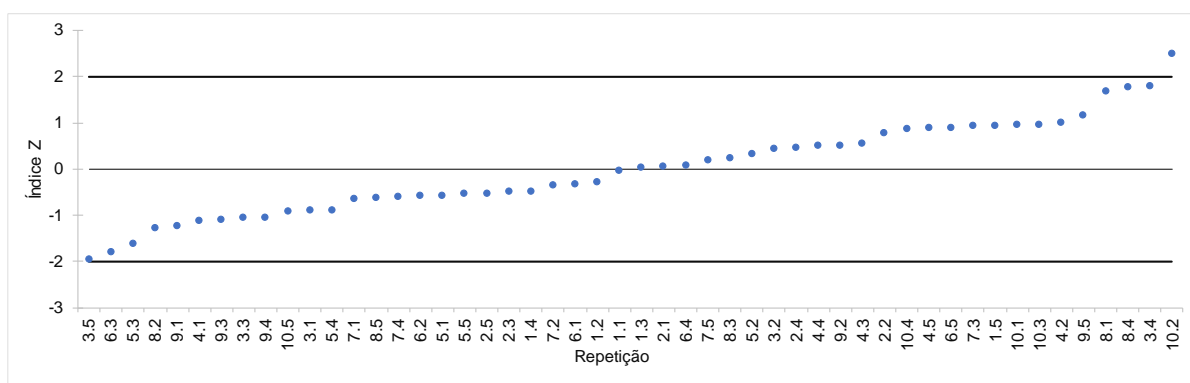
Figura 30 – Valores de índices z obtidos para cobre (A), ferro (B), manganês (C) e zinco (D).



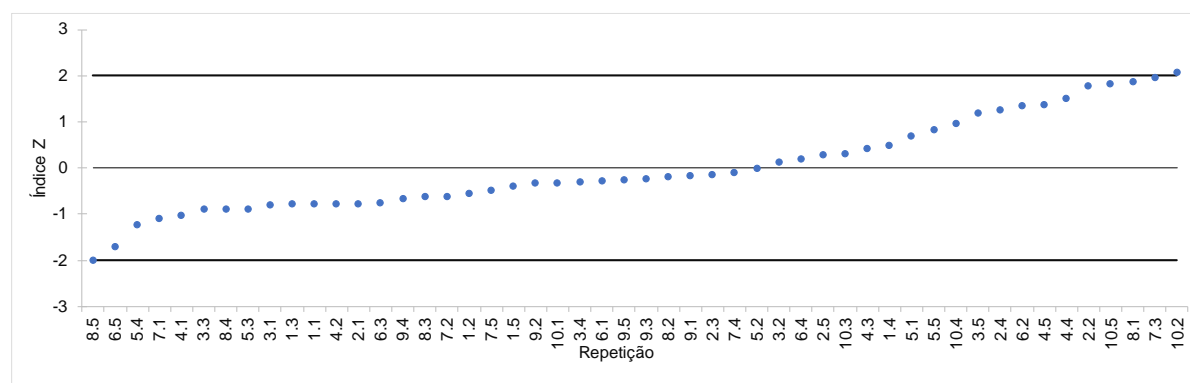
A



B



C

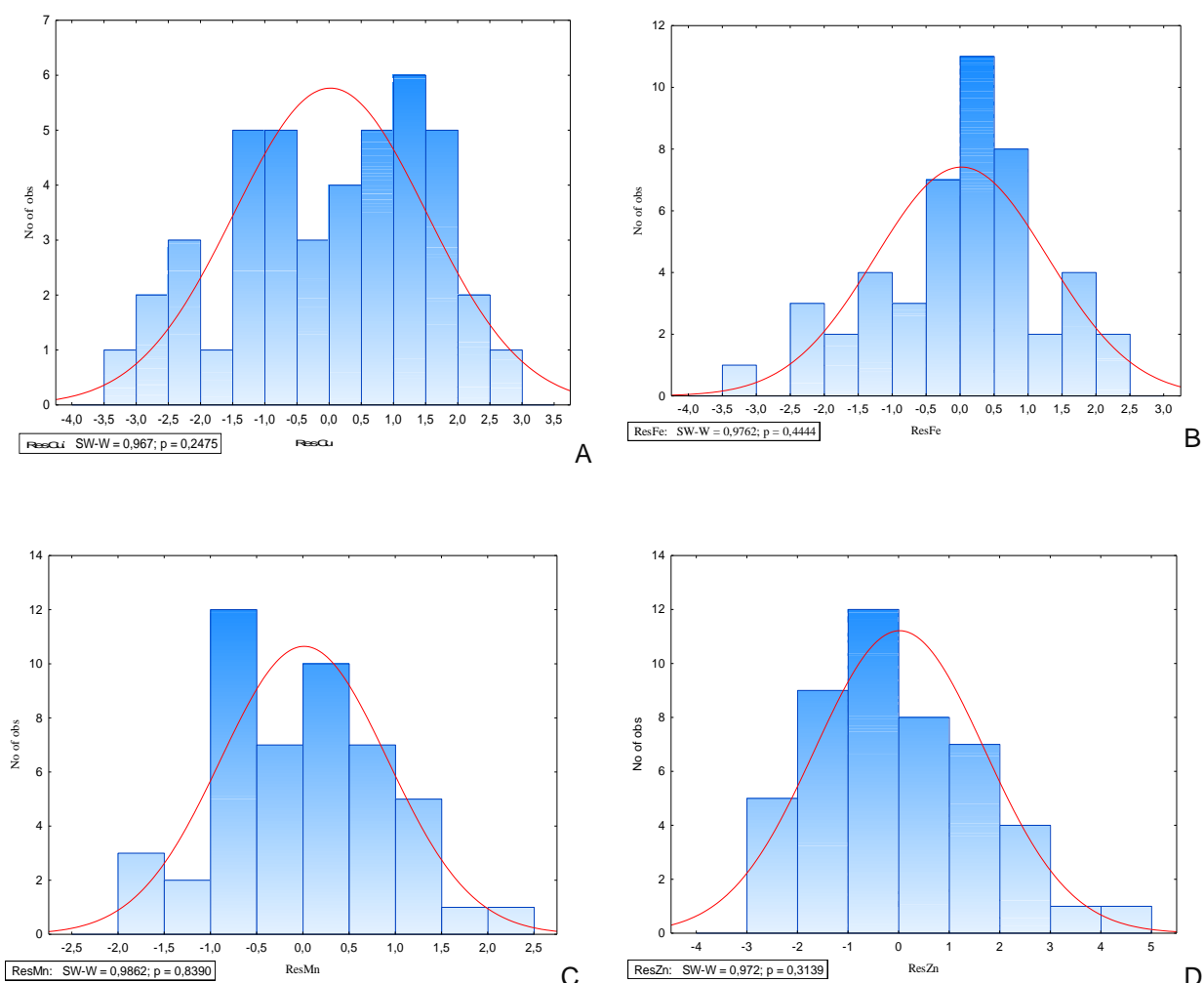


D

Fonte: O Autor.

Após a confirmação da repetitividade analítica, a análise de variância (ANOVA) foi realizada considerando-se a aceitação ou a rejeição da hipótese nula ( $H_0$ ) de que não exista diferença significativa entre os valores de concentração dos analitos nos frascos seleccionados (homogeneidade inter-frascos). Primeiramente, foi avaliada a normalidade dos resíduos pela construção de histogramas (Figura 31) e uso do teste de Shapiro-Wilk (em um intervalo de confiança de 95%) para atestar tal condição.

Figura 31 – Histograma de resíduos para cobre (A), ferro (B), manganês (C) e zinco (D).



Fonte: O Autor.

É importante que o histograma de resíduos apresente distribuição dos dados em formato de sino e que o valor p do teste de normalidade seja maior que o valor de  $\alpha$  (0,05) (BINGHAM, FRY, 2010) como pode ser observado na Figura 31, em que os histogramas apresentaram uma distribuição aproximada à normalidade. Este fato pode ser corroborado pelos p-valores do teste Shapiro-Wilk: 0,2475 para Cu, 0,444 de Fe, 0,8390 para Mn e 0,3139 para Zn com valores maiores que o nível de significância de 0,05 (Figura 31).

A Tabela 11 são apresentados os resultados do p-valor obtido de acordo com a ANOVA para os elementos químicos determinados no candidato a RM, em que valores de probabilidade apresentaram valor maiores que 0,05. Isto indica que não houve diferenças significativas entre os valores de médias de concentração entre os frascos, demonstrando a existência de homogeneidade para o candidato a RM.

Tabela 11 - Resultados de ANOVA para os elementos Cu, Fe, Mn e Zn obtidas para o candidato a MR.

Analito	Média	Desvio-padrão	CV (%)	p-valor
	(mg kg <sup>-1</sup> )			
Cu	25,3	1,62	6,42	0,69
Fe	93,5	1,31	1,42	0,90
Mn	38,6	1,01	2,62	0,55
Zn	156	1,86	1,19	0,64

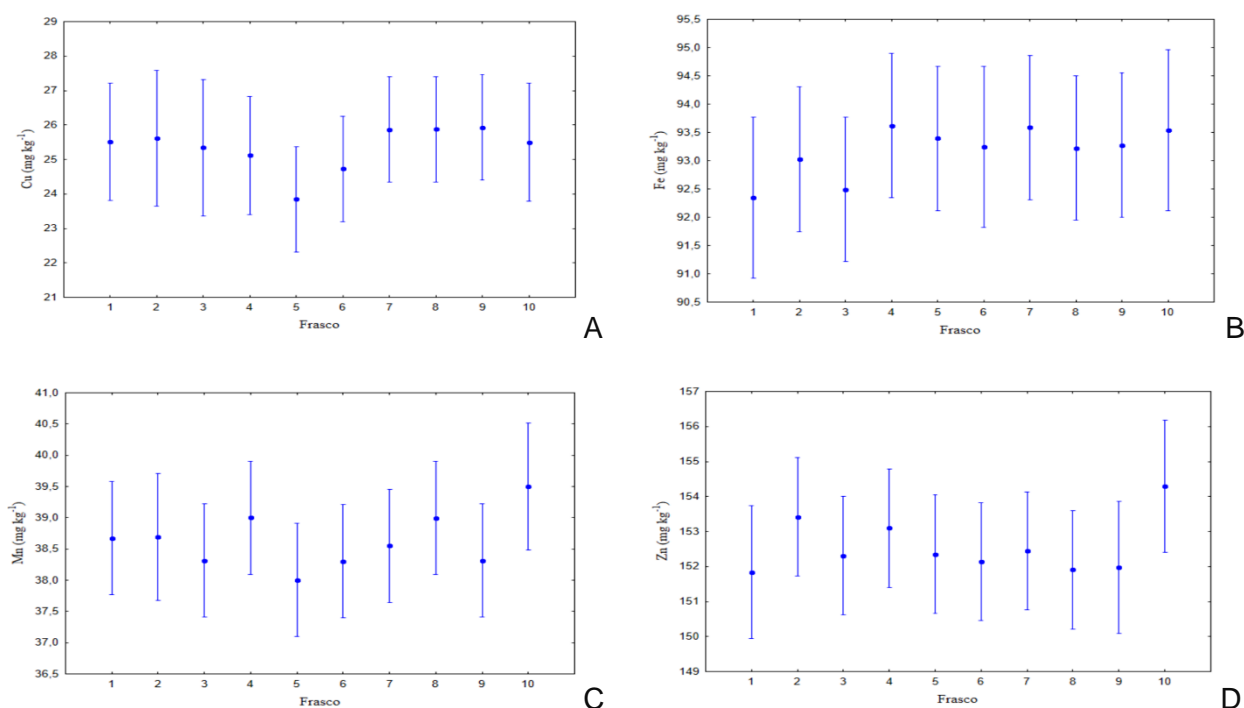
CV = Coeficiente de variação.

Fonte: O Autor.

A Figura 32 apresenta a comparação múltipla entre as médias das concentrações dos elementos químicos para os diferentes frascos utilizados no estudo. Com base nos resultados apresentados, foi demonstrado que, de fato, os frascos não apresentaram diferenças entre si quanto à concentração dos analitos em questão. Mesmo com uma uniformidade na distribuição entre as médias dos recipientes, cobre teve a maior diferença entre as médias dos frascos 9 e 5,

perfazendo quase 8%, efeito que não foi tão sistemático para os demais elementos químicos. Com isso, pode-se levantar uma hipótese de que para Fe, Mn e Zn possa apresentar, também, homogeneidade em uma massa menor que 500 mg, observação já sugerida no estudo da Massa Mínima.

Figura 32 – Teste de comparações múltiplas (*LS Means*) para os resultados de Cu, Fe, Mn e Zn.



Fonte: O Autor

#### 4.4. Caracterização Química do Candidato a Material de Referência

A caracterização dos nutrientes do candidato a material de referência foi complementada mediante a análise de diferentes porções analíticas por Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia (EDXRF) e Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES). Para assegurar a precisão dos resultados, foi também utilizado o índice z para comparar as diferentes repetições das amostras de cada frasco analisado.

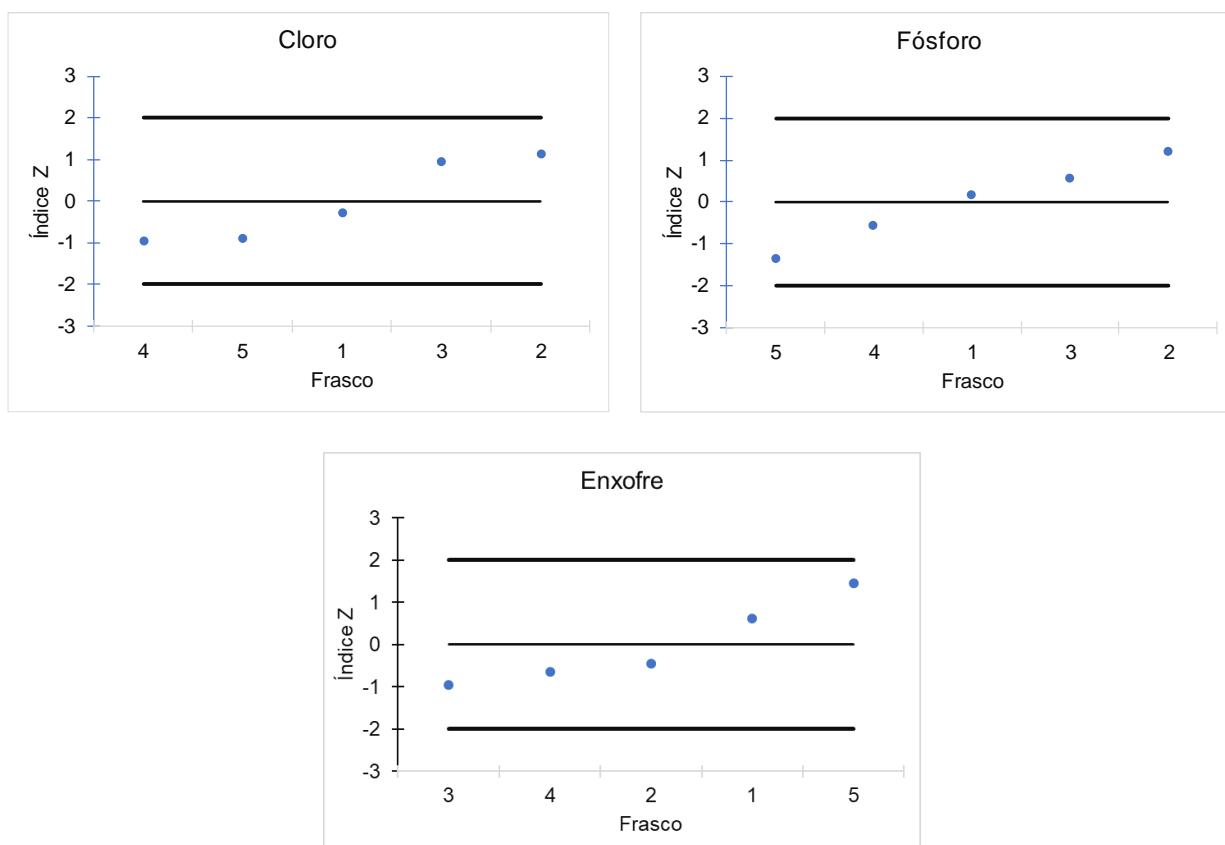


#### 4.4.1. Caracterização Química por EDXRF

A técnica de EDXRF foi utilizada para determinar as concentrações para os elementos Cloro (Cl), Fósforo (P) e Enxofre (S). Como realizado no estudo de Homogeneidade, a precisão foi avaliada em função do índice z para averiguar se as repetições apresentaram valores anômalos que poderiam prejudicar a quantificação dos elementos químicos.

A quantificação química foi realizada utilizando 5 frascos provenientes do lote do MR, dos quais foram retirados 5 porções de 500 mg de amostra. A Figura 33 apresenta os valores de índice z para as médias obtidas para cada frasco analisado, bem como, a Tabela 12 traz os valores médios máximos e mínimos das concentrações dos analitos selecionados, coeficiente de variação calculados e incerteza expandida ( $k = 2$ ).

Figura 33 – Valores do índice z obtidos para Cl, P e S nos frascos analisados por EDXRF.



Fonte: O Autor.

Tabela 12 - Concentração média dos elementos Cl, P e S para amostras de 500mg analisadas por EDXRF. n = 5.

Analitos	Média	Max	Min	CV (%)	U (%)
	(mg kg <sup>-1</sup> )				
Cl	5200	5730	4650	4,0	4,0
P	6360	9690	7280	2,0	2,0
S	6560	6750	4460	2,0	9,0

CV = Coeficiente de variação; U = Incerteza expandida.

Fonte: O Autor

Como pode-se observar os valores dos z-scores, estiveram dentro do intervalo de -2 a 2, sendo assim, indicando que todas as médias poderiam ser utilizadas para a estimativa da média populacional das concentrações de Cl, P e S. Os resultados expostos na Tabela 12 apresentam valores médios de 5200 mg kg<sup>-1</sup> para cloro, 6360 mg kg<sup>-1</sup> para fósforo e 6560 mg kg<sup>-1</sup> para enxofre, cujos valores estiveram em concordância com aqueles obtidos por Santos (2016) utilizando insetos para estudos de avaliação de qualidade ambiental em ambientes urbanos da Região Metropolitana de Recife.

Tais elementos químicos estão associados a funções estruturais nos organismos e podem ser encontrados em altas concentrações em sistemas biológicos, tais como insetos e outros invertebrados (CHAPMAN, 2012; NATION, 2001; MAGALHÃES, 2015). Mais ainda, as incertezas e coeficientes de variação estimados apresentaram valores em conformidade com dados de estudos de Santos (2016) e Magalhães (2015), que utilizaram a mesma técnica em estudo de insetos e outros invertebrados.

#### 4.4.2. Caracterização Química por ICP OES

A técnica de ICP-OES foi utilizada para determinar os níveis de concentração de outros elementos químicos constituintes do candidato a MR a partir da quantificação das amostras utilizadas para o ensaio de homogeneidade. Do mesmo modo que as técnicas anteriormente citadas, foi avaliada a precisão dos resultados individuais dos frascos por meio do índice z, como mostra a Figura 34. A qualidade do procedimento analítico para a determinação dos elementos químicos por ICP-OES encontra-se no Apêndice A.

Como observado, os frascos analisados apresentaram z-scores com valores entre -2 a 2, com algumas repetições estando um pouco acima ou abaixo desse intervalo recomendado em literatura (INMETRO, 2016). Contudo, como já mencionado nas seções anteriores, amostras que apresentaram valores dentro do intervalo de  $|3|$  não necessitaram ser eliminadas para a estimativa das concentrações médias da Tabela 13.

Figura 34 – Índice z para Al, Ca, K, Mg e Na.

(continua)

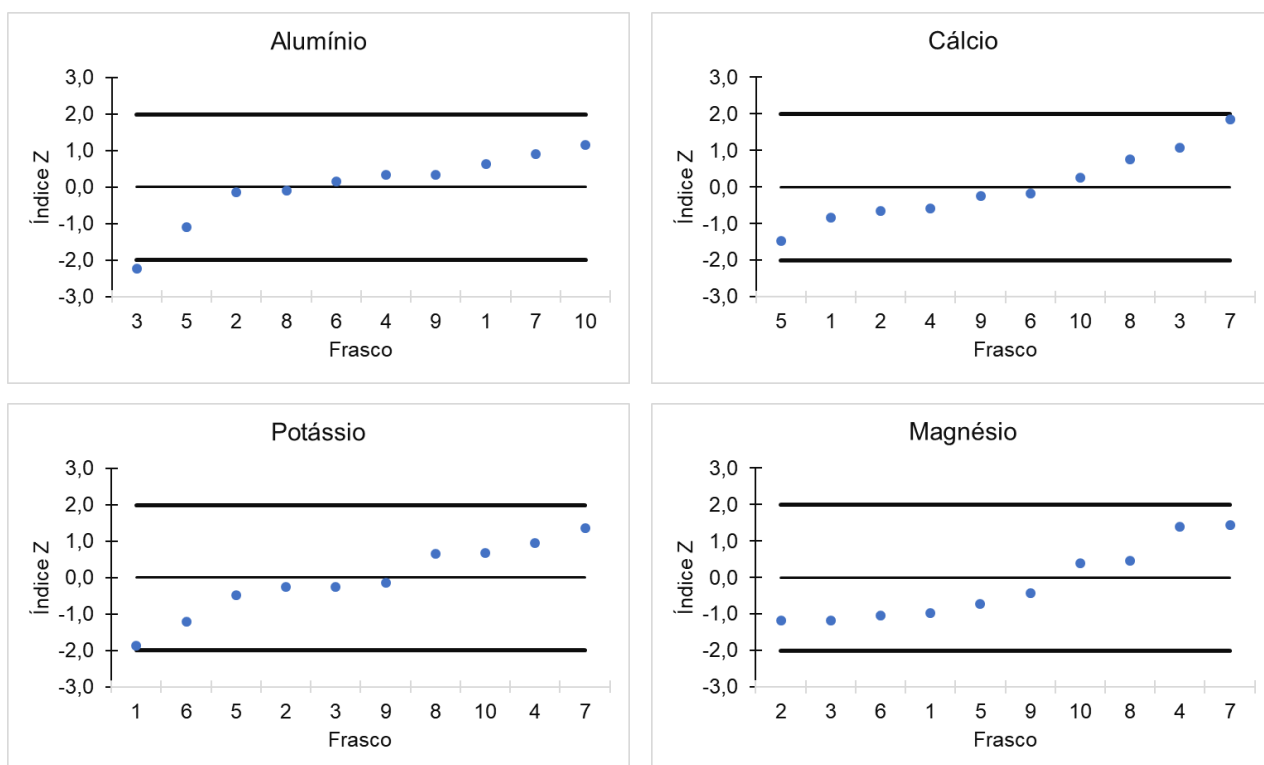
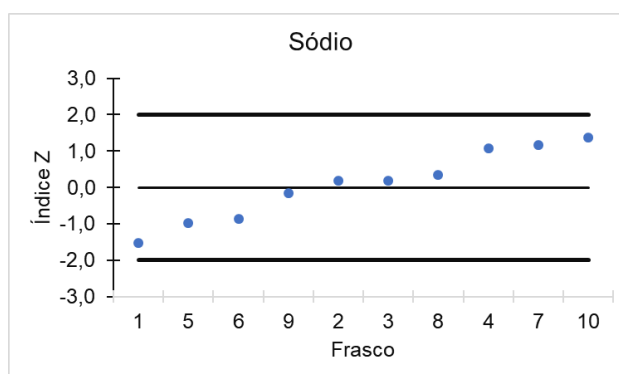


Figura 34 – Índice z para Al, Ca, K, Mg e Na (continuação)



Fonte: O Autor.

Tabela 13 - Concentração média dos elementos químicos por ICP-OES (n = 10).

Analito	Média	Max	Min	CV (%)	U (%)
	(mg kg <sup>-1</sup> )				
Al	128	154	104	8,4	11,9
Ca	982	1100	894	4,4	10,6
K	7870	8300	7170	3,0	6,1
Mg	995	1060	901	4,0	6,4
Na	2977	3190	2800	3,1	9,6

CV = Coeficiente de variação; U = Incerteza expandida.

Fonte: O Autor.

Como o conhecimento da composição química elementar do candidato a MR tem bastante relevância, tendo em vista o potencial de uso em diversos estudos, pela utilização da técnica por ICP-OES, foram disponibilizados os resultados de Alumínio (Al), Cálcio (Ca), Potássio (K), Magnésio (Mg) e Sódio (Na). Esses nutrientes estão associados a diversas funções biológicas, por exemplo, estrutura, produção de clorofila e papel eletrolítico (MAGALHÃES, 2015; CHAPMAN, 2012), além de estarem relacionados a qualidade e características do ambiente ao qual o inseto está inserido.

Como observado, além da diversidade de componentes encontrados no candidato, nota-se que os elementos químicos estão distribuídos em diferentes concentrações na amostra. Esse fato se deve, principalmente, à biodisponibilidade e à distribuição desses elementos químicos no organismo do animal (CHAPMAN, 2012; NATION, 2001; COHEN, 2003). Os elementos Ca e Mg apresentaram concentrações

médias de 982 mg kg<sup>-1</sup> e 995 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Na literatura, tais nutrientes são reportados em grandes quantidades, assim como ocorre para fósforo (6360 mg kg<sup>-1</sup>) e enxofre (6560 mg kg<sup>-1</sup>) em diversos organismos (MAGALHÃES, 2015; SANTOS, 2016).

Sódio e potássio foram quantificados em altas concentrações, 7870 mg kg<sup>-1</sup> (K) e 2977 mg kg<sup>-1</sup> (Na), em que estes elementos químicos estão associados à regulação osmótica das células, auxiliando o transporte de substância do meio externo para intracelular (MAGALHÃES, 2015). Elementos químicos como Cu, Mn, Fe e Zn são relatados como cofatores enzimáticos<sup>5</sup>, micronutrientes que foram encontrados em menores quantidades – 25,3 mg kg<sup>-1</sup>, 38,6 mg kg<sup>-1</sup>, 93,5 mg kg<sup>-1</sup> e 156 mg kg<sup>-1</sup> (seção 4.3), respectivamente (CHAPMAN, 2012; NATION, 2001; COHEN, 2003). Para alumínio, sua presença pode ser associada a matrizes inorgânicas do solo que possivelmente foi incorporada ao inseto com seu alimento (LYRA, 2016; SILVA, 2018; PICOLOTO, 2011).

Do ponto de vista analítico, é importante notar que os coeficientes de variação determinados para os analitos apresentaram valores entre 3,0% e 8,4%, resultados condizentes com os valores recomendados em literatura (LANAGRO, 2015; BRANDÃO, 2013; BRITO, 2003; WOOD, 1999). Além disso, as incertezas expandidas estimadas para a quantificação dos elementos químicos variaram entre 5,1% e 17%, valores aproximados aos obtidos por Moreira (2018), que realizou a certificação do material de referência TM01 Tecido de Mexilhão.

---

<sup>5</sup> Cofator Enzimático: Moléculas orgânicas (Coenzimas) ou íons (geralmente íons metálicos) que são requeridos para atividade enzimática. (IUPAC,2019).

## 5. CONCLUSÕES

No presente trabalho, foram realizadas as etapas necessárias para a preparação e definição de propriedades físicas e químicas do candidato a material de referência como recomendado pelas normas vigentes, bem como a realização da caracterização do material utilizado. Nesse sentido, pôde-se concluir que:

- Apesar da preparação da amostra ter envolvido diversas etapas e requerer tempo para tal finalidade, o procedimento adotado resultou em um material visualmente homogêneo e com tamanho de partículas adequado para análises químicas. Contudo, o candidato apresentou teor de umidade elevado, quando comparado com valor estabelecido em literatura, sendo necessária a determinação de umidade em porção independente;
- Dentre as massas utilizadas no Ensaio de Massa Mínima, as análises químicas realizadas com a massa de 500 mg produziram resultados confiáveis entre as diferentes técnicas analíticas utilizadas. Tal valor de massa está em concordância com diversos materiais certificados comercializados;
- O material obtido apresentou homogeneidade nas distribuições das concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn. Tal propriedade tem bastante relevância no que diz respeito a candidatos a materiais de referência certificados somada à importância de que tais elementos químicos apresentam, do ponto de vista nutricional e com relação a sua toxicidade, normalmente observada em altas concentrações,
- Os esforços para a caracterização química por ICP-OES indicaram concentrações apreciáveis de Ca, K, Mg e Na no candidato a RM, corroborando o aspecto nutricional do grilo-preto. Contudo, também foram encontradas concentrações consideráveis de alumínio, elemento químico não essencial.

Essa pesquisa demonstrou a viabilidade na produção e caracterização de um candidato a material de referência de grilo-preto. Tal projeto contribuiu de maneira significativa no desenvolvimento e estudo de outros MRC a partir de matrizes biológicas envolvendo insetos, bem como demonstra a potencialidade dessa matriz como ferramenta de garantia da qualidade para estudos nutricionais e ambientais.

## 6. PERSPECTIVAS

O presente projeto possibilitou o emprego do grilo-preto *in natura* como candidato a material de referência a partir da definição da massa mínima e da comprovação da homogeneidade, assim como pela quantificação de elementos químicos de interesse nutricional. Como sugestão para próximos estudos, pôde-se destacar:

- Estudo de diferentes porções analíticas entre 150 mg a 500 mg, as quais poderão resultar em massa mínima com valores de constante de amostragem e de coeficiente de variação menores;
- Estudo a respeito da homogeneidade inter-frascos, granulometria e estabilidade a curto e longo prazo, pois tais ensaios serão necessários para a certificação do MR devido à estimativa de incerteza dos valores certificados;
- Outra possibilidade seria a utilização do MR proposto em análises ambientais, adicionando-se elementos químicos tóxicos como As, Cd e Pb, por exemplo, ao alimento dos insetos e produzindo-se um MR enriquecido em elementos químicos de interesse ambiental.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, R. O. **Determinação de elementos em sangue total de hamster dourado usando AAN**. Dissertação (Mestrado). São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/CNEN/SP, São Paulo, p. 72, 2009.

ALEIXO, P. C.; NÓBREGA, J. A. Determinação direta de selênio em água de coco e em leite de coco utilizando espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite. **Química Nova**, v. 23, n. 3, p. 310-312, 2000.

ALVES, C. C. O. **Pós obtidos da polpa de pequi (Caryocar Brasiliense Camb.) Liofilizada: Higroscopicidade e microestrutura**. Dissertação (Mestrado). Lavras - MG: Universidade Federal de Lavras - UFLA, p. 146, 2007.

ANJOS, M. J.; LOPES, R. T.; JESUS, E. F. O.; ASSIS, J. T.; CESAREO, R.; BARROSO, R. C.; Elemental Concentration Analysis in Soil Contaminated with Recyclable Urban Garbage by Tube-Excited Energy Dispersive X-ray Fluorescence. **Radiation Physics and Chemistry**, Holanda, v. 65, n.4-5, p. 495-500, 2002.

AQUINO, A. M. **Manual para macrofauna do solo**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, p. 21, 2001.

ARAÚJO, R. R. S.; DOS SANTOS BENFICA, T. A. R.; FERRAZ, V. P.; MOREIRA SANTOS, E. Nutritional Composition Of Insects *Gryllus assimilis* And *Zophobas morio*: Potential Foods Harvested In Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 76, p. 22-26, 2019.

ARDESTANI, M. M.; NICO, M.; VAN STRAALE.; CORNELIS, A. M.; VAN GESTEL. Uptake and elimination kinetics of metals in soil invertebrates: A Review. Department of Biology. University of Science and Technology. **Environmental pollution**, v. 193, p. 277-295, 2014.

ARGEKAR, A.A.; KULKARNI, J. N.; MATHUR, J. N.; PAGE. A.G. Chemical separation and ICP-AES determination of 22 metallic elements in U and Pu matrices using



cyanex-923 extractant and studies on stripping of U and Pu. **Talanta**, London, v. 56, p.591-601, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT ABNT ISO GUIA 31:2004 **Materiais de referência - Conteúdo de certificados, rótulos e documentação associada**. Rio de Janeiro, 2004;

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT ABNT ISO GUIA 32:2000 **Calibração em química analítica e uso de materiais de referência certificados**. Rio de Janeiro, 2000;

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT ABNT ISO GUIA 33:2002 **Utilização de materiais de referência certificados**. Rio de Janeiro, 2002;

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT ABNT ISO GUIA 34:2012 **Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência**. Rio de Janeiro, 2012;

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT ABNT ISO GUIA 35:2012 **Materiais de referência – Princípios gerais e estatísticos para certificação**. Rio de Janeiro, 2012;

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT, ABNT ISO/IEC 17025. **Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de Ensaio de Calibração**. Rio de Janeiro, 2001.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. ABNT ISO GUIA 30:2011 **Materiais de referência - Termos e definições selecionados**. Rio de Janeiro, 2011;

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**, v. 216, p. 793-805, 2016.

AYKAN, N. F., Red Meat and Colorectal Cancer. **Oncology Reviews**, v. 9, p. 38-448, 2015.

AYROSA, A. M. I. B.; M, MARINA J. S.; POLAKIEWICZ, B; BEPPU, M. M.; HIGA, O. Z.; PITOMBO, R. N. M. Estudo do comportamento higroscópico do pericárdio bovino liofilizado. **Revista Matéria**, Rio de Janeiro, v.12, p. 313-321, 2007.

BAPTISTA, T. S. **Valores de referência de elementos em sangue de cavalos da raça crioula via metodologia nuclear**. Dissertação (Mestrado). São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/CNEN/SP, p. 81, 2010.

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.

BARSOSA, P. S. M.; **Desenvolvimento de Métodos Analíticos para Determinação de As, Cd, Cr, Hg e Pb em Embalagens Celulósicas para Alimentos por Espectrometria de Absorção Atômica e Amostragem direta de Sólidos**. Dissertação (Mestrado). São Paulo: Universidade de São Paulo - USP, p. 95, 2009.

BECKHOFF, B.; KANNGIEFER, B.; LANGHOFF, N.; WEDELL, R.; WOLFF H. **Handbook of practical X-ray fluorescence analysis**. Berlin: Springer, 2006.

BEIRAS, R; FERNANDEZ, N.; BELLAS, J.; BESADA, V.; GONZALEZ-QUIJANO, A.; NUNES, T. Integrative assessment of marine pollution in Galician estuaries using sediment chemistry, mussel bioaccumulation, and embryo-larval toxicity bioassays. **Chemosphere**, v. 52, p. 1209–1224, 2003.

BERNARD, J. B., & ALLEN, M. E. **Feeding captive insectivorous animals: Nutritional aspects of insects as food**. 1997. In: Nutrition Advisory Handbook Fact Sheet.

BIANCHI, S. R.; PEIXOTO, A. M. J.; SOUZA, G. B.; TULLIO, R. R.; NOGUEIRA, A. R. A. Production and characterization of a bovine liver candidate reference material. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 733 p.1-4, 2016.

BICHINO, K. M. **Utilização da técnica de espectrometria de fluorescência de raios X para determinação de resíduos catalíticos em polímeros comerciais**. Tese

(Doutorado). Porto Alegre: Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul - UFRS, p. 102, 2008.

BINGHAM, N. H.; FRY, J. M. **Regression: Linear Models in Statistics (Springer Undergraduate Mathematics Series)**. 1ª ed, New York: Springer, p. 300, 2010.

BORGES, D.L.G.; CURTIUS A.J.; WELZ, B.; HEITMANN, U. Fundamentos da Espectrometria de Absorção atômica de Alta Resolução com Fonte Contínua. **Revista Analytical**. v. 18, p. 58-67, 2005.

BOSSU, C. M. **Produção e Caracterização de Material de Referência de Forrageira para Nutrientes e Contaminantes Inorgânicos**. Tese (Doutorado) São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, p.119, 2013.

BRADLEY, R. S. Chapter 11 - Insects and Other Biological Evidence from Continental Regions. **Paleoclimatology**, v. 3, p. 377- 404, 2015.

BRANDÃO, N. A. L. **Repetitividade de Reprodutibilidade na Validação de Métodos para Testes de germinação de Sementes de Espécies Florestais**. Dissertação (Mestrado). Uberlândia: Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, p. 107, 2013.

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.; Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, p. 129, 2003.

BROWER, P. **Theory of EDXRF: Getting acquainted with the principles**. PANalytical BV, Netherlands, p. 62, 2010.

BROWN, 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.

BUCHMANN, J. H., & SARKIS, J. E. DE S. O conceito de incerteza aplicado aos processos de medição associados à preparação de uma solução de referência para calibração. **Química Nova**, v.25, p.111–116, 2002.

BURLINGAME, B., DERNINI, S., Sustainable Diets and Biodiversity - Directions and solutions for policy, research and action, **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, Rome, p. 308, 2012.

CABRAL, P. **Erros e Incertezas nas Medições**. IEP – Instituto Electrotécnico Português, Laboratório de Metrologia e Ensaios & ISEP – Instituto Superior de Engenharia do Porto, Departamento de Física. Portugal, p. 115, 2004.

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

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**, Campinas, v. 30, p. 429-238, 2010.

CASTRO, L. **Preparo e caracterização de um Material de Referência de Rim de Boi**. Tese (Doutorado). São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN, p. 272, 2017.

CHAPMAN, R. **The Insects: Sctructure and Funtion**. S. Simpson and A. douglas. Cambridge: Cambridge Universuty, p. 832, 2012.

CIRILLO, M. A.; FERREIRA, D. F. Extensão do Teste para Normalidade Univariado Baseado no Coeficiente de Correlação QuantilQuantil para o Caso Multivariado. **Revista de Matemática e Estatística**, São Paulo, v. 21, p. 67–84, 2003.

CLAPER, R. S. **Energy Dispersive X-Ray Fluorescence: Measuring Elements in Solid and Liquid Matrices**. Final Degree Project (Enginyeria Tèc. Ind. Química Industrial). Universitat de Girona – Escola Politècnica Superior, p. 76, 2006.

COHEN, A. C. **Insect diets: Science and Technology**. CRC Press, p. 344, 2003.

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: Embrapa Agrobiologia, p. 46, 2000.

CUSTÓDIO, P. J. CARVALHO, M. L.; NUNES, F.; PEDROSO, S.; CAMPOS, A. Direct analysis of human blood (mothers and newborns) by energy dispersive X-ray fluorescence. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.19, p. 151-158, 2005.

DE LA CRUZ, M. H. C., RODRIGUES, J. M., COUTO, P. R. G., CUNHA, V. S. DA, & BREMSER, W. Estimativa da incerteza de medição em análise cromatográfica: abordagem sobre a quantificação de carbamato de etila em cachaça. **Química Nova**, v. 33, p. 1578–1584, 2010.

DEFOLIART, G. R. An overview of the role of edible insects in preserving biodiversity. **Ecology of Food and Nutrition**, v. 36, p. 109–132, 1997.

DOS SANTOS, A. M. P.; LIMA, D. C.; DE JESUS, R. M.; FERREIRA, S. L. C. Homogeneity and stability studies during the preparation of a laboratory reference material of soy leaves for the determination of metals. **Journal of AOAC International**, v.94, n.6, p.1906-1910, 2011.

DOS SANTOS, S. S. N. S. C. **Caracterização química de leite em pó para produção de material de referência certificado**. Dissertação (Mestrado em Química na Agricultura e no Ambiente)., Piracicaba: Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo. p. 81. 2016.

ELLISON, S. L. R.; WILLIAMS, A. (Eds). Eurachem/CITAC guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 3ed, 2012. disponível em: <[www.eurachem.org](http://www.eurachem.org)>. Acesso em 17 de set de 2019;

ELLISON, S. L. R; EURACHEM - **Determinando a Incerteza na Medição Analítica**. 2<sup>a</sup> ed. 2002. Disponível em: <<http://allchemistry.iq.usp.br/pub/metabolizando/Beta021115.pdf/>>. Acesso em: 5 de setembro de 2018.

FAN, X., SOMMERS, C. H. (Ed.) **Food irradiation**. Research and technology. 2nd Ed, Windmoor, PA: Wiley-Blackwell, 2013.

FAO. **Forest insects as food: humans bite back**. Bangkok, FAO, 2010.

FAO/WUR. **Edible insects: future prospects for food and feed security**. Rome, FAO. International Feed Ind, 2013

FARKAS, J. Irradiation as a method for decontaminating food - A review. **International Journal Food Microbiology**. v. 44, p.189-204, 1998.

FAUSTINO, G. M.; **Desenvolvimento e validação de metodologia para determinação de metais em amostras de água por espectrometria de emissão óptica com plasma de argônio (ICP-OES)**. Dissertação (Mestrado). São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, p. 149, 2015.

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

FERREIRA, J. C.; PATINO, Cecilia Maria. What does the p value really mean? **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. São Paulo, v. 41, p. 485, 2015.

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.

FLETCHER, D. E.; LINDELL, A. H.; STILLING, G. K.; MILLS, G. L.; BLAS, S. A.; MCARTHUR, J. V. Spatial and taxonomic variation in trace element bioaccumulation in two herbivores from a coal combustion waste contaminated stream. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 101, p. 196-204, 2014.

FONSECA, C. P. S. da. **Aplicação de fluorescência de raios-x para caracterização de elementos tóxicos em exosqueletos de moluscos**. Dissertação (Mestrado). Universidade de Lisboa, 2017;

FREITAS A.V.L.; LEAL, I.R.; UEHARA-PRADO, M.; IANNUZZI, L. **Insetos como indicadores de conservação da paisagem**. In: Rocha CFD, Bergallo HG, Van Sluys M & Alves, MAS (Eds.) *Biologia da Conservação*. Rio de Janeiro, Editora da UERJ. p. 201-225, 2006.

GONGALSKY, K. B. Bioaccumulation of metals by soil-dwelling insects in a uranium production area. **European Journal of Soil Biology**, v. 42, p. 180-185, 2006.

GORECKA, H.; CHOJNACKA, K.; GORECKI, H. The application of ICP-MS and ICP-OES in determination of micronutrientes in wood ashes as soil conditioners. **Talanta**, London, v. 70, p. 950-956, 2006.

HARTMANN, C., SIEGRIST, M. Becoming an insectivore: Results of an experiment. **Food Quality and Preference**, v. 51, p. 118-122, 2016.

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

HOU, X.; AMAIS, R. S.; DONATI, G. L.; JONES, B. T. **Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry**. Disponível em: [https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4320008/mod\\_resource/content/1/Inductively%20Coupled%20Plasma%20Optical%20Emission%20Spectrometry.pdf](https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4320008/mod_resource/content/1/Inductively%20Coupled%20Plasma%20Optical%20Emission%20Spectrometry.pdf). Acesso em 30 de setembro de 2019.

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.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA – INMETRO. **Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos**. DOQ-CGCRE-008. 2016.

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

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

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

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

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/utils/common/documents/jcgm/JCGM\\_200\\_2012.pdf](http://www.bipm.org/utils/common/documents/jcgm/JCGM_200_2012.pdf)>. Acesso em: 30 de outubro de 2019.

JONGEMA, Y. **List of edible insects of the world**, 2013. Disponível em: <<https://www.wur.nl/en/Research-Results/Chair-groups/Plant-Sciences/Laboratory-of-Entomology/Edible-insects/Worldwide-species-list.htm>>. Acesso em: 06 de setembro de 2019.

JULIÃO, G. R.; FERNANDES, G. W.; NEGREIROS, D.; BEDÊ, L.; ARAÚJO, R. C. Insetos galhadores associados a duas espécies de plantas invasoras de áreas urbanas e peri-urbanas, **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 49, p. 1-10, 2005.

KANG, S. G.; CHOI, M. S.; OH, I. S.; WRIGHT, D. A.; KOH, C. H. Assessment of metal pollution in Onsan Bay, Korea using Asian periwinkle *Littorina brevicula* as a biomonitor. **The Science of the Total Environment**, v. 234, p. 127-137, 1999.

KATO, L. S. **Caracterização química de feijão para produção de material de referência certificado**. Dissertação (Mestrado). Piracicaba: Universidade de São Paulo – USP, p. 87, 2014.

KATO, L. S.; FERNANDES, E. A. N.; BACCHI, M. A.; ELIAS, C.; SARRIÉS, S. R. V.; SARRIÉS, G. A.; MODOLO, P. S. Instrumental neutron activation analysis for



assessing homogeneity of a whole rice candidate reference material. **Journal of radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 297, p. 271-275, 2013.

KLEIN, C.; DUTROW, B. **Manual de Ciência dos Minerais**, Editora: Bookman, v. 23, p. 706, 2012

KRACHLER, M.; WINCKEL, S. V.; CARDINALE, M.; LYNCH, B.; MURAKAMI, T. Method development for the determination of álcali metals in samples from pyrochemical reprocessing using ICP-OES and comparison with sector field CPMS. **Microchemical Journal**, v. 105, p. 1-6, 2012.

KRUG, F. J.; **Métodos de preparo de amostras**. In: VI Workshop sobre Preparo de Amostras. – Santa Maria: UFSM, p. 282, 2004.

KRUMMENAUER, A. **Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica para Análise de Aços por Espectrometria de Fluorescência de Raios X por Dispersão de Energia (EDXRF)**. Dissertação (Mestrado). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRS, p. 88, 2017.

LANAGRO. **Manual de Garantia da Qualidade Analítica: áreas de identidade e qualidade de alimentos e de insumos**. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. p. 51, 2015.

LEOTTI, V. B; A. R. BIRCK E J. RIBOLDI. **Comparação dos Testes de Aderência à Normalidade Kolmogorov-smirnov, AndersonDarling, Cramer–Von Mises e Shapiro-Wilk por Simulação**. In: 11º Simpósio de Estatística Aplicada à Experimentação Agronômica e a 50ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria (RBRAS), 2005.

LIMA, D. C.; DOS SANTOS, A. M. P.; ARAUJO, R. G. O.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, S. L. C. Principal component analysis and hierarchical cluster analysis for homogeneity evaluation during the preparation of a wheat flour laboratory reference material for inorganic analysis. **Microchemical Journal**, v. 95, p. 222-226, 2010.

LINSINGER, T. P. J.; PAUWELS, J.; VAN DER VEEM, A. H.; SCHIMMEL, H.; LAMBERTY, A. Homogeneity and stability of reference materials. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 6, p. 20–25, 2001.

LOPES, M. M.; CASTELO BRANCO, V. T. F.; SOARES, J. B. Utilização dos testes estatísticos de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk para verificação da normalidade para materiais de pavimentação. **Transportes**, v. 21, 2013.

LOPES, S.; ROSSO, S. **Biologia - Volume Único**. Capítulo 23: Arthropoda e Echinodermata. Publicado pela editora Saraiva S.A. 2005

LYRA, D T. **Determinação de elementos químicos de solos e sedimentos em suspensão para monitoração da qualidade ambiental de manguezal de Pernambuco**. Dissertação (Mestrado). Recife: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, p. 98, 2016.

MAGALHÃES, M. R. L. **Adequabilidade De Farinhas De Insetos Comestíveis para a Produção De Material De Referência**. Tese (Doutorado). Recife: Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, p. 108, 2019.

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

MAIHARA, V. A.; FAVARO D. I. T.; VASCONCELLOS, M. B. A.; SATO, I. M.; SALVADOR, V. L. R.; MANTONVANI, D. M. B.; MORGANO, M. A.; MAIO, F. D.; CANTAGALLO, M. I.; SISTI, C.; DANTAS, E. S. K.; SHIHOMATSU, H. M. **Estudo Interlaboratorial: material de referência secundário fígado bovino**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE METROLOGIA, 3., 1-5 set, 2003, Recife, PE. 2003.

MARCKI, D. C. **Desenvolvimento de candidato a material de referência certificado para Uísque: um material eficaz para a garantia da qualidade e manutenção da ISO/IEC 17025 em Laboratórios de Ensaio**. Dissertação (Mestrado). São Carlos: Universidade de São Paulo - USP. p. 86, 2017.

MARGUÍ, E.; QUERALT, I.; CARVALHO, M. L.; HIDALGO, M. Comparison of EDXRF and ICP-OES after microwave digestion for element determination in plant specimens from an abandoned mining area. **Analytica Chimica Acta**, v. 549, p. 197-204, 2005.

MARQUES, J. R.; **Otimização e Validação de Metodologia Analítica para determinação de metais e semimetais em efluentes líquidos por espectrometria de emissão óptica com plasma de argônio (ICP-OES)**. Dissertação (Mestrado). São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN, p. 195, 2015.

MARQUES, L. G. **Liofilização de frutas tropicais**. Tese (Doutorado). São Carlos: Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, p. 255. 2008.

MARTINEZ, M. I. V.; FERNANDES, E. A. N.; BACCHI, M. A.; GONZAGA, C. L.; SARRIES, S. R. V.; ELIAS, C.; SARRIÉS, G. A. **Development of a candidate reference material of tomato leaves with emphasis on As, Cd, Hg and Pb**. In: 13th International Symposium on Biological and Environmental Reference Materials, Vienna, 2012.

MARTINS, G. A.; DOMINGUES, O. **Estatística Geral e Aplicada**. 4a ed. São Paulo: Atlas, 2011

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 biomonitores da qualidade ambiental de manguezais pernambucanos**. Dissertação (Mestrado). Recife: Departamento de Energia Nuclear, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, p. 76, 2014.

MEYERS, R. A.; **Encyclopedia of analytical chemistry applications theory and instrumentation**. John Wiley & Sons; 15 Volume Set edition, 2000.

MIOT, H. A.; Avaliação da normalidade dos dados em estudos clínicos e experimentais. **Jornal vascular brasileiro**, Porto Alegre, v. 16, p. 88-91, 2017.

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

MOREIRA, E. G.; VASCONCELO, M. B. A.; MAIHARA, V. A.; CATHARINO, M. G. M.; SAIKI, M. Interlaboratory Comparison for the Characterization of a Brazilian Mussel Reference Material. **Journal of the Brazilian Chemical Society** v. 29, p. 823-830, 2018

MORETTIN, P. A. & BUSSAB, W. O. **Estatística Básica**. 6a ed. São Paulo: Saraiva, 2010.

NASCIMENTO FILHO, Virgílio. F. **Técnicas Analíticas Nucleares de Fluorescência de Raios X Por Dispersão de Energia (ED-XRF) e por Reflexão Total (TXRF)**. 1999. Disponível em: < <http://www.fem.unicamp.br/~giorgia/fluorescencia.pdf>>. Acesso em 25 de agosto de 2019.

NATION, J. L. **Insect physiology and biochemistry**. Departamento of entomology and nematology. University of Florida, gainesville Florida. 3th Edition, p. 485.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDART AND TECHONOLY – NIST. Disponível em: <<https://wws.nist.gov/srmors/detail.cfm?source=tables&searchstring=trace+elements&search1=Go>>. Acesso em 01 de junho de 2019;

NETO, S. S.; MONTEIRO, R. C.; ZUCCHI, R. A.; MORAES, R. C. B. Uso da análise faunística de insetos na avaliação do impacto ambiental. **Science agricultural**, v. 52, p. 9, 1995.

NICHOLS, E.; LARSEN, T.; SPECTOR, S.; DAVIS A.L.; ESCOBAR F.; FAVILA, M.; VULINEC, K. Global dung beetle response to tropical forest modification and fragmentation: A quantitative literature review and meta-analysis. **Biological Conservation**, v. 137, p. 1-19, 2007.

NOWAK, V., PERSIJN, D., RITTENSCHOBBER, D., & CHARRONDIERE, U. R. Review of food composition data for edible insects. **Food Chemistry**, v. 193, p. 39-46, 2016.

NUORTEVA, P. Synanthropy of blowflies (Diptera: Calliphoridae) in Finland. **Entomologica Fennica**, v. 29, p.1-49, 1963.

OLIVARES, I. R. B. **Gestão de Qualidade em Laboratórios**. 2ª Ed. Campinas. Ed. Átomo, p. 148. 2015.

OLIVARES, I. R. B., SOUZA, G. B., Nogueira, A. R. A., Toledo, G. T. K., & Marcki, D. C. Trends in developments of certified reference materials for chemical analysis - Focus on food, water, soil, and sediment matrices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 100, p. 53–64. 2018.

OLIVEIRA JUNIOR, O. P. **Preparação, caracterização e certificação de materiais de referência isotópicos de urânio**. Tese (Doutorado). São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, p. 235, 2006.

OLIVEIRA, M. C. **Definição do nível de significância em função do tamanho amostral**. Tese (Mestrado). São Paulo: Universidade de São Paulo – USP, p. 120, 2014.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA – FAO. **A Contribuição dos Insetos para a Segurança Alimentar, Subsistência e Meio Ambiente**, p. 4, 2015.

OTAVO, S. E.; PARRADO-ROSSELLI, A.; NORIEGA, J.A. Superfamilia Scarabaeoidea (Insecta: Coleoptera) como elemento bioindicador de perturbación antropogénica en un parque nacional amazônico. **Revista de Biología Tropical**, v. 61, p. 735-752, 2013.

ÖZTUNA, D.; A. H. ELHAN E E. TÜCCAR. Investigation of Four Different Normality Tests in Terms of Type 1 Error Rate and Power under Different Distributions. **Journal of Medicine Cincinnati**. v. 36, n. 3, p. 171–176, 2006.

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**. Tese (Doutorado). São Paulo: Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, p. 125, 2003.

PAN, A., SUN, Q., BERNSTEIN, A. M., SCHULZE, M. B. **Red meat consumption and mortality: results from 2 prospective cohort studies.** Archives of International Medicine, v. 172, p. 555-563, 2012.

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

PATACA, L. C. M.; BORTOLETO, G. G.; BUENO, M. I. M. S. Determinação de arsênio em águas contaminadas usando fluorescência de raios-X por energia dispersiva. **Química Nova**, v. 28, p. 579-582, 2005.

PEARCE, J.L.; VENIER, L.A. The use of ground beetles (Coleoptera: Carabidae) and spiders (Araneae) as bioindicators of sustainable forest management: a review. **Ecological Indicators**, v. 6, p. 780-793, 2006.

PEREIRA, L. J. R.; LACERDA, R.; MAINIER, F. B. [http://www.simpep.feb.unesp.br/anais/anais\\_13/artigos/302.pdf](http://www.simpep.feb.unesp.br/anais/anais_13/artigos/302.pdf), 2006. Disponível em: <[http://www.simpep.feb.unesp.br/anais/anais\\_13/artigos/302.pdf](http://www.simpep.feb.unesp.br/anais/anais_13/artigos/302.pdf)>. Acesso em: 12 Maio 2019.

PICOLOTO, R. S, **Determinação de elementos de trações em solo por ICP-MS após volatilização Empregando Combustão Iniciada por Micro-ondas.** Dissertação (Mestrado). Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, p. 94, 2011

PINO, F. A.; **A questão da Normalidade: Uma Revisão.** Revista de Economia Agrícola, v. 61, p. 17-33, 2014.

PONÇANO, V. M.; **Implementação da metrologia química no Brasil: Organização de redes de laboratórios e estruturação das atividades de produção de materiais de referência,** PADCT TIB 01/98, 4o Relatório Técnico, 2003.

PORTAL ACTION, 2019. Disponível em:<<http://www.portalaction.com.br/inferencia/testes-de-normalidade>>. Acesso em 25 de outubro de 2019.

POTTS, Philip J.; WEST, Margaret. Portable X-ray Fluorescence Spectrometry: capabilities for in situ analysis. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2008.

PUNZO, F. Nutrient composition of some insects and arachnids. **Biological Sciences**, v. 66, p. 84–98, 2003.

QUINÁGLIA, G. A. **Caracterização dos níveis basais de concentração de metais**. Tese (Doutorado). São Paulo: Universidade Federal de São Paulo – USP, p. 262, 2012.

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.

RESH, V.; CARDÉ, R.; **Encyclopedia of Insects**. Segunda Edição. Academic Press, 2009

RIBANI, M. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**. v. 27, p. 771-780, 2004;

ROMEIRO, E. T.; OLIVEIRA, I. D.; CARVALHO, E. F. Insetos como Alternativa Alimentar: Artigo de Revisão. Disponível em:<  
[http://www3.sp.senac.br/hotsites/blogs/revistacontextos/wp-content/uploads/2015/10/54\\_CA\\_artigo\\_ed\\_Vol\\_4\\_n\\_1\\_15\\_2.pdf](http://www3.sp.senac.br/hotsites/blogs/revistacontextos/wp-content/uploads/2015/10/54_CA_artigo_ed_Vol_4_n_1_15_2.pdf)>. Acesso em 10 de set. de 2018.

RUBY, M. B., ROZIN, P., CHAN, C., Determinants of willingness to eat insects in the USA and India. **Journal of Insects as Food and Feed**, v. 1, p. 215-225, 2015.

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

SANTANA, L.V. **Preparo, caracterização e uso de um material de referência para ensaios de proficiência para determinação de metais em tecido de peixe in natura**. Dissertação. (Mestrado). São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, p. 207, 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, E. S., **Determinação de cobre, ferro, níquel e zinco em matrizes etanólicas por espectrometria de fluorescência de raios-x com energia dispersiva após pré-concentração em papel cromatográfico**. Tese (Doutorado) – Salvador: Universidade Federal da Bahia – UFBA, p. 122, 2012.

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

SCHARF, H.; BECKER, R.; BREMSER, W.; BUGE, H.G.; LUCK, D. Certification of the mass fractions of trace elements and pentachlorophenol in an impregnated Wood reference material. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 15, p. 613–619, 2010.

SCHLOTZHAUER, S. **Elementary Statistics Using JMP (SAS Press)** PAP/CDR ed. Cary, NC: SAS Institute, p. 166–169. 2007

SHARMA, S. K. **X-ray spectroscopy**. Croatia: Intech, p. 290, 2012.

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

SILVA NETO, P. C. **Candidato a Material de Referência de Solo Naturalmente Enriquecido com Radionuclídeos**. Tese (Doutorado). Recife: Universidade Federal de Pernambuco – USP, p. 124, 2019.

SILVA, C. E.; **Validação de métodos para as técnicas de WDXRF e OES-SPARK para análise de ligas de aço: cálculo de incerteza de medição para amostras de processo, aço classe API**. Dissertação (Mestrado). São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, p. 122, 2009.



SILVA, C. S.; **Produção e Avaliação de Materiais de Referência para Nutrientes e Contaminantes Inorgânicos em Amostras Agronômicas**. Tese (Doutorado). São Carlos: Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, p. 198, 2016.

SILVA, D. C. C. **Determinação de elementos potencialmente tóxicos em amostras de solo utilizando extração assistida por ultrassom e espectrometria de absorção atômica**. Dissertação (mestrado). Ponta Grossa: Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, p. 149, 2018.

SILVA, R.C.; SILVA, R. M.; AQUINO, K. A. S. A interação da radiação gama com a matéria no processo de esterilização. **Revista Virtual de Química**, v. 6, p. 1624-1641, 2014

SILVEIRA, S; BORTOLI, B, M; CAMPOS, A, E; **Uso de bioindicadores na análise da qualidade da água do lajeado do vídeo-Concórdia-SC**, 2011. Disponível em:< [http://mic.concordia.ifc.edu.br/wp-content/uploads/sites/30/2017/10/MIC124\\_Uso\\_de\\_bioindicadores\\_na\\_analise\\_da\\_qualidade\\_da\\_gua\\_do\\_lajeado\\_do\\_video\\_concordia\\_SC.pdf](http://mic.concordia.ifc.edu.br/wp-content/uploads/sites/30/2017/10/MIC124_Uso_de_bioindicadores_na_analise_da_qualidade_da_gua_do_lajeado_do_video_concordia_SC.pdf) >. Acesso em: 27 de junho de 2018.

SIMABUCO, S. M. - **Emprego da fluorescência de raios X por dispersão de energia no estudo da dinâmica da vinhaça no solo**. Tese (doutorado), São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, p. 153, 1993.

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

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6ª ed. Porto Alegre: Editora Bookman, 2009.

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

SOUSA, E. E.; PAIVA, J. D. S.; FRANÇA, E. J.; ALMEIDA, M. E. S.; CANTINHA, R. ychaS.; 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. Disponível em: <[https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/\\_Public/45/086/45086063.pdf](https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/_Public/45/086/45086063.pdf)>.

Acesso em: 2 de setembro de 2019;

TAGLIAFERRO, F. S.; FERNANDES, E. A. N.; BODE, P.; BACCHI, M. A.; FRANÇA, E. J. **Candidate coffee reference material for element content: production and certification scheme adopted at CENA/USP.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DEMETROLOGIA, Recife, PE, 2003.

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**, v. 9, p. 80-89, 2014.

TAN, H. S. G., FISCHER, A. R. H., VAN TRIJP, H. C. M., STIEGER, M., Tasty but nasty? Exploring the role of sensory-liking and food appropriateness in the willingness to eat unusual novel foods like insects. **Food Quality and Preference**. v. 48, p. 293-302, 2016

TAVARES, A. T.; **Determinação Multielementar De Elementos Traços Em Radiofármacos Produzidos Na Diretoria De Radiofarmácia Por Espectrometria De Emissão Por Plasma.** Dissertação (Mestrado). São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, p. 101, 2013.

TERTIAN, R., e F. CLAISSE - **Principles of Quantitative X-Ray Fluorescence Analysis.** Heyden, Londres, p. 385, 1982.

THOMANZINI, M. J.; THOMANZINI, A. P. B. W. Levantamento de insetos e análise entomofaunística em floresta, capoeira e pastagem no Sudeste Acreano. **Circular Técnica-EMBRAPA**, v. 35, p. 9, 2002.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories. **Pure and Applied Chemistry**., v. 78, p. 145–196, 2006.

ULRICH, J.C. **Preparação e caracterização de um material de referência de peixe**. Tese (Doutorado). São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN, p. 129. 2011.

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

VALDERRAMA, P.; BRAGA J. W. B.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova**, v. 32, p. 1278-1287, 2009.

VAN DER VEEN, A. M. H.; LINSINGER, T.P.J.; LAMBERTY, A.; PAUWELS, J. Uncertainty calculations in the certification of reference materials: Stability study. **Accreditation Quality Assurance**, v. 6, p. 257-263, 2001a

VAN DER VEEN, A. M.H.; LINSINGER, T.; PAUWELS, J. Uncertainty calculations in the certification of reference materials. **Accreditation Quality Assurance**, v. 6, p. 26-30, 2001b.

VAN HUIS, A. Potential of insects as food and feed in assuring food security. **Annual Review of Entomology**, v. 58, p. 563–583, 2013.

VEGA MARTINEZ, M. A. **Desenvolvimento e produção de material de referência certificado de folhas de cana-de-açúcar para avaliação da qualidade nutricional**. Tese (Doutorado). Piracicaba: Universidade de São Paulo – USP, p. 181, 2016

VOGEL, A. I. **Análise química quantitativa**. 6ª ed. Ed. LTC, Rio de Janeiro, p. 63-79, 2008

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.

WANG, T.; WU, J.; HARTMAN, R.; JIA, X.; EGAN, R.S. A multi-element ICPMS survey method as an alternative to the heavy metals limit test for pharmaceutical materials. **Jornal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 23, p. 867-890, 2010.

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

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

WOOD, R. How to validate analytical methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, p. 624-632, 1999.

ZSCHUNKE, A. **Reference materials in analytical chemistry – a guide for selection and use**. Berlin, Springer, 2000.

## APÊNDICE A

Valores obtidos e certificados, suas respectivas incertezas analíticas expandidas em nível de 95% de confiança e Número En para os elementos químicos determinados no candidato a RM por ICP-OES.

<b>TM1 – Mussel Tissue</b>						
<b>Analitos</b>	<b>Valor obtido</b>		<b>Valor certificado</b>		<b>Número E<sub>n</sub></b>	<b>n</b>
	<b>(mg kg<sup>-1</sup>)</b>		<b>(mg kg<sup>-1</sup>)</b>			
	<b>Média</b>	<b>Incerteza</b>	<b>Média</b>	<b>Incerteza</b>		
<b>Al</b>	1090	144	1190	210	-0,4	3
<b>Ca</b>	2720	288	2720	400	0,0	3
<b>Cu</b>	13,7	2,3	11,3	1,7	0,8	3
<b>Fe</b>	594	65	593	53	0,0	3
<b>K</b>	8590	522	8200	1300	0,3	3
<b>Mg</b>	3730	248	3730	560	0,00	3
<b>Mn</b>	22,7	1,2	22,7	3,7	0,00	3
<b>Na</b>	22800	2200	22800	3600	0,00	3
<b>P</b>	15900	5160	15900	2500	0,00	3
<b>Zn</b>	118,5	6,0	118,5	9,5	0,00	3

En = Erro normalizado; n = número de repetições