

## EFEITOS DO FRACIONAMENTO SOBRE AS FRAÇÕES MÁSSICAS DE NUTRIENTES EM UM CANDIDATO A MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO DE GRILO PRETO (*Gryllus assimilis*)

Vinicius H. S. Bezerra<sup>1,3</sup>; Jayanne M. B. Farias<sup>2</sup>; Raphael H. M. Pereira<sup>3</sup>; Maria J. F. Gomes<sup>3</sup>; Elvis J. França<sup>2</sup>; Ana Paula S. Paim<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Química Fundamental, Recife – PE

<sup>2</sup>Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste, Recife – PE

<sup>3</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Química, Recife – PE

**Palavras-Chave:** Materiais de referência certificado, insetos, estudo de viabilidade.

### Introdução

O Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM) define Material de Referência Certificado (MRC) como um material acompanhado de documentação emitida por uma entidade reconhecida, que fornece valores de propriedades especificadas com incertezas e rastreabilidades associadas (INMETRO, 2012). O uso de MRC é recomendado para garantia da qualidade e validade de resultados analíticos e acreditação de laboratórios, abrangendo desde calibração de equipamentos até a atribuição de valores a outros materiais (ABNT, 2020; ABNT, 2019; ABNT, 2017). Apesar dos vários tipos de MRC (Olivares, 2018) encontrados comercialmente, o alto custo de produção limita sua disponibilidade para diferentes matrizes, sendo assim, tornam-se necessárias pesquisas envolvendo candidatos a materiais de referência certificados, especialmente de materiais com composições e características semelhantes às das amostras de rotina.

Os insetos são animais invertebrados capazes de absorver as substâncias químicas que circulam no ambiente por meio da alimentação ou contato direto. Esse tipo de matriz é bastante interessante devido à potencialidade de emprego em estudos de avaliação de qualidade ambiental em diversos ecossistemas, podendo ser empregado no biomonitoramento de impactos ambientais (Garvita, 2021; Ardestani et al., 2014). Uma outra característica desses animais é que apresentam, de maneira geral, elevados teores de proteína, aminoácidos e uma grande variedade de macro e micronutrientes como Cu, Fe, Mn e Zn, P e Mg entre outras substâncias de interesse nutricional (Rumpold, 2013; Van Huis, 2013). Nesse sentido, os insetos podem ser considerados como promissores candidatos a MRC fornecendo valores de referência em pesquisas e métodos analíticos que utilizem esse tipo de matriz.

A maneira como o MRC é preparado depende da composição da matéria-prima envolvendo várias etapas que devem garantir a homogeneidade e estabilidade das propriedades especificadas, bem como outras características físico-químicas. Estudos de viabilidade são realizados, em pequena escala, e permitem ao produtor conhecer melhor as características do material utilizado na produção de MRC, selecionando métodos de processamentos e metodologias de análise validadas que resultem em um produto adequado ao uso pretendido (ABNT, 2020).

Pesquisas envolvendo a busca por padrões de referência necessitam das mais variadas técnicas analíticas para identificação do maior número de elementos químicos possíveis e as suas respectivas concentrações. A técnica de Fluorescência de Raios-X por Energia Dispersiva (EDXRF) merece destaque pela possibilidade de análise direta de sólidos, líquidos e gases, requerendo mínimo tratamento das amostras. Uma outra vantagem está relacionada a seus limites de detecção (na ordem de mg kg<sup>-1</sup>), permitindo a quantificação de elementos com números atômicos (Z) entre o Na (sódio) e U (urânio) (Sichangi, Angeyo, Dehayem-Kamadjeu, Mangala, 2018; Okanda, Angeyo, Mangala, Kisia, 2017).

Apesar escolha da técnica analítica se dar pelo seu desempenho frente à diversidade de amostras a serem utilizadas, é preciso levar em conta a qualidade dos resultados obtidos em um procedimento de medição. Laboratórios de ensaio podem demonstrar competência por meio da participação de Ensaio de Proficiência (EP) (ABNT, 2024; Gupta et al., 2024; Cherie et al., 2024; Butler, Forder, 2024), conferindo uma maior confiabilidade e garantia da validade dos resultados de medição. (ABNT, 2017).

Desta forma, o presente trabalho visou avaliar a influência do fracionamento sobre as frações mássicas de macro e micronutrientes em amostras de um candidato a material de referência certificado utilizando grilo preto (*Gryllus assimilis*) como matéria-prima. As estimativas das frações mássicas dos analitos foram realizadas no laboratório ambiental do Centro Regional de Ciências Nucleares – Nordeste (CRCN-NE), o qual demonstrou conformidade em seus resultados obtidos por EDXRF ao participar de um ensaio de proficiência.

## Material e Métodos

### Preparação do Pré-lote do Candidato a Material de Referência Certificado

As amostras do inseto foram levadas a uma sala devidamente limpa para a preparação do candidato a MRC. O procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar com filtro HEPA (*High Efficiency Particulate Arrestance*) para evitar a contaminação com elementos químicos exógenos. A amostra foi reduzida utilizando um liquidificador modificado com lâmina de titânio. Posteriormente o material obtido foi congelado, liofilizado e levado para o envase e confecção do pré-lote do candidato a MRC.

O material liofilizado foi distribuído em frascos, devidamente higienizados, utilizando um Quarteador de aço inoxidável resultando no lote do candidato a MRC. Todo o pré-lote foi esterilizado por meio de irradiação de uma fonte de  $\text{Co}^{60}$  Gammacell 220 Excel-MDS Nordion com dose de radiação gama apropriada para esterilização: 25 kiloGrays (kGy).

Para a avaliação da influência do tamanho de partículas na concentração de macro e micronutrientes foram selecionados de maneira aleatória 15 frascos do pré-lote. A massa total dos frascos escolhidos foi homogeneizada e fracionada em função do tamanho de partículas utilizando peneiras de diferentes tamanhos de abertura.

### Determinação das Frações Mássicas de Macro e Micronutrientes utilizando Fluorescência de Raios-X por Energia Dispersiva (EDXRF)

A técnica de Fluorescência de Raios-X por Energia Dispersiva (EDXRF) foi utilizada para quantificação das frações mássicas de Cloro (Cl), Magnésio (Mg), Fósforo (P) e Enxofre (S) nas amostras do candidato. Para tanto, porções, em triplicata, de cerca de 0,5 g de cada fração granulométrica obtida foram utilizadas para preparação das cápsulas para análise no EDXRF.

A garantia de qualidade do procedimento analítico foi demonstrada a partir da avaliação do Número *En*, erro normalizado, (INMETRO, 2020). Para tanto, o Material de Referência TM01-Tecido de Mexilhão (*Mussel Tissue*) fornecido pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN SP), foi analisado por EDXRF e os valores de concentração e incerteza obtidos experimentalmente foram comparados com os valores presentes no certificado do MR.

### Avaliação dos Resultados

A Análise de Variância (ANOVA) foi utilizada com o objetivo de verificar a existência de diferenças significativas, em um nível de um 95% de confiança, nas concentrações dos elementos químicos estudados nas diferentes porções granulométricas obtidas.

## Resultados e Discussão

### Qualidade do Procedimento Analítico

A qualidade do procedimento analítico foi avaliada a partir da quantificação de elementos químicos de interesse no material de referência certificado TM01-Tecido de Mexilhão (*Mussel Tissue*) nas mesmas condições experimentais de análise para o candidato a MRC. Este parâmetro foi medido em termos de valores de  $En$  (Erro normalizado) para os analitos analisados, em que valores entre -1 e 1 indicam que o procedimento analítico adotado foi válido (INMETRO, 2020).

Os resultados obtidos para os valores experimentais e certificados com suas respectivas incertezas estão dispostos na Tabela 1. A partir dos valores de Número  $En$  obtidos para o material certificado analisado por EDXRF, foi possível inferir que, para os elementos químicos selecionados, o procedimento escolhido mostrou-se confiável, pois os valores mantiveram-se dentro do intervalo de aceitabilidade.

Tabela 1. Valores obtidos e certificados para o material de referência certificado TM01 e as respectivas incertezas analíticas em nível de 95%. Número  $En$  para a porção analítica de 0,5 g.

Analito	Valor obtido (mg kg <sup>-1</sup> )		Valor certificado (mg kg <sup>-1</sup> )		$En$
	Média	Incerteza	Média	Incerteza	
Mg	3498	500	3600	430	-0,16
P	14145	1019	15900	2000	-0,78
Cl	35686	1389	36200	430	-0,35
S	20781	380	21900	5000	-0,22

### Influência do Tamanho de Partículas na Distribuição das Frações Mássicas dos Elementos Químicos

A partir do processo de fracionamento das amostras do candidato foram obtidas 4 (quatro) frações de diferentes tamanhos: <80 mm, 80 mm<x<250 mm, 250 mm<x<500 mm e 500 mm<x<1000 mm.

Como mencionado, foi utilizada a Análise de Variância para avaliar possíveis diferenças significativas em relação às concentrações dos analitos nas diferentes frações granulométricas. Para tanto, foi avaliada pressupostos da ANOVA como a homocedasticidade das variâncias por meio do teste de Levene e avaliação da normalidade dos resíduos por meio do teste de Shapiro-Wilk.

Como é possível observar na tabela 2, os  $p$ -valores obtidos para o teste de Levene e para a normalidade dos dados foram maiores que o valor para o nível de significância ( $\alpha = 0,05$ ), satisfazendo os pressupostos em relação a homocedasticidade das variâncias e normalidade dos resíduos.

Tabela 2. Resultados estatísticos obtidos para as diferentes frações granulométricas.

Analitos	Faixa de tamanho <80 a <1000 (mm)			Faixa de tamanho <80 a <500 (mm)		
	$p$ -valor*			$p$ -valor*		
	Teste de Levene	Normalidade	ANOVA	Teste de Levene	Normalidade	ANOVA
Mg	0,49	0,65	<0,05	0,81	0,16	0,10
P	0,93	0,47	<0,05	0,92	0,51	0,34
Cl	0,37	0,08	<0,05	0,67	0,13	0,59
S	0,64	0,13	0,51	0,87	0,39	0,27

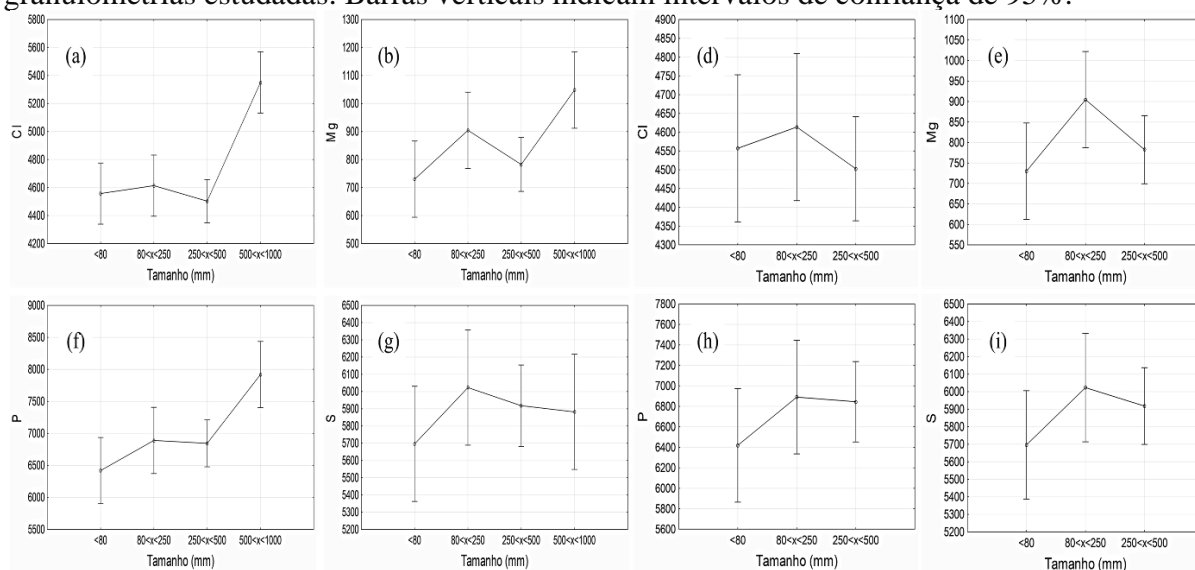
\* $\alpha = 0,05$ .

A Tabela 2 também traz informações a respeito da ANOVA para as diferentes frações granulométricas. É possível perceber que as frações mássicas dos elementos químicos, exceto para o enxofre, apresentaram diferenças significativas,  $p$ -valor  $< 0,05$  para toda a faixa de tamanhos estudada,  $<80$  mm a  $<1000$  mm.

Na Figura 1 são apresentadas o teste de comparações múltiplas (Least Square Means) para as diferentes granulometrias estudadas. As Figuras 1(a), 1(b), 1(f) e 1(g) indicaram que a maior fração granulométrica é aquela com maior diferença estatística com relação às outras frações. Considerando tal resultado, foi excluído a fração de  $500 \text{ mm} < x < 1000 \text{ mm}$  e posteriormente realizada uma nova análise de variância para as demais frações.

A Tabela 2, bem como as Figuras 1(c), 1(d), 1(h) e 1(i), trazem os  $p$ -valores e o teste de comparações múltiplas (Least Square Means), respectivamente, para as 3 menores frações granulométricas. Como observado, as frações mássicas dos analitos não apresentaram diferenças estatísticas significativas em relação as diferentes faixas de tamanho estudadas.

Figura 1. Teste de comparações múltiplas (Least Square Means) para as diferentes granulometrias estudadas. Barras verticais indicam intervalos de confiança de 95%.



Considerando os resultados obtidos, é possível levantar a hipótese de que as diferenças estatísticas para Cl, P e Mg foram resultantes do acúmulo de tais elementos provenientes de partes maiores do inseto, como por exemplo do exoesqueleto do animal, afetando a homogeneidade da concentração dessas substâncias. Tais diferenças são atenuadas pela diminuição no tamanho de partícula, indicando a obtenção de um material mais homogêneo em relação às frações dos elementos.

## Conclusões

No presente trabalho ficou evidente a importância de estudos de viabilidade na produção de candidatos a materiais de referência certificados, o que resulta em um melhor entendimento do material em função da forma de processamento e serve de ponto de partida para planejar a produção do MRC como um todo.

A partir dos resultados do estudo é possível inferir que um material mais homogêneo, em relação aos analitos selecionados, é obtido ao diminuir o tamanho de partícula. Tal fator é útil quando se pensa que muitas amostras biológicas necessitam de algum tratamento químico para quantificação de seus constituintes, o que pode resultar em um menor uso de reagentes mais concentrados e agressivos ao meio ambiente.

## Agradecimentos

À FACEPE, FINEP, CAPES, e ao CNPq.

## Referências

ARDESTANI, M. M.; NICO, M.; VAN STRAALÉ.; CORNELIS, A.M. VAN GESTEL. **Uptake and elimination kinetics of metals in soil invertebrates: A Review**. Environmental Pollution. Department of Ecological Science, Faculty of Earth and Life Sciences, 2014.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **ABNT ISO GUIA 30:2017**: Materiais de Referência – Termos e definições selecionados. Rio de Janeiro, 2017.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **ABNT ISO GUIA 33:2019**: Boas práticas no uso de materiais de referência. Duque de Caxias, 2019.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **ABNT ISO GUIA 35:2020**: Materiais de Referência – Guia para caracterização e avaliação da homogeneidade e estabilidade. Rio de Janeiro, 2020.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **ABNT NBR ISO/IEC 17043:2024**: Avaliação da conformidade — Requisitos gerais para ensaios de proficiência. Rio de Janeiro, 2024.

BUTLER, O.; FORDER J. A new proficiency testing scheme for occupational hygiene laboratories undertaking the analysis of diesel engine particulate emissions. **Accreditation and Quality Assurance**, mai. 2024. <https://doi.org/10.1007/s00769-024-01598-7>.

CHERIE, N. ET AL. Performances and determinants of proficiency testing in clinical laboratory services at comprehensive specialized hospitals, northwest Ethiopia. **Scientific Reports**, v. 14, n. 7745, abr. 2024.

GARVITA, P; DEEPAK, R; NITASHA, K. Insects as an Indicator for Environmental Pollution. *Environmental Claims Journal*, 33, 161-181, 2021.

GUPTA, P.C. ET AL. Microbiology proficiency testing in fish and fishery products: detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp.. **Journal of Food Science and Technology**, v. 61, p. 62-68, 2024.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (INMETRO). **DOQ-CGCRE-008**: Orientações sobre validação de métodos analíticos. Revisão 08. Duque de Caxias, 2020;

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (INMETRO). **Vocabulário Internacional de Metrologia: Conceitos fundamentais gerais e termos associados (VIM 2012)**. Duque de Caxias, 2012.

OKANDA, J. J.; ANGEYO K. H.; MANGALA J. M.; KISIA S. M. A nested multivariate chemometrics based calibration strategy for direct trace biometal analysis in soft tissue utilizing Energy Dispersive X-Ray Fluorescence (EDXRF) and scattering spectrometry. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 129, p. 49-56, nov. 2017.

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. **Trends in Analytical Chemistry**, 100, 53-64, 2018.

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

SICHANGI. E. K.; ANGEYO H. K.; DEHAYEM-KAMADJEU A.; MANGALA M. Hybridized robust chemometrics approach for direct rapid determination of trace biometals in tissue utilizing energy dispersive X-ray fluorescence and scattering (EDXRFS) spectrometry. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 153, p. 198-207, dez. 2018.

VAN HUIS, A. ET AL. Edible insects: future prospects for food and feed security. Roma: FAO, 2013.