



Serviço Público Federal  
Ministério da Economia (ME)  
Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – Inmetro

# *Certificado de Material de Referência*

**DIMCI 0040/2022**  
**Número do Certificado**

## **Identificação do item**

Material de Referência Certificado (MRC) de metabólitos de nitrofuranos em músculo de frango

## **Unidade produtora**

Divisão de Metrologia Química e Térmica (Dimqt)

## **Numeração do lote**

MRC 8957.0001

## **Código do serviço**

8957

**Data de emissão:** A data de emissão deste certificado é correspondente à data da última assinatura eletrônica presente ao final do certificado.

## **Declaração**

O MRC e seu certificado atendem aos requisitos das normas ABNT NBR ISO 17034 [1] e ABNT NBR ISO/IEC 17025 [2] e ao guia ABNT ISO GUIA 31 [3]. Este certificado é válido apenas para o item acima, não sendo extensivo a quaisquer outros e somente pode ser reproduzido de forma integral.

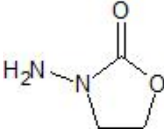
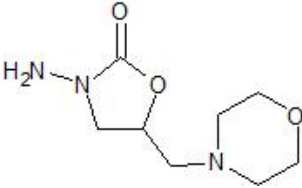
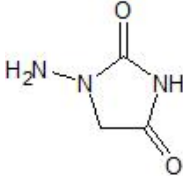
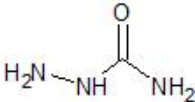
Este certificado é consistente com as Capacidades de Medição e Calibração (CMCs) que estão incluídas no apêndice C do Acordo de Reconhecimento Mútuo (MRA) estabelecido pelo Comitê Internacional de Pesos e Medidas (CIPM). Conforme os termos do MRA, todos os institutos participantes reconhecem entre si a validade dos seus certificados de medição para cada uma das grandezas, faixas e incertezas de medição declaradas no Apêndice C (para mais detalhes ver <http://www.bipm.org>).

## **Descrição e preparação do MRC**

Este Material de Referência Certificado (MRC) consiste em músculo de peito de frango na forma liofilizada, contendo os resíduos dos metabólitos de nitrofuranos 3-amino-2-oxazolidinona (AOZ), 3-amino-5-morfolinometil-2-oxazolidinona (AMOZ), 1-aminoidantoína (AHD) e semicarbazida (SEM) (Tabela 1), em frações mássicas na faixa de  $5 \mu\text{g.kg}^{-1}$  a  $6 \mu\text{g.kg}^{-1}$ , no material liofilizado, o que corresponde a aproximadamente  $1,25 \mu\text{g.kg}^{-1}$  a  $1,5 \mu\text{g.kg}^{-1}$  em base úmida. Os metabólitos foram naturalmente incorporados à matriz, pela administração das drogas precursoras da classe dos nitrofuranos a animais da subespécie *Gallus gallus domesticus* e linhagem Cobb. Para obter as frações mássicas desejadas, os peitos de frango contendo os metabólitos foram individualmente liofilizados, pulverizados, peneirados a  $420 \mu\text{m}$ , e analisados por

cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em linha (Clae-EM/EM). Em seguida foram misturados a um peito de frango isento de metabólitos (branco de tecido) que foi igualmente processado. O material foi homogeneizado e o lote obtido foi envasado em frascos âmbar de borossilicato e tampa de borracha, com uma quantidade de amostra de aproximadamente 1,3 g. Após o envase, o material foi liofilizado novamente dentro dos frascos que, ao final, foram selados sob atmosfera de nitrogênio e fechados com lacre de alumínio. Após lacrados, todos os frascos do lote foram irradiados a 7 kGy no Centro Tecnológico do Exército (CTEx) [4].

**Tabela 1. Dados dos metabólitos de nitrofuranos**

<b>3-amino-2oxazolidinona (AOZ)</b>		
Fórmula molecular	$C_3H_6N_2O_2$	Fórmula estrutural
Massa molar	102,09 g/mol	
CAS	80-65-9	
<b>3-amino-5-morfolinometil-2-oxazolidinona (AMOZ)</b>		
Fórmula molecular	$C_8H_{15}N_3O_3$	Fórmula estrutural
Massa molar	201,22 g/mol	
CAS	43056-63-9	
<b>1-aminoidantoína (AHD)</b>		
Fórmula molecular	$C_3H_5N_3O_2$	Fórmula estrutural
Massa molar	115,091 g/mol	
CAS	6301-02-6	
<b>semicarbazida (SEM)</b>		
Fórmula molecular	$CH_5N_3O$	Fórmula estrutural
Massa molar	75,07 g/mol	
CAS	57-56-7	

CAS: Chemical Abstracts Service

### Uso pretendido

Este MRC é destinado à validação e ao controle de qualidade de métodos para determinação de metabólitos de nitrofuranos em músculo de peito de frango.

Devido à formação natural *in vivo* dos metabólitos conjugados às proteínas, a etapa de hidrólise é necessária para o uso deste material. A comutatividade deste material não foi estudada, tendo sido utilizada apenas a hidrólise ácida dos analitos, sem avaliação de outras formas de hidrólise. Dessa forma, os valores certificados apresentados se aplicam apenas a métodos de análise que têm como princípio a hidrólise ácida e a derivatização com 2-nitrobenzaldeído.

**Valor certificado**

O valor certificado é o que apresenta a mais elevada confiança na sua exatidão e para o qual todas as fontes de erro conhecidas ou potenciais foram pesquisadas e consideradas.

Os valores certificados de fração mássica de metabólitos de nitrofuranos em músculo de peito de frango liofilizado (não reconstituído) foram obtidos a partir da caracterização pela técnica Clae-EM/EM, após a hidrólise ácida e derivatização com 2-nitrobenzaldeído por 16 h e 37 °C. Portanto, esses valores são válidos para medições de metabólitos totais (livres + conjugados), utilizando métodos de análise que tenham como base esse mesmo princípio.

Os valores certificados com suas incertezas expandidas ( $U$ ) para um nível de confiança de aproximadamente 95 % e fator de abrangência  $k = 2$ , estão discriminados na Tabela 2:

**Tabela 2. Valores certificados para os metabólitos de nitrofuranos em músculo de peito de frango liofilizado, expressos em  $\mu\text{g}/\text{kg}$**

<i>Substância</i>	<i>Valor (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</i>	<i>U (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</i>
AOZ	5,4	1,2
AMAZ	5,49	0,85
AHD	5,1	1,2
SEM	6,01	0,85

A incerteza expandida foi calculada pela multiplicação do fator de abrangência com a combinação das contribuições de incerteza-padrão dos estudos de homogeneidade, estabilidade na condição de armazenamento, e caracterização [5, 6 e 7].

**Valor informativo**

Valor informativo é um valor não certificado que não atende aos requisitos da ABNT NBR ISO 17034 para a certificação e pode ou não ser fornecido com incerteza associada. Esta incerteza pode refletir apenas a precisão das medições e não incluir todas as fontes de incerteza ou refletir uma falta de concordância estatística suficiente entre diferentes métodos.

O valor informativo para o teor de umidade residual na matriz do MRC (frango liofilizado), com incerteza expandida para um nível de confiança de aproximadamente 95% e fator de abrangência ( $k = 2$ ), é de **(1,39 ± 0,25) g/100 g**.

**Rastreabilidade metrológica**

Os valores certificados de fração mássica dos metabólitos de nitrofuranos possuem rastreabilidade metrológica ao Sistema Internacional de Unidades (SI), que foi alcançada por meio do uso de procedimentos de medição potencialmente primários, como a gravimetria para o preparo das soluções de calibração, e a espectrometria de massas por diluição isotópica, utilizada como método de análise. Além disso, a pureza dos padrões utilizados no preparo das soluções de calibração foi determinada por ressonância magnética nuclear quantitativa (RMNq), empregando MRC de tereftalato de dimetila (TFDM) como padrão interno. A RMNq de  $^1\text{H}$  foi utilizada para os padrões AOZ, AMAZ e AHD, empregando como PI o TFDM TraceCERT® CRM (BCBL1702V) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA); enquanto que a RMNq de  $^{13}\text{C}$  foi utilizada para o padrão de SEM, empregando como PI um MRC de TFDM desenvolvido no Inmetro (MRC 8784.0001, Inmetro, Duque de Caxias, RJ, Brasil).

**Método analítico**

Os estudos de homogeneidade e de estabilidade, e a caracterização referentes às frações mássicas dos metabólitos de nitrofuranos foram realizados por Clae-EM/EM. Foi utilizado um sistema binário de Cromatografia Líquida Agilent 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA) acoplado a um espectrômetro de massas de sistema híbrido triploquadrupolo-LIT ("linear ion trap"), modelo 4000 QTRAP® (Applied Biosystems, Foster City, EUA). O método de diluição isotópica por curva de calibração, utilizando os padrões análogos e isotopicamente marcados como padrões internos (PI), foi empregado nos estudos de homogeneidade e estabilidade. O método diluição isotópica por *exact matching* foi utilizado para o procedimento de caracterização. O equipamento utilizado nas análises está localizado no Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico (LADETEC/IQ-UFRJ).

Os analitos foram extraídos por hidrólise ácida e derivatização com 2-nitrobenzaldeído por 16 h a 37 °C. Após a derivatização e ajuste de pH foram realizadas duas etapas de extração líquido-líquido (ELL) com acetato de etila, seguidas da evaporação do extrato e reconstituição com mistura metanol:água tipo I (50:50 v/v). Os extratos foram filtrados através de um filtro PVDF de 0,22  $\mu\text{m}$  (Merck Millipore Ltd., County Cork, Irlanda), transferidos para frascos de cromatografia de 2 mL, e analisados por Clae-EM/EM [4].

A separação foi feita usando uma coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (3,5  $\mu\text{m}$  x 4,6 mm x 150 mm, Agilent Technologies, Santa Clara, EUA) e eluição gradiente com acetato de amônio 0,05 mM : metanol (80:20 v/v) como eluente A, e metanol como

eluente B. A análise por espectrometria de massa foi realizada por ionização por *electrospray*, operando em modo positivo (ESI+). O monitoramento de reações múltiplas (MRM) foi empregado para análise quantitativa usando as seguintes transições para os metabólitos derivatizados e seus respectivos PI marcados: 236 > 134 (AOZ), 335 > 291 (AMZ), 249 > 104 (AHD), 209 > 192 (SEM), 240 > 134 (AOZ-D<sub>4</sub>), 340 > 296 (AMZ-D<sub>5</sub>), 252 > 104 (AHD-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>), 212 > 195 (SEM-<sup>13</sup>C-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>). Apenas na etapa de caracterização, as transições usadas para o analito AOZ foram: 236 > 149 (AOZ) e 240 > 149 (AOZ-D<sub>4</sub>).

A fração mássica de umidade residual no peito de frango liofilizado foi determinada usando um titulador coulométrico Karl Fischer (modelo 831, Metrohm, Herisau, Suíça) com gerador sem diafragma e equipado com um amostrador automático com forno (modelo 774, Metrohm Herisau, Suíça).

### **Subcontratação**

A irradiação do lote de MRC já envasado foi realizada pelo Centro Tecnológico do Exército (CTEx).

O Laboratório de Radioecologia e Alterações Ambientais, do Instituto de Física da Universidade Federal Fluminense (LARA/IF/UFF), foi subcontratado para realização de análise elementar acoplada à espectrometria de massas por razão isotópica (AE-EMRI). Essa subcontratação foi necessária para a determinação da pureza do padrão de cloridrato de semicarbazida.

### **Instruções para uso**

Antes de abrir o frasco, deixá-lo em temperatura ambiente até atingir o equilíbrio. Imediatamente após a abertura do frasco o conteúdo deverá ser homogeneizado vigorosamente com auxílio de uma espátula e as alíquotas para análise deverão ser tomadas logo em seguida. As alíquotas deverão ser reconstituídas com água Tipo 1, sendo que a quantidade de água a ser adicionada deve ser igual a 2,9 vezes a massa da alíquota. Após a adição de água o conteúdo deverá ser agitado vigorosamente por 10 segundos ou até homogeneização completa.

A quantidade mínima de amostra a ser analisada por alíquota é de 0,25 g ± 0,01 g de material liofilizado. O material é de uso único, ou seja, após aberto, não há garantia de que o conteúdo não utilizado no ensaio mantenha os seus valores certificados ao longo do tempo, mesmo se armazenado na temperatura indicada.

Os valores das propriedades estão certificados para o material liofilizado, na forma como é fornecido. Não é necessário realizar a determinação da umidade residual após a abertura do frasco. Como medida de controle, estudos foram realizados para a umidade residual das amostras, sendo verificadas homogeneidade e estabilidade suficientes desse parâmetro. Portanto, nenhuma fonte de variação que possa impactar nas frações mássicas dos metabólitos, e que não esteja contemplada nas incertezas, é esperada.

### **Transporte e armazenagem**

O MRC deve ser armazenado na temperatura de -20 °C ± 4 °C, ou em temperaturas inferiores. O transporte também deve ser realizado a temperaturas inferiores a -20 °C e, para isso, recomenda-se que seja em caixa com isolamento térmico contendo gelo seco.

Todas as informações referentes ao transporte e segurança estão contidas na FISPQ (Ficha de Informação de Segurança de Produtos Químicos), disponíveis no endereço eletrônico ([http://www.inmetro.gov.br/metcientifica/formularios/form\\_mrc.asp](http://www.inmetro.gov.br/metcientifica/formularios/form_mrc.asp)).

### **Prazo de validade**

O **MRC 8957.0001** é válido **por 20 meses** a partir da data de envio do material.

Este MRC deve ser manuseado e armazenado de acordo com as instruções contidas neste certificado. O certificado não terá valor caso o MRC seja danificado, contaminado ou alterado.

O Inmetro garante a integridade deste MRC até o seu primeiro uso.

O Inmetro mantém um programa de monitoramento de todos os MR e MRC. Qualquer alteração no valor informativo ou no valor certificado durante o prazo de validade será comunicada ao usuário.

Atribuições	Nomes
<b>Chefe da Divisão de Metrologia Química e Térmica</b>	Janaína Marques Rodrigues Caixeiro
<b>Chefe do Laboratório de Análise Orgânica</b>	Eliane Cristina Pires do Rego
<b>Responsável pelas medições analíticas</b>	Fernando Gustavo Marques Violante Evelyn de Freitas Guimarães
<b>Responsáveis pela avaliação dos resultados</b>	Eliane Cristina Pires do Rego Janaína Marques Rodrigues Caixeiro Bruno Carius Garrido Wagner Wollinger

### Observações

Os estudos para certificação deste Material de Referência foram realizados em parceria como o Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico (LADETEC/IQ-UFRJ).

A caracterização do material foi realizada no Inmetro, porém, uma comparação interlaboratorial foi realizada para conferir o valor de caracterização. Os laboratórios que participaram da comparação foram:

- LFDA/SP – Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de São Paulo, SP;
- NSF Bioensaios - Prestação de Serviços de Análises e Certificação Ltda, Rio Grande do Sul, RS;
- BVL – “The Federal Office of Consumer Protection and Food Safety” - Agência Federal de Proteção ao Consumidor e Segurança de Alimentos, Alemanha;
- Finnish Food Safety Authority, Laboratório Nacional de Referência (National Reference Laboratory, NRL), Finlândia.

### Histórico de revisão

Não se aplica

### Referências

- [1] ABNT NBR ISO 17034:2017 Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência.
- [2] ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017, Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração.
- [3] ABNT ISO GUIA 31:2017 Materiais de Referência – Conteúdo de certificados, rótulos e documentação associada.
- [4] Violante *et al.* Measurement, 2018, 129, 368-374.
- [5] ISO Guide 35:2017, Reference materials -- Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability.
- [6] Avaliação de dados de medição - Guia para a expressão de incerteza de medição – GUM 2008. Tradução da 1ª edição de 2008 da publicação Evaluation of measurement data - Guide to the expression of uncertainty in measurement – GUM 2008, do BIPM. Duque de Caxias - RJ, 2012. Publicado pelo Inmetro.
- [7] EURACHEM / CITAC GUIDE CG 4. Quantifying uncertainty in analytical measurement. 2.ed. London, 2000. 120 p.
- [8] May, W.; Parris, R.; Beck II, C.; Fassett, J.; Greenberg, R.; Guenther, F.; Kramer, G.; Wise, S.; Gills, T.; Colbert, J.; Gettings, R.; MacDonald, B.; Definition of Terms and Modes Used at NIST for Value-Assignment of Reference Materials for Chemical Measurements; NIST Special Publication 260-136, 2000; available at <http://ts.nist.gov/MeasurementServices/ReferenceMaterials/PUBLICATIONS.cfm>.

**Inmetro – Av. Nossa Senhora das Graças, 50 – Xerém – Duque de Caxias – RJ – Brasil – CEP: 25250-020 Dimci – Tel: (21) 2679 9077/9210 – e-mail: mrc-solicitacao@inmetro.gov.br**



DOCUMENTO ASSINADO ELETRONICAMENTE COM FUNDAMENTO NO ART. 6º, § 1º, DO [DECRETO Nº 8.539, DE 8 DE OUTUBRO DE 2015](#) EM 10/02/2022, ÀS 13:20, CONFORME HORÁRIO OFICIAL DE BRASÍLIA, POR

**ELIANE CRISTINA PIRES DO REGO**  
Chefe do Laboratório de Análise Orgânica



DOCUMENTO ASSINADO ELETRONICAMENTE COM FUNDAMENTO NO ART. 6º, § 1º, DO [DECRETO Nº 8.539, DE 8 DE OUTUBRO DE 2015](#) EM 14/02/2022, ÀS 15:20, CONFORME HORÁRIO OFICIAL DE BRASÍLIA, POR

**JANAÍNA MARQUES RODRIGUES CAIXEIRO**  
Chefe da Divisão de Metrologia Química e Térmica

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.inmetro.gov.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.inmetro.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

informando o código verificador **0943822** e o código CRC **1FDC76D1**.



MOD-Dimci-013 - Rev. 15 – Publicado Jan/21 - Responsabilidade: Dimci – Referência(s): NIG-Dimci-003