

Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos

**Estabelecimento de Parâmetros Operacionais,
Implementação de Ensaio de Proficiência e Avaliação Crítica
de Métodos Analíticos Empregados em Nutrição Animal**

Gilberto Batista de Souza

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de Concentração: Química Analítica.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira

SÃO CARLOS – SP

2007

Dedico este trabalho aos meus pais

Benevenuto (in memoriam) e Tereza

À minha querida esposa, Issara, e aos meus

filhos, Gilberto e Joana, ofereço.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma colaboraram com a realização deste trabalho, em especial:

À Dra Ana Rita de Araujo Nogueira porque sem o seu incentivo, confiança e apoio não seria possível realizar mais esta etapa de minha vida.

As Empresas e Instituições e aos responsáveis técnicos pelos laboratórios participantes do Ensaio de Proficiência, porque sem a colaboração efetiva no fornecimento dos resultados das análises não seria possível a realização deste trabalho.

Aos amigos e companheiros de trabalho da Embrapa Pecuária Sudeste.

Ao Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega, pelo incentivo e colaboração.

Ao Dr. Waldomiro Barioni Junior, pela colaboração e esclarecimento de conceitos de estatística.

À Embrapa Pecuária Sudeste por conceder a oportunidade de meu aperfeiçoamento profissional.

Ao programa de pós-graduação do Instituto de Química de São Carlos pela oportunidade.

Aos amigos do Laboratório de Nutrição Animal, Lourdes M. Sumi, Aparecida Silvestre, Gilberto C. Agostinho, Carlos H. Garcia, Maria Cristina Picchi, Marcos Rogério de Sousa e Victor Rogério Del Santo pelo apoio e colaboração.

Aos companheiros do Grupo de Análise Instrumental Aplicada (GAIA), Carla, Edvan, Evelin, Elma, Mário, Silvia, Rodolfo, Fernanda, Wladiana, pelo apoio e amizade.

Aos meus irmãos, Madalena, Osmar, Silvia, Mirian, Marcelo, Indiara, José Luiz, Cacaoio, Iara, Fernando, Roseli, Jussani, Rossi, Josoé, Lia Beatriz, Alfa Maria, pelo apoio e amizade.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	i
Lista de Tabelas.....	iii
Lista de Abreviaturas.....	v
Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
1 Introdução.....	2
1.1 Objetivos.....	5
2 Revisão de Literatura.....	7
2.1 Tipos de alimentos utilizados em nutrição animal.....	9
2.1.1 Alimentos volumosos.....	9
2.1.2 Alimentos concentrados.....	9
2.1.3 Misturas minerais	10
2.2 Fracionamento de Constituintes dos Alimentos	11
2.3 Controle de qualidade em análises químicas.....	15
2.4 Ensaio de Proficiência por Comparações Interlaboratoriais.....	17
2.4.1 Tipos de Ensaio de Proficiência.....	18
2.4.1.1 Programas de comparação e medição.....	19
2.4.1.2 Programas de ensaios interlaboratoriais.....	20
2.4.1.3 Programas de ensaios de partidas de amostras.....	20
2.4.1.4 Programas qualitativos.....	21
2.4.1.5 Programas de valor conhecido.....	21
2.4.1.6 Programas de processo parcial.....	22
2.4.2 Ferramentas estatísticas para avaliação de resultados em EP.....	22
2.4.2.1 Procedimentos para o cálculo da estatística de desempenho....	23

2.4.2.2 Procedimentos para a determinação do valor designado (\bar{X})...	27
2.4.2.3 Procedimentos para a determinação do desvio padrão alvo (σ_p).....	29
2.4.2.4 Tratamentos estatísticos de dados empregados em ensaios de proficiência.....	32
3 Material e Métodos.....	37
3.1 Participantes.....	38
3.2 Preparo dos materiais de ensaio.....	40
3.3 Cronograma.....	42
3.3.1 Envio dos resultados.....	43
3.4 Determinação da homogeneidade dos materiais de ensaio.....	44
3.5 Métodos analíticos utilizados.....	46
3.5.1 Procedimento empregado na determinação de matéria seca.....	47
3.5.2 Procedimento empregado na determinação de digestibilidade in vitro da matéria seca.....	47
3.5.3 Procedimento empregado na determinação de fibra em detergente ácido.....	48
3.5.3.1 Determinação de FDA empregando o procedimento original proposto por VAN SOEST (1963) (FDA1)	49
3.5.3.2 Determinação de FDA empregando o procedimento proposto por SOUZA, (1999) (FDA2).....	50
3.5.3.3 Determinação de FDA empregando equipamento marca Foss Tecator AB.....	50
3.5.3.4 Procedimento empregado na determinação de fibra em detergente ácido empregando a metodologia “Nylon bag”.....	51
3.5.4 Procedimento empregado na determinação de fibra em detergente neutro (FDN)	52
3.5.4.1 Procedimento empregado na determinação de FDN originalmente proposto por Van Soest (FDN1).....	53
3.5.4.2 Determinação de FDN - procedimento proposto por SOUZA, et al, 1999 (FDN2).....	53
3.5.4.3 Determinação de FDN marca Foss Tecator AB (FDA3).....	54

3.5.4.4 Determinação de FDN empregando a metodologia “Nylon bag”.....	54
3.5.5 Procedimento empregado na determinação de proteína bruta (PB).....	55
3.5.5.1 Determinação de PB empregando sistemas não automatizados (PB1).....	56
3.5.5.2 Determinação de PB empregando equipamentos automatizados (PB2).....	58
3.5.6 Procedimento empregado na determinação de extrato etéreo (EE).....	58
3.5.6.1 Determinação de EE empregando extrator tipo Soxhlet (EE1, EE2, EE3 e EE4).....	59
3.5.6.2 Determinação de EE empregando extrator tipo Goldfish (EE5 e EE6).....	59
3.5.6.3 Determinação de EE empregando extrator automatizado tipo Soxtec™ (EE7).....	60
3.5.6.4 Determinação de EE empregando extrator automatizado XT20 Fat Analyzer, (EE8).....	60
3.5.7 Procedimento empregado na determinação de lignina (LIG).....	61
3.5.7.1 Procedimento empregado na determinação de lignina pela oxidação com ácido sulfúrico a 72 % (m/v); (LIG1 e LIG2).....	63
3.5.7.2 Procedimento empregado na determinação de lignina pela oxidação com permanganato de potássio (LIG3).....	64
3.5.8 Procedimento empregado na determinação de cinzas.....	64
3.5.9 Procedimentos empregados na determinação dos constituintes inorgânicos (macro e micronutrientes)	65
3.5.9.1 Procedimentos de digestão das amostras por via seca (VS1; VS2 e VS3)	67
3.5.9.2 Procedimentos de digestão das amostras por via úmida (VU4; e VU5).....	67
3.5.9.3 Procedimentos empregados para a quantificação dos constituintes inorgânicos (macro e micronutrientes).....	68
3.6 Avaliações estatísticas.....	69

3.6.1 Avaliação do intervalo de aceitação dos resultados.....	70
3.6.2 Métodos aplicados para a exclusão de resultados dispersos ("outliers").....	71
3.6.3 Determinação do valor designado (\bar{X}) e do valor alvo para o desvio padrão (s).....	72
3.6.4 Avaliação de desempenho.....	75
4 Resultados e Discussão	78
4.1 Resultados do teste de homogeneidade.....	78
4.2 Avaliação dos métodos utilizados no EPLNA.....	80
4.3 Avaliação da variabilidade interlaboratorial.....	82
4.3.1 Avaliação da distribuição dos resultados analíticos das amostras de volumoso e concentrado.....	83
4.3.2 Avaliação da distribuição dos resultados dos ensaios referentes às amostras de mistura mineral.....	90
4.3.3 Resultados das amostras repetidas.....	93
4.3.3.1 Amostra de volumoso.....	93
4.3.4 Avaliação dos diferentes procedimentos estatísticos adotados para a definição do valor designado e do intervalo de aceitação	98
4.3.4.1 Testes para exclusão de "outliers".....	98
4.3.4.2 Avaliação do intervalo de aceitação.....	100
4.3.5 Avaliação do desempenho dos laboratórios.....	106
4.3.6 Resultados das amostras referência.....	109
5 Conclusões	114
6 Anexos.....	116
7 Referências Bibliográficas	122

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Diferentes níveis que asseguram a qualidade de medições para química analítica e laboratórios de alimentos.....	17
Figura 2.2	Modelo da curva de distribuição normal padrão caracterizada pela média (\bar{X}) igual a zero e desvio padrão (σ) igual a 1.....	24
Figura 2.3	Número total de outliers detectado pelos diferentes testes específicos para essa definição.....	33
Figura 2.4	Correlação entre os índices resumidos para avaliação do desempenho de laboratórios em Ensaios de Proficiência....	34
Figura 2.5	Critérios estatísticos utilizados para o cálculo do valor designado e do intervalo de aceitação.....	35
Figura 3.1	Perfil dos participantes no EPLNA.....	40
Figura 3.2	Tela de acesso à digitação de resultados no programa SEPROLAB.....	43
Figura 3.3	Tela do programa para a digitação de resultados no programa.....	44
Figura 3.4	Esquema demonstrativo do modelo adotado para os testes de homogeneidade.....	45
Figura 3.5	Fórmulas utilizadas para verificação de “outliers pelo teste de Dixon.....	71
Figura 4.1	Distribuição dos resultados fornecidos pelos laboratórios referentes ao ensaio FDN para as amostras de volumoso e concentrado.....	85
Figura 4.2	Distribuição dos resultados do ensaio PB para as amostras de volumoso e concentrado.....	86
Figura 4.3	Distribuição dos resultados do ensaio extrato etéreo (EE) das amostras de volumoso e concentrado.....	86
Figura 4.4	Distribuição dos resultados do ensaio lignina (LIG) para as amostras de volumoso e concentrado.....	87
Figura 4.5	Distribuição dos resultados do ensaio cálcio apresentado pelas amostras de volumoso e concentrado.....	89
Figura 4.6	Distribuição dos resultados do ensaio manganês para as amostras de volumoso e concentrado.....	89
Figura 4.7	Valores dos coeficientes de variação (cv %) dos ensaios macro- e micronutrientes nas amostras de mistura mineral.	91
Figura 4.8	Gráfico Box-Plot para o ensaio cálcio (Ca) nas amostras de mistura mineral.....	92
Figura 4.9	Gráfico Box-Plot para o ensaio magnésio (Mg) nas amostras de mistura mineral.....	92

Figura 4.10	Resultados do ensaio extrato etéreo (EE) para mesma amostra de volumoso (A3V01 e A3V07).....	94
Figura 4.11	Diagrama de dispersão para o ensaio extrato etéreo (EE) da amostra de volumoso repetida, A3V01 e A3V07.....	95
Figura 4.12	Diagrama de dispersão para o ensaio referente à determinação de potássio (K) na amostra de volumoso que foi repetida (A3V01 e A3V07)	97
Figura 4.13	Diagrama de dispersão para o ensaio referente à determinação de cobre (Cu) na amostra de volumoso que foi repetida (A3V01 e A3V07)	97
Figura 4.14	Diagrama de dispersão para o ensaio manganês (Mn) na amostra de volumoso que foi repetida (A3V01 e A3V07).....	98
Figura 4.15	Número de resultados “outliers” detectado em amostras de volumosos, concentrado e mistura mineral do terceiro ano do EPLNA.....	100
Figura 4.16	Comparação dos índices z calculados por meio dos métodos A, B, C, D, E e F, para MS para a amostra “feno de <i>coast cross</i> ” (A3V01)	103
Figura 4.17	Comparação dos índices z calculados por meio dos métodos A, B, C, D, E e F, para FDN na amostra “feno de <i>coast cross</i> ” (A3V01)	104
Figura 4.18	Gráfico de Box-Plot com os índices de desempenho obtidos por ano para as amostras de volumoso, concentrado e mistura mineral.....	107
Figura 4.19	Índice de desempenho médio por categoria dos participantes. UE – Unidades da Embrapa, IES – Instituições de ensino superior; IPE – Instituições de pesquisa estaduais; EIP – Empresas da iniciativa privada...	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Macro e microelementos essenciais para as espécies domésticas e suas funções.....	11
Tabela 3.1	Descrição das Unidades da Embrapa participantes do EPLNA.....	38
Tabela 3.2	Descrição das instituições de pesquisa estaduais participantes do EPLNA.....	39
Tabela 3.3	Descrição das instituições de ensino superior participantes do EPLNA.....	39
Tabela 3.4	Descrição das empresas da iniciativa privada participantes do EPLNA.....	40
Tabela 3.5	Composição dos lotes com identificação dos materiais de ensaio utilizados no terceiro ano do EPLNA.....	42
Tabela 3.6	Cronograma para o EPLNA.....	42
Tabela 3.7	Determinações, abreviações e unidades de concentração previstas no EPLNA para as amostras de volumoso e concentrado.....	46
Tabela 3.8	Variações no tempo de secagem para a determinação de matéria seca.....	47
Tabela 3.9	Diferenças observadas na determinação de FDA.....	49
Tabela 3.10	Procedimentos utilizados na determinação de FDN.....	53
Tabela 3.11	Diferenças observadas nos procedimentos para determinação de proteína bruta.....	56
Tabela 3.12	Procedimentos empregados pelos laboratórios participantes do EPLNA para a determinação de extrato etéreo.	61
Tabela 3.13	Procedimentos para a determinação de lignina utilizados pelos laboratórios participantes do EPLNA.....	63
Tabela 3.14	Procedimentos empregados pelos laboratórios participantes do EPLNA para a determinação do teor de cinzas.....	65
Tabela 3.15	Procedimento de digestão das amostras para a determinação de macro e micronutrientes empregados pelos laboratórios participantes do EPLNA.....	66
Tabela 3.16	Procedimentos empregados para a determinação dos teores de macro e micronutrientes pelos laboratórios participantes do EPLNA.....	69
Tabela 3.17	Procedimentos estatísticos adotados para estabelecer o valor designado e desvio padrão utilizados para o cálculo do “Índice z”	70

Tabela 4.1	Resultados dos ensaios proteína bruta (PB) e cálcio (Ca), obtidos no teste de homogeneidade dos materiais que foram utilizados no Ensaio de Proficiência.	79
Tabela 4.2	Informações sobre os métodos analíticos utilizados pelos laboratórios participantes do EPLNA.	81
Tabela 4.3	Coefficiente de variação médio observado nos ensaios avaliados.	84
Tabela 4.4	Coefficiente de variação dos ensaios macro- e micronutrientes das amostras de volumoso e concentrado.	88
Tabela 4.5	Coefficiente de variação dos resultados dos ensaios referentes aos macro- e micronutrientes nas amostras de mistura mineral.	91
Tabela 4.6	Valores dos parâmetros obtidos com os diferentes procedimentos estatísticos para a amostra de volumoso “feno de <i>coast cross</i> ” (A3V01).	101
Tabela 4.7	Valores dos parâmetros obtidos com os diferentes procedimentos estatísticos para a amostra de concentrado “ração para vacas secas” (A3V03).	102
Tabela 4.8	Informações sobre o número de ensaios com índice $z > 2$ em relação ao total de ensaios realizados nas amostras “feno de <i>coast cross</i> ” (A3V01) e “ração para vacas secas” (A3C03).	105
Tabela 4.9	Valores dos índices de desempenho médios obtidos nos três anos de EPLNA.	108
Tabela 4.10	Resultado estatístico da amostra referencia de volumoso: ARV - <i>Capim Estrela Roxa</i> .	110
Tabela 4.11	Resultado estatístico da amostra referencia de concentrado: ARC - <i>Farelo de Soja</i> .	111
Tabela 4.12	Resultado estatístico da amostra referencia de mistura mineral: ARM - <i>mistura mineral para vacas em lactação</i> .	112

LISTA DE ABREVIATURAS

ANN	Análise por Ativação Neutrônica
CQ	Controle de qualidade
CIQ	Controle interno de qualidade
CEQ	Controle externo de qualidade
CNPS	Cornell net carbohydrate protein system
Ca	Cálcio
Cu	Cobre
DA	Detergente ácido
DIVMS	Digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca
DN	Detergente neutro
EE	Extrato etéreo
EP	Ensaio de proficiência
EPLNA	Ensaio de Proficiência para Laboratórios de Nutrição Animal
F-AAS	Espectrometria de absorção atômica com chama
FB	Fibra bruta
FDA	Fibra em detergente ácido
FDN	Fibra em detergente neutro
Fe	Ferro
IC	Intervalo de confiança
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado
K	Potássio
Mg	Magnésio
Mn	Manganês
MS	Matéria seca
Na	Sódio
P	Fósforo
Pb	Chumbo
PB	Proteína bruta
Zn	Zinco
TNT	Tecido não ecido

RESUMO

Ensaio de Proficiência para Laboratórios de Nutrição Animal (EPLNA) foi implementado com o objetivo de avaliar a variabilidade dos resultados analíticos e o desempenho de laboratórios de nutrição animal instalados no Brasil. A estrutura e a normatização foram planejadas em conformidade com protocolos internacionais para laboratórios analíticos. São reportados e discutidos os resultados referentes a três anos consecutivos. Participaram do ensaio 43 laboratórios provenientes de instituições de pesquisas estaduais, universidades federais e estaduais e empresas privadas. Foram avaliados os resultados referentes aos ensaios de matéria seca, digestibilidade “in vitro” da matéria seca, fibra em detergente ácido, fibra em detergente neutro, proteína bruta, extrato etéreo, lignina, cinzas, nitrogênio não protéico, nitrogênio insolúvel em detergente neutro, nitrogênio insolúvel em detergente ácido e os macro e micro nutrientes (Ca, P, Mg, K, S, Cu, Fe, Mn, Zn e Na). O grupo de amostras utilizadas, com diferentes características físicas e químicas, foi constituído de forrageiras, alimentos concentrados e mistura mineral. Para o estudo dos valores designados foram considerados os valores de consenso dos laboratórios participantes, sendo utilizada a estatística clássica ou robusta para a definição destes parâmetros. O projeto estatístico, baseado no índice z, mostrou-se eficaz para identificar o desempenho dos laboratórios, sendo observado o valor 76,9% como índice de desempenho médio dos laboratórios com conceito satisfatório. Os ensaios referentes às determinações de extrato etéreo, lignina e Na apresentaram maior variabilidade interlaboratorial ($cv_{EE} = 42,7\%$, $cv_{Lignina} = 59,1\%$ e $cv_{Na} = 121,2\%$), considerando todas as amostras estudadas durante os três anos de avaliação.

ABSTRACT

Proficiency Testing for Animal Nutrition Laboratories was implemented with the objective to evaluate the variability of the analytical results and the performance of Brazilian animal nutrition laboratories. The structure and normalization were planning in accordance with analytical laboratories international protocols. Three years results are reported and discussed. A number of 43 laboratories, from state researches institutes, federal and state universities, and private companies participated of the trial. The performance of the next trial were evaluated: dry material, digestibility "in vitro" of the dry material, acid detergent fiber, neutron detergent fiber, crude protein, ether extract, lignin, ash, non protein nitrogen, insoluble nitrogen in neutron detergent, insoluble nitrogen in acid detergent, and the macro and micronutrients (Ca, P, Mg, K, S, Cu, Fe, Mn, Zn, and Na). The studied sample group, with different physical and chemical characteristics, was composed by forage, concentrate feed, and mineral mixing. To study the designated values, the consensus values provided by the laboratories were considered, and classical or robust statistic was used to define these parameters. The statistical design, based on z score, proved to be adequate to identify the laboratories performance, and the 76.9% value was observed as medium score of the laboratories with satisfactory concept. The ether extract, lignin and Na trials presented higher laboratorial varieties ($cv_{EE} = 42.7\%$, $cv_{Lignin} = 59.1\%$ e $cv_{Na} = 121\%$), considering the evaluated samples during the considered three years.

Capítulo 1



Introdução

1 – Introdução

Entre inúmeras medições químicas realizadas para diferentes propósitos, destaca-se a garantia da qualidade de alimentos (MAIER et al, 1997; ANALYTICAL METHODS COMMITTEE, 1995). Entretanto, uma medida não pode ser interpretada a não ser que o valor da incerteza associada seja conhecido, sendo que essa incerteza deve ser continuamente reavaliada por apresentar variações dentro do próprio laboratório e entre laboratórios (ANALYTICAL METHODS COMMITTEE, 1995; CHUI et al, 2004). Além do emprego de materiais de referência para avaliação da exatidão de resultados analíticos, a participação em esquemas de ensaios de proficiência (programas interlaboratoriais), onde vários laboratórios realizam ensaios na mesma amostra empregando métodos independentes, pode ser uma solução para a garantia de qualidade de um laboratório.

De acordo com padrões internacionais da ISO/IEC 17025 (2001), laboratórios devem implementar e manter um sistema de qualidade apropriado para o escopo de suas atividades (SIMONET, 2005) sendo que os procedimentos típicos de controle de qualidade incluem análises de amostras referência e amostras fortificadas, análises em duplicatas, brancos

analíticos e participação em ensaios de proficiência (EP). Hertz estimou que, em 1988, 250 milhões de análises químicas eram realizadas a cada dia nos EUA e em torno de 10% destas análises apresentavam baixa qualidade dos resultados sendo então, repetidas a um custo adicional de U\$ 5 bilhões (MAIER et al, 1997). Dependendo do setor, o impacto econômico no custo das análises pode representar uma parte significativa no orçamento de uma indústria, podendo influenciar de forma indireta nos preços finais dos produtos (VENELINOV & QUEVAUVILLER, 2003).

A participação em atividades de EP fornece informações para que o laboratório possa detectar resultados com desempenhos insatisfatórios e aplicar ações corretivas ou preventivas, alcançando um percentual mínimo de acertos para atingir níveis de desempenho satisfatórios. A participação em EP é um dos requisitos da norma ISO/IEC 17025 (2001) para acreditação ou habilitação de um determinado ensaio junto aos órgãos reguladores nacionais e internacionais na área de metrologia (ABNT ISO / IEC 17025, 2001; LAWN et al, 1997). Esses programas têm por finalidade demonstrar o desempenho e a competência do laboratório na realização dos ensaios para os quais se pretende ser acreditado.

A estrutura organizacional de Ensaio de Proficiência em Laboratórios Analíticos emprega procedimentos operacionais baseados nas normas ABNT ISO/IEC GUIA 43 e no Protocolo Internacional Harmonizado para Ensaio de Proficiência em Laboratórios Analíticos (Químicos). Assim, para qualquer analito ou espécie de amostra, a organização segue a seguinte disposição: um coordenador organiza a preparação, ensaio de homogeneidade e validação do material de ensaio; as amostras são

distribuídas de acordo com um cronograma; os laboratórios participantes analisam e enviam os resultados para a coordenação; os resultados do participante são submetidos à avaliação estatística e o desempenho é informado eles; um relatório deve ser elaborado a cada rodada, contendo informações e análises críticas do desempenho do programa (ABNT ISO/IEC 43, 1999; THOMPSON et al, 2006).

Baseado nestes critérios e com o propósito de conferir confiança e credibilidade dos resultados fornecidos por laboratórios que executam análise de alimentos utilizados em Nutrição Animal (forrageiras, concentrados e misturas minerais), foi proposta a criação e implementação de um programa interlaboratorial, intitulado: “Ensaio de Proficiência para Laboratórios de Nutrição Animal (EPLNA)”, cuja estrutura e a normatização foi planejada em conformidade com o Protocolo Internacional Harmonizado para Ensaio de Proficiência em Laboratórios Analíticos (Químicos).

Para maior abrangência do programa foram contatados laboratórios de diferentes instituições, representantes de todas as regiões brasileiras. Da mesma forma, os principais ensaios executados por laboratórios de Nutrição Animal foram incluídos no programa, tais como: matéria seca (MS), digestibilidade “in vitro” da matéria seca (DIVMS), fibra em detergente ácido (FDA), fibra em detergente neutro (FDN), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), lignina, cinzas e os macro e micro nutrientes (Ca, P, Mg, K, Na, Cu, Fe, Mn e Zn).

Com a implementação e acompanhamento do EP, tencionou-se prover uma avaliação regular e objetiva do desempenho de uns laboratórios de Nutrição Animal.

1.1 – Objetivos

Entre os objetivos do presente estudo está: implementar ensaio de proficiência para laboratórios de nutrição animal, estabelecendo parâmetros operacionais e estatísticos para avaliação de resultados de análises; avaliar e comparar o desempenho de diferentes métodos analíticos utilizados; promover uma melhoria quanto à qualidade dos dados analíticos por meio da comparação regular dos resultados de um laboratório com os de outros laboratório; produzir materiais de referência para utilização no controle interno de qualidade (CIQ); fornecer regularmente uma avaliação de desempenho enfocando a exatidão e precisão dos resultados analíticos; a reduzir a variabilidade dos resultados fornecidos por diferentes laboratórios, assegurando a uniformidade e comparabilidade das medições, e gerar maior confiança dos analistas no fornecimento dos resultados aos clientes.

Capítulo 2

Revisão de Literatura

2 – Revisão de Literatura

Amostras submetidas a análises químicas são, em geral, materiais ligados às mais diferentes atividades, tais como ambiente, agricultura, biologia, engenharia, geologia, medicina e pecuária. Essas atividades, baseando-se na composição química daqueles materiais, tomam decisões importantes para o desenvolvimento de novos produtos, verificação dos limites dos níveis de garantia e estimativa dos rendimentos e dos custos de produção.

Nesse contexto, se inserem atividades como a pecuária (p.ex.: bovinocultura, suinocultura, ovinocultura, avicultura, etc.), a qual é parte importante de um dos principais setores da economia brasileira, o agronegócio. Esse setor é o responsável por cerca de 1/3 do produto interno bruto do País, empregando aproximadamente 38 % da mão de obra e respondendo por cerca de 36 % das importações (Portal do Agronegócio, 2007, MAPA, 2007).

Considerando que na avicultura, suinocultura e em sistemas de confinamento de bovinos a alimentação representa para o produtor cerca de 70 % dos custos de produção (NRC, 1996; LIMA e NONES, 1997) e que segundo a Associação Nacional dos Fabricantes de Alimentos (ANFAL, 2000), a avicultura e a suinocultura juntas consomem quase 90% das rações produzidas no Brasil, é possível assegurar que as análises químicas dos

alimentos fornecidos para animais (*análises bromatológicas*) representam fonte de informação fundamental para a adequação de dietas nos mais variados sistemas de produção.

Em relatório publicado pela “Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO” é enfatizado o impacto da qualidade dos alimentos na alimentação animal, destacando a importância da qualidade dos resultados das análises: “os resultados das análises de alimentos fornecem informações para os produtores otimizarem a utilização dos nutrientes na alimentação animal; para os fabricantes de alimentos prepararem rações concentradas e misturas minerais de forma adequada para diferentes sistemas de produção; e para os pesquisadores relacionarem o desempenho animal com as características nutricionais de novas variedades de plantas” (FAO, 2004).

Nesse enfoque, a credibilidade dos resultados das análises químicas quantitativas torna-se fundamental para cada propósito pretendido. Logo, para que essa confiabilidade seja alcançada, o laboratório deve ter procedimentos de garantia da qualidade, para assegurar junto a seus clientes que são capazes de fornecer dados com a qualidade requisitada.

Tais medidas incluem o uso de métodos de análise validados; o uso de procedimentos internos de controle de qualidade, como o emprego de amostras de referência; e procedimento externo de controle de qualidade, como a participação em esquemas de ensaios de proficiência e acreditação (EURACHEM/CITAC, 1998).

2.1 – Tipos de alimentos utilizados em nutrição animal.

Em geral, as principais fontes de nutrientes empregadas na dieta alimentar de animais são provenientes de forragens, rações concentradas e misturas minerais, sendo esses divididos em alimentos volumosos, concentrados e misturas minerais.

2.1.1 – Alimentos volumosos: o termo forragem, qualificado como alimento volumoso, é definido como: partes comestíveis das plantas, exceto os grãos, que podem servir na alimentação dos animais em pastejo, ou colhidas e fornecidas (FGTC, 1992). As forrageiras constituem a base da dieta dos ruminantes e são encontradas numa grande variedade de espécies representadas por gramíneas e leguminosas.

Com grande potencial forrageiro, as gramíneas tropicais são amplamente empregadas em sistemas intensivos de produção, constituindo-se na fonte de alimento mais barato disponível. Quando fornecidas em quantidades suficientes, oferece os nutrientes necessários para o bom desempenho dos animais (BELARMINO et al, 2001). As leguminosas em geral apresentam valor nutritivo superior, se comparadas com as gramíneas. No entanto, apresentam na sua composição elevado teor de taninos, que têm a capacidade de formar complexos com a fração protéica, reduzindo a sua degradabilidade no rumem, e conseqüentemente sua disponibilidade (VAN SOEST, 1994).

2.1.2 – Alimentos concentrados: são aqueles com menos de 18% de fibra bruta na matéria seca e podem ser classificados como protéicos (quando têm mais de 20% de proteína na matéria seca), como é o caso das tortas de

algodão, farelos de soja etc., ou energéticos (com menos de 20% de proteína na matéria seca) como é o milho, farelo de trigo, farelo de arroz, etc. (CNPGC, 2007). Geralmente quando misturados com alimentos volumosos são denominados de rações balanceadas (relação volumoso:concentrado), os quais são fornecidos em quantidades necessárias para cada tipo de animal e sistema de produção.

2.1.3 – Misturas minerais: a suplementação mineral visa suprir os animais de nutrientes inorgânicos que estão presentes em quantidades insuficientes nas forrageiras. O balanceamento da dieta, por meio de misturas minerais, tem o objetivo de complementar todos os nutrientes essenciais ao bom desempenho reprodutivo e produtivo, buscando atender as demandas metabólicas dos animais. Aqueles constituintes inorgânicos cuja demanda nutricional são maiores, são conhecidos como macronutrientes. Nesse grupo estão Ca, Mg, P, K, Na, S e Cloretos. Os elementos inorgânicos requeridos em menores quantidades, miligramas ou microgramas, são conhecidos como micronutrientes. Nesse grupo estão Co, Cu, Fe, Mn, Zn, Mo, Se e o Iodeto (NRC, 2001).. Na Tabela 1 são apresentados alguns dos macro e micronutrientes, suas funções e principais fontes utilizadas na formulação de misturas minerais.

Tabela 2.1. Macro e microelementos essenciais para as espécies domésticas e suas funções (McDowell, 1999).

Minerais	Funções Principais	Principais Fontes
Macronutrientes		
Cálcio (Ca)	Formação de ossos e dentes; excitação muscular, sobretudo cardíaca; coagulação sangüínea; integridade da membrana; produção de leite.	Carbonato de cálcio; Calcário calcítico; Fosfato bicálcico
Magnésio (Mg)	Atividade neuromuscular e nervosa; transferência de energia; participação no crescimento ósseo; participação no metabolismo dos carboidratos; participação no metabolismo dos lipídeos.	
Fósforo (P)	Formação óssea e dentária; formação da coluna; participando, assim, na transmissão dos impulsos nervosos; atividade enzimática, sobretudo como coenzima de vários complexos da vitamina B; fosforilação para a formação de ATP.	Fosfato bicálcico; Fosfato de sódio; Fosfato de potássio
Potássio (K)	Balanço osmótico e hídrico corporal; participação no metabolismo protéico e dos carboidratos; integridade da atividade muscular e nervosa.	Cloreto de potássio; Sulfato de potássio; Sulfato de magnésio e potássio
Enxofre (S)	Metabolismo e síntese protéica; metabolismo das gorduras e dos carboidratos; síntese de vitaminas do complexo B.	Sulfato de cálcio (gesso); Sulfato de potássio; Sulfato de magnésio e potássio
Micronutrientes		
Cobre (Cu)	Ativador enzimático envolvendo o transporte e a transferência de oxigênio, metabolismo dos aminoácidos e do tecido conectivo.	Sulfato de cobre; Carbonato de cobre
Ferro (Fe)	Transporte de oxigênio e respiração celular.	Nitrato de cobre; Óxido de ferro; Carbonato de ferro Sulfato de ferro
Manganês (Mn)	Integridade da matriz orgânica óssea; ativador enzimático, sobretudo no metabolismo dos aminoácidos e dos ácidos graxos.	Sulfato de manganês; Óxido de manganês
Zinco (Zn)	Ativador enzimático, principalmente nos processos de formação óssea, do metabolismo dos ácidos nucléicos, do processo da visão, do sistema imunológico e do sistema reprodutivo.	Carbonato de zinco; Cloreto de zinco; Sulfato de zinco; Óxido de zinco

Fonte: McDowell, 1999

2.2 – Fracionamento de Constituintes dos Alimentos

Os métodos analíticos propostos por Weende são os mais antigos. Einhoff em 1809 preparou a fibra pela extração com álcool, alcali e ácidos diluídos (VAN SOEST, 1963). Esses procedimentos para avaliar a qualidade dos alimentos que são fornecidos na dieta de ruminantes são empregados até hoje, há mais de 100 anos, por alguns laboratórios. Consistem nas

seguintes etapas: determinação da matéria seca a 100 °C (MS); extração com éter para estimar a concentração de lipídeos (Extrato Etéreo – EE); refluxo com solução diluída de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 1,25% (v/v)) e hidróxido de sódio (NaOH 1,25% (m/v)) estimando o resíduo orgânico insolúvel como fibra bruta (FB); teor de cinzas determinado pela calcinação da amostra a 600 °C, e proteína bruta (PB) determinada a partir da determinação de nitrogênio pelo método da destilação proposto por Kjeldahl e a consideração que cerca de 16 % do N nesse tipo de amostra está na forma protéica (NT x 6,25) (SILVA & QUEIROZ, 2002; VAN SOEST, 1994).

Com o objetivo de determinar a parede celular insolúvel e fracionar seus componentes (hemicelulose, celulose e lignina), VAN SOEST (1963) propôs método de extração baseado na solubilização de constituintes do conteúdo celular. Por meio do emprego de uma solução neutra de lauril sulfato de sódio (pH 7,0) e EDTA, a qual recupera a maior parte dos componentes da parede celular, determinou a Fibra em Detergente Neutro (FDN). Porém, no resíduo insolúvel (FDN) poderá ainda restar proteínas insolúveis, nitrogênio ligado e alguns minerais.

Com a finalidade de solubilizar a proteína insolúvel e a hemicelulose, outro procedimento de extração foi proposto, denominado de Fibra em Detergente Ácido (FDA), o qual, por meio de fracionamento, possibilita também determinar o teor de lignina e celulose sequencialmente (VAN SOEST & WINE, 1968).

Na FDN alguns componentes do alimento como amido, compostos de “Maillard”, e minerais do solo poderão interferir nos resultados. A proteína insolúvel, bem como os compostos de “Maillard” presentes no resíduo

poderão ser quantificados e subtraídos. Através da calcinação do resíduo é possível determinar a percentagem dos constituintes inorgânicos. O amido poderá ser eliminado através do pré-tratamento com a enzima amilase termoestável durante a solubilização do conteúdo celular (SOUZA et al, 1999).

Embora a análise química seja o ponto de partida para se determinar o valor nutritivo dos alimentos, a utilização dos nutrientes ingeridos pelo animal depende das diferentes anatomias e fisiologias existentes nos tratos digestivos das várias espécies animais. Deste modo, a flora microbiana dos ruminantes pode aproveitar materiais de baixo valor nutritivo, assimilando nutrientes para desenvolver o seu crescimento e desempenhar as suas funções. Do contrário, os suínos e as aves necessitam receber uma ração altamente digestível para obterem um bom desempenho.

Assim, a determinação da quantidade de nutrientes digestíveis de um determinado alimento é fundamental para se conhecer o valor nutritivo desse alimento que é fornecido para cada espécie animal. Nesse enfoque, dentre as técnicas para predizer a quantidade de nutrientes digestíveis totais fornecidos para animais ruminantes, o método de digestibilidade “in vitro” da matéria seca (DIVMS), proposto por TILLEY & TERRY (1963) é amplamente empregado em laboratórios de nutrição animal.

O método consiste em dois estágios de incubação da amostra: no primeiro estágio a incubação da amostras ocorre na presença dos microorganismos presentes no fluído ruminal, sob condições anaeróbicas à 39°C e pH 6,9, reproduzindo assim as condições do rúmen-retículo; no segundo estágio, a atividade microbiana é cessada por meio da redução do

pH para $\geq 2,0$, sendo em seguida, pela adição de solução da enzima pepsina, iniciada a digestão enzimática. A quantidade de matéria seca residual após as duas etapas é considerada como fração não digestível do alimento.

A maioria dos métodos analíticos empregados na avaliação de alimentos e de subprodutos utilizados na alimentação de animais são procedimentos que quantificam frações dos constituintes dos alimentos, cuja composição química não é tão bem definida (matrizes orgânicas de constituições complexas), como exemplo as determinações de fibras, digestibilidade e extrato etéreo. Dessa forma, ao contrário dos métodos que quantificam um analito individual ou um composto químico bem definido, a maioria dos métodos utilizados em laboratórios de nutrição animal é de difícil padronização, embora sejam fundamentais na avaliação da qualidade dos alimentos.

Dentre os requisitos essenciais para evidenciar a qualidade de um trabalho laboratorial e fornecer confiabilidade aos resultados emitidos, a escolha adequada da metodologia analítica é sem dúvida nenhuma de grande relevância.

LANARI et al. (1991) conduziu um estudo interlaboratorial com 20 diferentes análises de alimentos, contemplando amostras de forrageiras, alfafa, polpa de beterraba e levedura de cerveja. Os autores encontraram coeficientes de variação (**cv**) elevados para algumas determinações como: extrato etéreo (EE), $cv = 17,8 \%$; lignina, $cv = 27,3 \%$; e fibra em detergente neutro (FDN), $cv = 7,4 \%$. Para a determinação de matéria seca (MS),

proteína bruta (PB), fibra bruta (FB), cinzas e fibra em detergente ácido (FDA) foram obtidos **cv** inferiores a 5 %.

Outro estudo interlaboratorial para avaliar métodos de preparo de amostras e de quantificação de constituintes inorgânicos, foi conduzido por CHUI et al. (2004) para avaliação de diferentes técnicas analíticas empregadas na determinação de cálcio, alumínio, ferro, titânio e manganês em amostra de silício metálico candidato a material de referência. Os resultados indicaram que as diferentes formas adotadas pelos laboratórios para digestão da amostra e as diferentes linhas de emissão quando se empregou espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e espectrometria de absorção atômica com chama (F-AAS) influenciaram na dispersão dos resultados entre os laboratórios.

2.3 – Controle de qualidade em análises químicas

O controle e a garantia da qualidade são aspectos comuns do trabalho diário em laboratórios. As atividades são freqüentemente geridas segundo padrões internacionais, como as normas ISO 9000 ou ISO/IEC 17025 (TAVERNIERS et al, 2004). Se os laboratórios individualmente podem confiar nos dados obtidos em outros laboratórios, a duplicação de experimentos pode ser evitada, reduzindo assim desperdício de tempo e recursos, pela diminuição de reanálises, além de ser ambientalmente adequada, pela redução da geração de resíduos químicos. A qualidade comparável de resultados forma a base da aceitação mútua dos mesmos.

Os métodos de controle de qualidade (CQ) se classificam em dois grupos: controle interno de qualidade (CIQ) e controle externo de qualidade

(CEQ). O CIQ tem como principal objetivo manter as condições de validação no laboratório por longo tempo e para isso emprega algumas ferramentas para atingir essa meta, como: a realização de repetições de análises, uso de materiais de referência e o uso de cartas controles; o CEQ tem como finalidade principal assegurar a comparabilidade dos resultados entre laboratórios, sendo que para atingir essa meta, ou seja, obter competência na realização de ensaios laboratoriais, a participação em esquemas de ensaios de proficiência (EP) é essencial como indicador do desempenho do laboratório quando comparado com outros laboratórios que realizam o mesmo ensaio (SIMONET, 2005).

A validação de um método analítico estabelece, por meio de estudos sistemáticos de laboratório, que o método é adequado para a realização de uma determinada análise química, isto é, possui características de desempenho que são capazes de produzir resultados satisfatórios às necessidades. Os estudos de validação para métodos analíticos quantitativos geralmente determinam os seguintes parâmetros de desempenho: seletividade e especificidade; faixa de medição; calibração e rastreabilidade; tendência ou recuperação; linearidade; limite de detecção; limite de quantificação; robustez e precisão (EURACHEM/CITAC, 1998).

Considerando-se a minimização da variabilidade interlaboratorial nos resultados de análises de alimentos e a busca pela uniformização das metodologias, a importância da garantia de qualidade em laboratórios de nutrição animal é enfatizada. Procedimentos de validação de métodos e de CQ são essenciais para assegurar a qualidade dos resultados analíticos.

De forma sintetizada, na Figura 2.1 estão representados os diferentes níveis de CQ em um sistema analítico que devem ser executados para a garantia da qualidade de um laboratório.

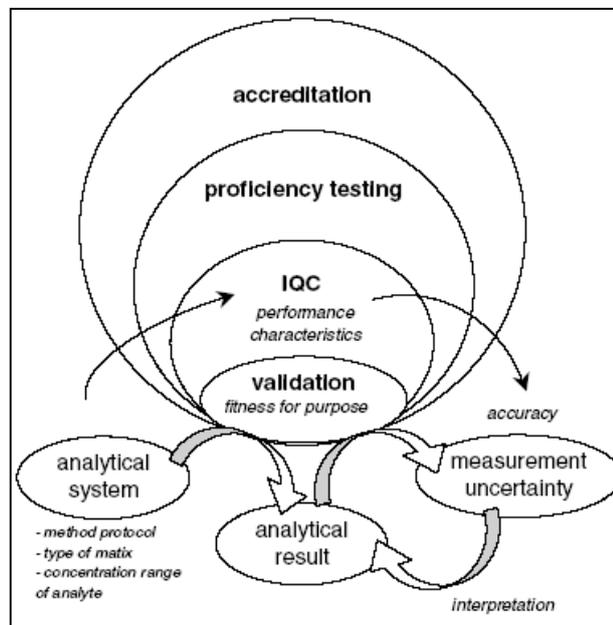


Figura 2.1. Diferentes níveis que asseguram a qualidade de medições para química analítica e laboratórios de alimentos (Fonte: TAVERNIERS et al, 2004).

2.4 – Ensaio de Proficiência por Comparações Interlaboratoriais

Comparações interlaboratoriais têm mostrado que elevadas variações em análises de alimentos devem ser inaceitáveis, e que esforço coordenado precisa ser feito para alcançar procedimentos analíticos de consenso entre os laboratórios de análises de alimentos para animais (FAO, 2004).

Conforme relatado, o presidente da Associação of Official Agricultural Chemists (AOAC) expõe que: “As análises de amostras de alimentos e dos ingredientes para alimentação animal, como mostra a experiência da associação, é uma das mais difíceis questões relacionadas com o trabalho desta organização” (FAO, 2004).

Para um laboratório produzir dados confiáveis e de forma constante, ele deve implementar um adequado programa de garantia de qualidade e procedimentos de monitorar o seu desempenho na realização de ensaios analíticos. Assim, a participação de laboratórios em ensaios de proficiência é de fundamental importância para que se verifique a qualidade das atividades e dos procedimentos desenvolvidos (THOMPSON et al, 2006). Os resultados obtidos constituem-se da evidência da competência do laboratório, assim como uma ferramenta de melhoria de seu desempenho.

Em um contexto geral, o ensaio de proficiência traz como benefícios aos participantes: avaliação do desempenho e monitoração contínua; evidencia de obtenção de resultados confiáveis; identificação de problemas relacionados com a sistemática de ensaios; possibilidade de tomada de ações corretivas e/ou preventivas; avaliação da eficiência de controles internos de qualidade; determinação das características de desempenho e validação de métodos e tecnologias; padronização das atividades frente ao mercado, e reconhecimento de resultados de ensaios, em nível nacional e internacional.



2.4.1 – Tipos de Ensaio de Proficiência (EP)

Ensaio de comparações interlaboratoriais são conduzidos não somente para avaliar o desempenho de laboratórios, mas também para validar métodos de análises e amostras referência. O objetivo maior do EP é o estímulo ao bom desempenho dos participantes, proporcionando a disponibilidade de meios objetivos para que o responsável pelo laboratório possa avaliar e demonstrar a confiabilidade dos dados que produz.

Existem atualmente acima de 800 programas de EP cadastrados no banco de dados do EPTIS (European Proficiency Testing Information System) em operação nos países da Europa e das Américas (EPTIS, 2007).

Os métodos de EP variam dependendo da natureza dos itens de ensaios (amostras), do método de ensaio utilizado e do número de laboratórios participantes. As normas ABNT/ISO GUIA 43 descrevem seis tipos mais comuns de EP (ABNT ISO/IEC 43, 1999).

2.4.1.1 – Programas de comparação e medição

Nesse tipo de programa o item de ensaio a ser medido é enviado sucessivamente de um laboratório participante para outro. Os resultados dos ensaios devem ser informados juntamente com as incertezas associadas, sendo que serão comparados com os valores designados fornecidos por um laboratório de Referência.

Programas envolvendo participação sucessiva geralmente demandam tempo, às vezes anos e dessa forma algumas dificuldades poderão ser geradas, como: garantia de estabilidade dos itens de ensaio; o estrito monitoramento de sua circulação e o tempo permitido para a realização dos ensaios pelos participantes individuais; e a dificuldade de comparar os resultados com base no grupo de participantes, acarretando em demora para fornecer o desempenho individual aos laboratórios (ABNT/ISO GUIA 43, 1999).

2.4.1.2 – Programas de ensaios interlaboratoriais

Os programas de ensaios interlaboratoriais, geralmente utilizam itens de ensaio que sejam de certa forma semelhantes aos materiais analisados na rotina dos laboratórios participantes, os quais incluem alimentos, água, solos e materiais ambientais. É fundamental que apresentem homogeneidade aceitável, para que resultados extremos não sejam atribuídos a variabilidades significativas do item de ensaio.

Neste tipo de EP, os itens de ensaios são subamostras selecionadas aleatoriamente de uma fonte de material que são distribuídas simultaneamente aos participantes. Após a conclusão dos ensaios, os responsáveis pelos laboratórios enviam os resultados ao coordenador do EP, que os compara com os valores designados (valores alvo). Por meio de relatórios, o coordenador fornece o desempenho individual do laboratório e do grupo como um todo.

Esse tipo de programa interlaboratorial é utilizado para: testar a precisão e a exatidão dos laboratórios; produzir materiais de referência para utilização em controle interno de qualidade (CIQ); e comprovar junto aos organismos de acreditação que o laboratório é competente na realização do ensaio em questão.

2.4.1.3 – Programas de ensaios de partidas de amostras

Tipicamente, esse tipo de ensaio envolve comparações de dados produzidos por pequenos grupos de laboratórios (frequentemente dois laboratórios). Geralmente, são utilizados em transações comerciais para

atestar os níveis de garantia (especificações), de um determinado produto negociado.

A amostra (item de ensaio) é dividida entre dois laboratórios, um representando o fornecedor e outro representando o comprador. Uma terceira parte da amostra é retida para que se necessário seja ensaiada por um terceiro laboratório, se diferenças significativas ocorrerem entre os resultados dos laboratórios do fornecedor e do comprador.

2.4.1.4 – Programas qualitativos

São utilizados para avaliar a capacidade de laboratórios para caracterizar entidades específicas. Nesse programas, o coordenador adiciona quantidades conhecidas do material de interesse no item de ensaio. Dessa forma, não há a necessidade de comparação dos resultados do laboratório para avaliar o desempenho do mesmo.

2.4.1.5 – Programas de valor conhecido

Como nos programa qualitativos, nesse tipo de comparação interlaboratorial não há necessidade de comparar os resultados do laboratório com outros participantes. Nesses, os itens de ensaio possuem quantidades conhecidas do mensurando. Dessa forma, é possível avaliar a capacidade de um laboratório individual para realização do ensaio em questão, sendo os resultados comparados com os valores designados.

2.4.1.6 – Programas de processo parcial

Nesse tipo de programas são envolvidas apenas partes de um ensaio ou processo de medição. São utilizadas para testar conformidades em certas ações em um laboratório, tais como preparar amostras de acordo com uma determinada especificação ou ajustar uma curva de calibração.

2.4.2 – Ferramentas estatísticas para avaliação de resultados em EP

O projeto estatístico a ser empregado em programas interlaboratoriais deve fornecer resultados simples e transparentes, para que os participantes e outros interessados, p.ex., os clientes do laboratório, possam com facilidade avaliar as informações contidas nos relatórios fornecidos pelo provedor do EP.

Em conformidade com um protocolo harmonizado, a hipótese estatística fundamental para o escopo do EP deve basicamente ser formulada da seguinte maneira: a hipótese nula (H_0) é que não haja diferença significativa entre os resultados do grupo, ou seja, que o laboratório atende aos requisitos de qualidade; e a hipótese alternativa (H_1) é que o laboratório apresente diferença significativa quando comparado com os resultados do grupo, portanto, não atende aos requisitos de qualidade (UHLIG & LISCHER, 1998).

Um dos pontos críticos de todo programa interlaboratorial é a interpretação dos resultados do programa e conseqüentemente a avaliação do desempenho dos participantes. Na literatura são citadas diversas técnicas estatísticas empregadas para avaliar os resultados em programas interlaboratoriais. No entanto, essas técnicas devem ser apropriadas para

cada situação (ABNT ISSO/IEC 43, 1999). Geralmente, duas etapas são comuns para todos os esquemas de EP: estimar o valor designado da concentração do analito e a incerteza associada; e calcular a estatística para avaliar o desempenho do laboratório (KUSELMAN, 2006).

Não existe um procedimento padronizado que descreva em detalhes as estratégias a serem utilizadas. Dessa forma, dependendo do propósito, diferentes critérios estatísticos empregados podem afetar a determinação do valor designado e o intervalo de aceitação e conseqüentemente comprometerem a avaliação do desempenho do laboratório (VISSER, 2006; MAIO, 2005).

2.4.2.1 – Procedimentos para o calculo da estatística de desempenho.

Dentre os procedimentos estatísticos empregados por programas interlaboratoriais para avaliar o desempenho de laboratórios, o mais comum, é o *Índice z*. Esse índice é recomendado pelo Protocolo Internacional Harmonizado para Ensaios de Proficiência (ABNT ISSO/IEC 43, 1999) e é obtido conforme a equação: $z = \frac{(x_i - \bar{X})}{\sigma_p}$; onde x_i é o resultado do participante; \bar{X} o valor designado (melhor estimativa do valor verdadeiro) e σ_p a estimativa apropriada da variabilidade, ou seja, desvio padrão alvo para o propósito conveniente do EP (THOMPSON et al, 2006) Na equação que define o *Índice z*, o termo $(x_i - \bar{X})$ descreve o erro na medida do laboratório em relação ao valor designado e o parâmetro σ_p descreve a

incerteza padrão, que é mais apropriada para a área de aplicação de resultados de análises.

O *Índice z* tem a vantagem de permitir a comparação direta dos resultados de diferentes amostras e de diferentes unidades, porque o valor desse índice não é expresso na unidade original da medida, ou seja, é normalizado e descrito como sendo a distância entre x_i e \bar{X} em unidades de desvio padrão. A hipótese do uso do *Índice z* está baseada na distribuição normal ou Gaussiana do conjunto de dados, com a média de 0 (zero) e 1 (um) desvio padrão (Figura 2.2).

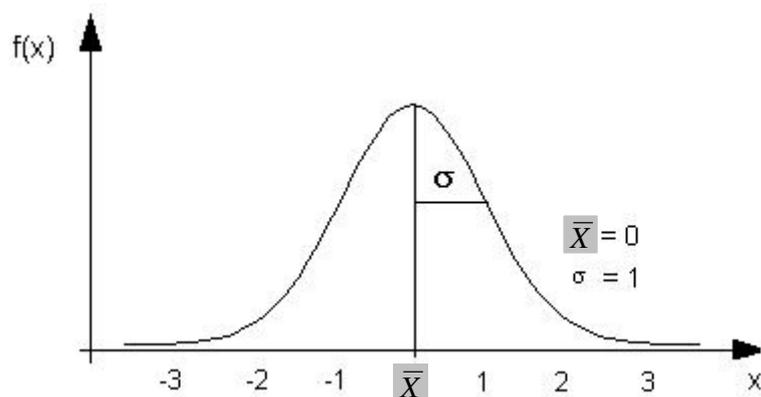


Figura 2.2. Modelo da curva de distribuição normal padrão caracterizada pela média (\bar{X}) igual a zero e desvio padrão (σ) igual a 1.

Dessa forma, a maioria dos programas interlaboratoriais que utilizam o *Índice z* para avaliar o desempenho dos ensaios, interpretam que o valor de z quanto mais próximo de 0 (zero), mais exato o resultado, ou seja, mais competente o laboratório na realização do ensaio (THOMPSON et al, 2006; FAPAS, 2002). Para uma distribuição normal do conjunto de dados, aproximadamente a probabilidade de 95% dos resultados caírem dentro do intervalo de $z \pm 2$, deste modo, o desempenho do laboratório é considerado aceitável ou satisfatório para realizar o ensaio. Por outro lado, valores de

$z \geq \pm 3$ são considerados inaceitáveis ou insatisfatórios e a probabilidade de ocorrerem numa distribuição normal é de 99,7%. Valores que estiverem entre $\pm 2 < z < \pm 3$ são considerados resultados com desempenho questionáveis.

Outros procedimentos são alternativos para avaliação do desempenho em programas interlaboratoriais. Dentre eles estão o *Índice Q*, números E_n e a soma reescalada do *Índice z* (*RSZ*).

◆ O *Índice Q* é baseado na tendência relativa. Dessa forma, espera-se que a distribuição geral de Q seja centrada em zero. A vantagem desse índice, é que ele mede diretamente o erro associado com a determinação e pode ser calculado por meio da equação: $Q = \frac{(x_i - \bar{X})}{\bar{X}}$, onde x_i é o resultados do participante e \bar{X} o valor designado.

◆ O número E_n (erro normalizado) raramente é utilizado para avaliar o desempenho de laboratórios em programas interlaboratoriais. No entanto, esse procedimento é recomendado em programas de comparação de medições, como p.ex. IMEP (International Measurement Evaluation Programme) organizado pelo IRMM (Institute for Reference Materials) (ABNT ISO/IEC 43, 1999; WONG, 2007). O cálculo é baseado na equação:

$$E_n = \frac{x_i - X_{ref}}{\sqrt{U_{lab}^2 + U_{ref}^2}}, \text{ onde } x_i \text{ é o resultado do laboratório participante; } X_{ref} \text{ é o}$$

valor designado fornecido pelo laboratório referência; U_i^2 é a incerteza do resultado do participante e U_{ref}^2 é a incerteza do valor designado pelo laboratório referência.

◆ A soma reescalada de *Índice z* (*RSZ*) pode ser um dos procedimentos para avaliação de desempenho combinando-se vários índices em uma rodada de ensaio. O *RSZ* não é muito recomendado, sendo questionável o uso na combinação de índices para diferentes ensaios (LAWN, 1997). No entanto, pode ter aplicações específicas quando empregado com certo cuidado.

A soma dos *Índice z* para o mesmo tipo de ensaio, mesmo em amostras distintas, pode ser útil para evidenciar tendências consistentes em um sistema analítico, possibilitando identificar a presença de erros sistemáticos.

O *RSZ* pode ser calculado por meio da equação: $RSZ = \frac{\sum z}{\sqrt{m}}$, onde *m* é o número de *índices z* combinados.

WONG, (2007), comparou procedimentos estatísticos para avaliar o desempenho de laboratórios por meio de programas de ensaio de proficiência. O estudo revelou que a presença de comportamento multi-modal nos resultados dos participantes, poderia causar impactos significativos na validade da avaliação de desempenho. Por esta razão, provedores de EP são recomendados a checar os resultados dos participantes para verificar a existência de multi-modal antes de avaliar o desempenho dos laboratórios.

Igualmente, THOMPSON & LOWTHIAN (1996) recomendaram uma seqüência de testes, que poderiam ser realizados para examinar a ocorrência de possíveis discrepâncias no comportamento dos resultados de uma rodada de teste de proficiência. Essas discrepâncias poderiam ser provenientes de tendência estatística significativa entre o valor designado e

o consenso dos participantes, o que sugere para o organizador que o método de quantificar o valor designado poderia estar incorreto. Dessa forma, como testes visuais para verificar a normalidade dos dados, poderiam ser utilizados gráficos tipo Histogramas.

2.4.2.2 – Procedimentos para a determinação do valor designado (\bar{X}).

O valor designado é por definição, a melhor estimativa do valor verdadeiro, sendo este valor utilizado com o propósito de calcular os índices de desempenho dos participantes de programas interlaboratoriais. Esse valor deve ser definido de forma criteriosa, para avaliar de maneira justa os participantes e para incentivar a concordância entre métodos e laboratórios.

Na literatura são sugeridos diferentes métodos para determinar o valor designado, sendo os mais comuns listados a seguir (ABNT ISO/IEC 43, 1999; THOMPSON et al, 2006):

- *Valor designado fornecido por um laboratório referência:* neste método o provedor do ensaio de proficiência recomenda um laboratório que seja confiável para o propósito do esquema. A principal vantagem é que o material utilizado no EP é especialmente preparado para o esquema.
- *Valor certificado por um Material de Referência Certificado (CRM) utilizado como material teste:* Nesse método o valor certificado e a incerteza associada são utilizados diretamente no cálculo de desempenho, se tornando assim, um procedimento simples e fácil de ser implantado. As principais desvantagens são: o alto custo desses materiais e a insuficiente disponibilidade de matriz natural para cada finalidade.

- *Valor designado fornecido por laboratório especialista:* Nesse procedimento o valor designado é obtido pelo valor de consenso de um grupo de laboratórios especialistas, que analisam o material de ensaio utilizando métodos validados (métodos de referência) reconhecidos como sendo de alta precisão e exatidão. O valor de consenso será calculado utilizando uma estimativa apropriada da tendência central dos resultados, normalmente a média robusta.
- *Valor designado obtido de materiais formulados:* neste método o valor alvo é obtido de materiais cuja concentração do analito foi adicionada ao material a ser ensaiado. As formulações consistem na adição de quantidades ou concentrações conhecidas de analito a um material base que não contem o mensurando e, portanto certas circunstâncias devem consideradas: o material deve estar livre do analito ou sua concentração deve ser exatamente conhecida; o analito adicionado pode ser de difícil homogeneização no material base. Nessas circunstâncias deve-se empregar testes para avaliar a homogeneidade do material; o analito pode estar mais fracamente ligado ao material (matriz) do que quando presente na forma natural e conseqüentemente tornar irreal o valor da recuperação do analito adicionado. O método é relativamente fácil de executar quando o material teste for um líquido homogêneo, como p.ex. amostras de sangue.
- *Valores de consenso que são derivados diretamente dos resultados relatados pelos participantes:* é o procedimento mais utilizado para determinar o valor alvo em ensaios de proficiência, sendo utilizado normalmente a média dos resultados após a exclusão de valores dispersos (estatística clássica) ou a mediana dos resultados de todos os participantes

na rodada do ensaio (estatística robusta). Dentre as principais vantagens do uso deste método estão a facilidade de aplicação e o baixo custo. A principal desvantagem é a existência de sub-populações, ou seja, em esquemas onde os participantes utilizam métodos distintos o valor alvo poderá sofrer tendência no valor proveniente dos resultados de um grupo majoritário de laboratórios.

A estatística clássica baseada na média tem maior desvantagem, porque a interpretação dos resultados é baseada na distribuição normal (curva Gaussiana). Por outro lado, a estatística robusta é válida inclusive com resultados de ensaios que não apresentam comportamento segundo uma distribuição normal (distribuição Gaussiana). Assim, ao contrário da estatística clássica, a presença de uma distribuição normal não é requerida. Isto é vantajoso em programas interlaboratoriais quando distribuições não normais são freqüentemente encontradas (OLIVIERI, 2004).

2.4.2.3 – Procedimentos para a determinação do desvio padrão alvo (σ_p).

O desvio padrão alvo é definido como sendo a incerteza (u) associada ao valor designado e que caracteriza a dispersão ou a variabilidade dos valores atribuídos ao mensurando. Este parâmetro, em programas interlaboratoriais, determina com alta probabilidade o intervalo no qual o valor verdadeiro provavelmente está contido. “A incerteza (u) da medição não implica em dúvida quanto a validade da medição, ao contrário, o conhecimento da incerteza implica numa maior confiança na validade de uma medição” (EURACHEM/CITAC, 1998).

Vários métodos são empregados para estimar o intervalo de confiança (IC) em EPs (LAWN, 1997). Geralmente, o procedimento para determinar a incerteza deve ser adequado para satisfazer o objetivo comum de todos os laboratórios e dessa forma, precisa ser definido pelo organizador do esquema e deverá ser divulgado para os participantes antes do início da rodada do EP (THOMPSON & ELLISON, 2006). Por exemplo, em programas de ensaios de partidas de amostras (Item 2.4.1.3) o σ_p poderá ser um valor fixado previamente, dependendo da variabilidade aceita para um determinado produto.

Dentre os procedimentos mais utilizados estão:

- *Métodos baseados na estatística clássica:* neste método o σ_p é representado pela estimativa do desvio padrão “s”, calculado por meio da

equação $s = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{X})^2}{(N-1)}}$, onde x_i é o resultado informado pelo

participante i ; \bar{X} a média dos resultados após a exclusão do dispersos e N o número de participantes. Porém, apesar da facilidade de aplicação, o s é influenciado por resultados extremos (outliers). Para exclusão de “outliers”, geralmente são aplicados alguns testes estatísticos, sendo os mais comuns: teste de Dixon ou teste Q; teste de Grubbs e teste de Hampel.

- *Métodos baseados em estatística robusta:* são os procedimentos que recentemente estão sendo empregados para avaliar os dados em programas de controle de qualidade interlaboratoriais (ANALYTICAL METHODS COMMITTEE, 2001). São os métodos preferíveis, pois, não dependem de uma distribuição normal dos dados para serem aplicados (MAIO et al, 2005):

Em muitos programas interlaboratoriais, distribuições não Gaussianas são freqüentemente encontradas, dessa forma, estatística robusta é apropriada para ser aplicada, pois não dependem da realização de testes de exclusão de “outliers” para definir o valor do desvio padrão alvo σ_p .

Normalmente são empregados os seguintes procedimentos para o cálculo do desvio padrão robusto:

- a) São calculadas as diferenças (d_i) entre o resultado informado pelo laboratório e o valor da mediana do conjunto de resultados ($x_i - \bar{X}$), sendo em seguida os valores de d_i arranjados em ordem de grandeza, sem considerar o sinal. O valor da diferença mediana (\bar{d}) multiplicado pelo fator de 1,5 fornece o desvio padrão robusto σ_p (Analytical Methods Committee, 2001).
- b) O σ_p pode ser obtido pela diferença entre o primeiro quartil (Q1) e o terceiro quartil (Q3). Essa diferença fornece o intervalo quartílico normalizado (IQN) que multiplicado por 0,7413 torna-se comparável ao desvio padrão para os testes de proficiência (ANALYTICAL METHODS COMMITTEE, 1989).
- c) A equação de HORWITZ, modificada por THOMPSON, é um modelo para prever o desvio padrão a partir de uma dada concentração (c) do analito expressa como razão adimensional da massa. É um procedimento amplamente empregado para definir o σ_p em ensaios de proficiência (THOMPSON, 2000).

2.4.2.4 – Tratamentos estatísticos de dados empregados em ensaios de proficiência.

Projetos para organizar ensaios de proficiência devem possibilitar estimar os fatores que afetam a qualidade dos resultados analíticos e determinar o tamanho da variabilidade que estes fatores promovem. Recentemente, foi estabelecido o projeto COEPT (Comparability of the Operating and Statistical) (BOLEY, et al, 2006), cujo objetivo foi comparar os protocolos operacionais e estatísticos de vários provedores de EP, considerando quatro setores tecnológicos (água, solos, alimentos e higiene ocupacional) cadastrados no EUROPEAN PROFICIENCY TESTING INFORMATION SYSTEM (EPTIS, 2007). Esse projeto, após um levantamento das informações, encontrou concordância de aproximadamente 85% nos protocolos para avaliação de resultados, considerando-se um mesmo setor tecnológico. O COEPT identificou que a maioria dos esquemas utiliza o *Índice z* como estimador de desempenho. Entretanto, encontrou diferenças significativas no procedimento utilizado para o cálculo do desvio padrão alvo (σ_p).

Na literatura, são encontrados vários trabalhos que comparam técnicas estatísticas distintas para estabelecer o valor designado, o desvio padrão alvo e o desempenho dos laboratórios participantes.

Com o objetivo de avaliar a influência de diferentes técnicas estatísticas na comparação de resultados de análises de águas de superfície em programas interlaboratoriais, LINSINGER et al, (1998) compararam três tipos de teste de detecção de “outliers” (teste de Grubbs, Graf e Henning e Hampel) e também compararam quatro índices para avaliação de

desempenho: índice z acumulado; soma reescalada do índice z (RSZ), média do índice z absoluto e o desvio médio. Dentre os testes realizados para outliers, o teste que identificou o maior número foi Hampel (Figura 2.3) e também possui a vantagem de não requerer o uso de valores tabelados e ser de fácil aplicação.

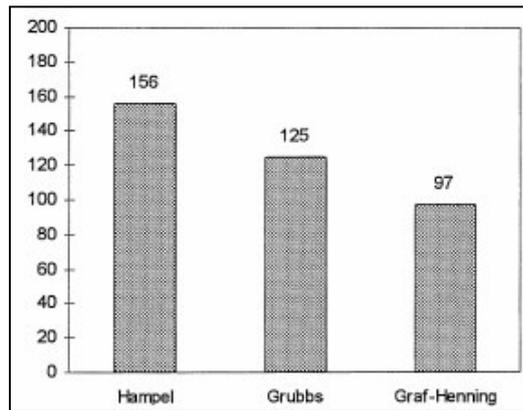


Figura 2.3. Número total de outliers detectado pelos diferentes testes específicos para essa definição (Fonte LINSINGER et al, 1998).

Com relação aos índices resumidos, os autores comprovaram que estes apresentam aplicação limitada para avaliar o desempenho dos laboratórios participantes, e que existe pouca correlação entre os diferentes índices (Figura 2.4). Concluíram que a padronização de procedimentos para comparação interlaboratorial não é ideal, porque existem geralmente diferentes objetivos a serem perseguidos para cada propósito pretendido.

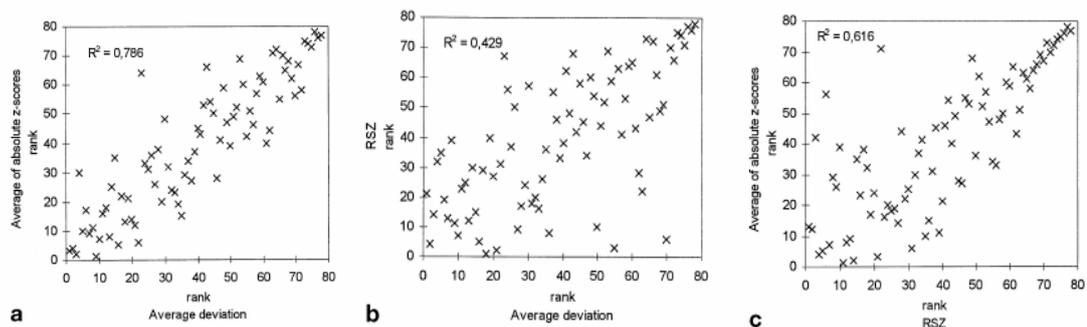


Figura 2.4. Correlação entre os índices resumidos para avaliação do desempenho de laboratórios em Ensaios de Proficiência (Fonte: LINSINGER et al, 1998).

Em outro trabalho, MAIO et al. (2005) aplicaram diferentes métodos estatísticos a resultados de um estudo interlaboratorial para análises de chumbo em amostras de sangue. O estudo foi aplicado a três níveis de concentração de chumbo (Pb), onde foram avaliados os efeitos causados por diferentes técnicas estatísticas sob os valores designados e intervalos de aceitação. Para a determinação dos valores designados foram considerados os valores de consenso dos laboratórios participantes, obtidos pela média aritmética ou da mediana. Foram aplicados os testes de Hampel, Grubbs, Dixon e Índice z para exclusão de “outliers”, quando foi utilizado o valores da média como valor designado e o do desvio padrão como intervalo de aceitação. Quando o valor designado foi baseado na mediana, foi empregado o desvio padrão robusto calculado a partir da equação de Horwitz.

Técnica estatística	Teste de detecção de "outliers"	Intervalo de aceitação
A	Hampel	$X_{\text{designado}} \pm 2s_A$
B	Z-score	$X_{\text{designado}} \pm 2s_B$
C	Grubbs	$X_{\text{designado}} \pm 2s_C$
D	Dixon	$X_{\text{designado}} \pm 2s_D$
E	Z-score	$X_{\text{designado}} \pm 6$, para concentrações $\leq 40 \mu\text{g}/100\text{mL}$ e $X_{\text{designado}} \pm 15\% X_{\text{designado}}$, para concentrações $> 40 \mu\text{g}/100\text{mL}$
Técnica estatística	Cálculo do desvio padrão	Intervalo de aceitação
F	$s_F = \frac{2^{(1-0,5\log C)} \times \text{mediana}}{100}$	$X_{\text{designado}} \pm 2s_F$
G	$s_G = 0,02C^{0,8495}$, $1,2 \cdot 10^{-7} \leq C \leq 0,138$	$X_{\text{designado}} \pm 2s_G$

Figura 2.5. Critérios estatísticos utilizados para o cálculo do valor designado e do intervalo de aceitação.

A partir dos resultados obtidos, os autores concluíram que as diferentes técnicas estatísticas utilizadas não influenciaram significativamente no valor designado. Entretanto, o intervalo de aceitação sofreu alterações devido sua dependência do valor da estimativa desvio padrão.

Capítulo 3

Material e Métodos

3 - Material e Métodos

O Ensaio de Proficiência de Laboratórios de Nutrição animal (EPLNA) foi conduzido por três anos consecutivos, participando um total de 43 laboratórios distintos. No primeiro ano participaram 31 laboratórios, no segundo ano participaram 30 laboratórios e no terceiro ano 35 laboratórios.

Os materiais de ensaio distribuídos para a realização do EPLNA foram similares às amostras rotineiramente analisadas em laboratórios de nutrição animal (quanto à composição química e faixa de concentração). A homogeneidade das amostras foi avaliada conforme recomendado nas normas ABNT ISO/IEC GUIA 43 foram selecionadas aleatoriamente de uma fonte de material, sendo essas distribuídas simultaneamente aos participantes para a realização de análises de acordo com um cronograma previamente estabelecido.

Foram avaliados os resultados referentes às seguintes determinações: matéria seca (MS), digestibilidade “in vitro” da matéria seca (DIVMS), fibra em detergente ácido (FDA), fibra em detergente neutro (FDN), fibra bruta (FB), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), lignina, cinzas, e os macro e micro nutrientes (Ca, P, Mg, K, Cu, Fe, Mn, Zn e Na). Cada laboratório foi identificado por um código conhecido apenas por ele próprio e pela coordenação do EPLNA.

Após a conclusão das análises químicas, os resultados enviados pelos participantes foram tabulados e comparados com valores designados.

Para a determinação dos valores designados (valor verdadeiro e sua incerteza) foram considerados os valores de consenso dos laboratórios participantes, obtidos por meio do valor da média ou da mediana dos resultados.

3.1 - Participantes

Dentre os 43 laboratórios que contribuíram para a realização dos três anos do EPLNA estão representantes de 15 unidades de pesquisa da Embrapa, 13 instituições de ensino superior, 6 instituições de pesquisa estaduais e 9 empresas da iniciativa privada. A relação dos participantes foi agrupada por categoria com atributos semelhante e está relacionada nas Tabelas 3.1, 3.2, 3.3 e 3.4 com a indicação do ano de participação. O perfil dos participantes é ilustrado na Figura 3.1 e observa-se que as Unidades da Embrapa representam 35% do total de participantes do EPLNA.

Tabela 3.1. Descrição das Unidades da Embrapa participantes do EPLNA.

Participantes	1º ano	2º ano	3º ano
Embrapa Pecuária Sul - Rio Grande do Sul	X	X	X
Embrapa Acre - Acre	X	X	X
Embrapa Suínos e Aves - Santa Catarina	X	X	X
Embrapa Tabuleiros Costeiros - Sergipe	X	X	X
Embrapa Clima Temperado - Rio Grande do Sul	X	X	X
Embrapa Pecuária Sudeste - São Paulo	X	X	X
Embrapa Pantanal - Mato Grosso	X	X	X
Embrapa Semi-Árido - Pernambuco	X	X	X
Embrapa Soja - Paraná	X	X	X
Embrapa Gado de Leite - Minas Gerais	X	X	X
Embrapa Gado de Corte - Mato Grosso do Sul	X	X	X
Embrapa Agroindústria de Alimentos - Rio de Janeiro	X	X	X
Embrapa Roraima - Roraima	X		
Embrapa Agrobiologia - Rio de Janeiro	X	X	
Embrapa Milho e Sorgo - Minas Gerais	X		
Total	15	13	12

Tabela 3.2. Descrição das instituições de pesquisa estaduais participantes do EPLNA.

Participantes	1º ano	2º ano	3º ano
Coordenadoria de Defesa da Agricultura de São Paulo - CDA/SAA-SP, Laboratório de Nutrição Animal, São Paulo.	X	X	X
Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola SA	X	X	X
Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG, Laboratório de Bromatologia, Minas Gerais.			X
Instituto de Zootecnia/SAA - IZ, Laboratório de Bromatologia, São Paulo.	X	X	X
Empresa de Pesquisa e Extensão Rural de Santa Catarina - EPAGRI, Estação Experimental de Lages, Laboratório de Nutrição Animal, Santa Catarina.	X	X	X
Instituto Melon de Estudos e Pesquisa - IMEP, Goiás	X		
Total	5	4	5

Tabela 3.3. Descrição das instituições de ensino superior participantes do EPLNA.

Participantes	1º ano	2º ano	3º ano
Centro Regional Universidade Espírito Santo do Pinhal – CREUPI – Laboratório de Análise de Alimentos Dr. Walter Niero – São Paulo	X	X	X
Universidade Estadual Paulista - UNESP, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal – São Paulo			X
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, Centro de Ciências Agro-veterinárias – Laboratório de Nutrição Animal e Bromatologia – Santa Catarina	X	X	X
Universidade de São Paulo – USP, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ, Departamento de Nutrição e Produção Animal, Laboratório de Nutrição Animal, São Paulo	X	X	X
Universidade de São Paulo – USP, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, Laboratório de Ativação Neutrônica, São Paulo		X	X
Universidade de São Paulo – USP, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA, Departamento de Zootecnia, Laboratório de Nutrição Animal, São Paulo	X	X	X
Pontifícia Universidade Católica – PUC-RS, Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia, Campus de Uruguaiana, Laboratório de Nutrição Animal, Rio Grande do Sul	X	X	X
Universidade de São Paulo – USP, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ, Departamento de Zootecnia, Laboratório de Nutrição Animal, São Paulo	X	X	X
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Departamento de Zootecnia, Laboratório de Nutrição Animal, Minas Gerais	X	X	
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, Laboratório de Nutrição Animal, Bahia	X	X	X
Universidade da Região de Campanha, Faculdade Medicina Veterinária, Laboratório de Bromatologia, Rio Grande do Sul	X		
Universidade Estadual Paulista – UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Departamento de Zootecnia e Produção Animal, São Paulo	X	X	
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Laboratório de Nutrição Animal, Pernambuco	X		
Total	11	10	9

Tabela 3.4. Descrição das empresas da iniciativa privada participantes do EPLNA.

Participantes	1º ano	2º ano	3º ano
CBO – Assessoria e Análises, Laboratório de Nutrição Animal, São Paulo			X
Hidrocepe Serviços de Qualidade Ltda, Laboratório de Bromatologia, Minas Gerais			X
Companhia Nacional de Nutrição Animal - (Connan), Laboratório de Controle de Qualidade e Pesquisa, São Paulo			X
Rodes Análises Químicas Ltda, Laboratório de Nutrição Animal, São Paulo		X	X
Nutron Alimentos Ltda, Laboratório de Itapira, São Paulo		X	X
Agroceres Nutrição Animal Ltda, Laboratório de Bromatologia, São Paulo			X
Multimix Nutrição Animal Ltda, Laboratório de Controle de Qualidade, São Paulo			X
Fundação ABC, Laboratório de Bromatologia, Paraná		X	X
Cooperativa Agroindustrial Lar, Laboratório Central, Paraná			X
Total	0	3	9

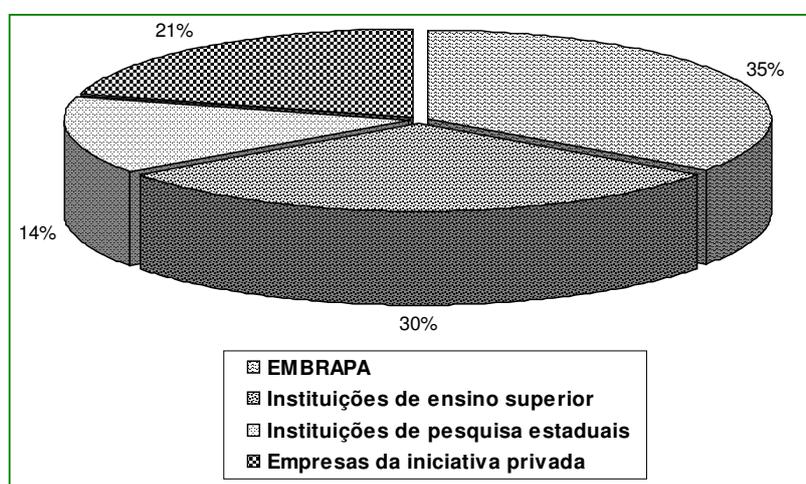


Figura 3.1. Perfil dos participantes no EPLNA.

3.2 - Preparo dos materiais de ensaio

O grupo de amostras avaliado, com diferentes características físicas e químicas, era composto por forrageiras, alimentos concentrados e mistura mineral. Entre as amostras, foram incluídas três denominadas “amostras referência de volumoso, amostras referência de concentrado ou amostras referência de mistura mineral” (A3ARV, A3ARC e A3ARM), as quais foram repetidas nas quatro rodadas.

Foram preparados 2000 g de material seco a 65°C e moído em moinho de facas em aço inoxidável de bancadas (tipo Wiley), com peneiras de 1,00 mm (20-40 mesh), para cada amostra de volumoso e de concentrado, e 2000 g de amostra para a mistura mineral triturada em almofariz de porcelana. Para A3ARV e A3ARC foi preparado 25 kg de matéria seca e A3ARM foram preparados 4 kg de amostra.

A definição dos lotes foi realizada por meio de sorteio, sendo as amostras escolhidas de forma aleatória. Cada lote era composto por: uma amostra de forrageira, uma de alimento concentrado, uma mistura mineral, uma amostra de referência de volumoso, uma amostra referência de concentrado e uma amostra de referência de mistura mineral.

Na Tabela 3.5, é descrita a composição dos quatro lotes correspondente as amostras do terceiro ano do EPLNA (A3), com informações sobre a identificação para cada amostra (espécie, variedade, etc.). Algumas amostras foram repetidas em dois lotes: amostra de volumoso A3V01 repetida na segunda rodada como amostra A3V07; amostra de concentrado A3C3 repetida na quarta rodada como amostra A3C21 e a amostra de mistura mineral A3M11 repetida na terceira rodada como amostra A3M17.

A composição dos lotes de amostras do primeiro ano (A1) e do segundo ano (A2), estão descritas no Anexo A.

Tabela 3.5. Composição dos lotes com identificação dos materiais de ensaio utilizados no terceiro ano do EPLNA.

Lotes	Amostras	Identificação
1º Rodada	A3V01	Volumoso: Feno de <i>Cynodon dactylon</i> , (L.) Pers) (capim Coast Cross)
	A3ARV	ARV: Gramínea <i>Cynodon plectostachyus Pilger</i> (Capim Estrela Roxa)
	A3C03	Concentrado: Ração para vacas seca
	A3ARC	ARC: Farelo de soja 46%
	A3M05	Mistura Mineral: Mistura mineral para suínos
	A3ARM	ARM: Mistura mineral para vacas em lactação
2º Rodada	A3V07	Volumoso: Feno de <i>Cynodon dactylon</i> , (L.) Pers) (capim Coast Cross)
	A3ARV	ARV: Gramínea <i>Cynodon plectostachyus Pilger</i> (Capim Estrela Roxa)
	A3C09	Concentrado: Farelo de trigo
	A3ARC	ARC: Farelo de soja 46%
	A3M11	Mistura Mineral: Mistura mineral para gado de corte
	A3ARM	ARM: Mistura Mineral para Vacas em Lactação
3º Rodada	A3V13	Volumoso: Feno de <i>Braquiária Decumbens</i> cv Basilisk
	A3ARV	ARV: Gramínea <i>Cynodon plectostachyus Pilger</i> (Capim Estrela Roxa)
	A3C15	Concentrado: Milho em grão
	A3ARC	ARC: Farelo de soja 46%
	A3M17	Mistura Mineral: Mistura mineral para gado de corte
	A3ARM	ARM: Mistura Mineral para vacas em lactação
4º Rodada	A3V19	Volumoso: <i>Leucaena leucocephala</i> (Leucena)
	A3ARV	ARV : Gramínea <i>Cynodon plectostachyus Pilger</i> (Capim Estrela Roxa)
	A3C21	Concentrado: Ração para vaca seca
	A3ARC	ARC: Farelo de soja 46%
	A3M23	Mistura Mineral: Mistura mineral para vacas seca
	A3ARM	ARM: Mistura mineral para vacas em lactação

3.3 - Cronograma

As amostras foram enviadas via correio para cada participante em uma única remessa, contendo 24 amostras identificadas com número código e divididas em 4 lotes. Os ensaios previstos foram realizados nas datas estabelecidas no cronograma (Tabela 3.6). Assim, a frequência na realização dos mesmos foi em intervalos de aproximadamente 45 dias.

Tabela 3.6. Cronograma para o EPLNA.

Rodadas	Época de análises	Data limite para envio de resultados
1º	Abril e Maio	20/05/2006
2º	Junho e Julho	20/07/2006
3º	Julho e Agosto	30/08/2006
4º	Setembro e Outubro	15/10/2006

3.3.1 - Envio dos resultados

As datas para o envio dos resultados analíticos seguiram cronograma descrito na Tabela 3.6. Os resultados foram informados via Internet, sendo utilizada duas opções:

- ⇒ Por correio eletrônico (*E.mail*), em arquivo anexo com extensão “*xml*” gerado através de um software de aplicação, intitulado de SEPROLAB.EXE (sistema para gerenciamento do ensaio de proficiência para laboratórios de nutrição animal) (Figura 3.2 e 3.3), desenvolvido especificamente para esse fim (SOUZA et al, 2007).
- ⇒ Digitação diretamente via Internet, por meio do *Link* do EPLNA na página da Embrapa Pecuária Sudeste, <http://eplna.cppse.embrapa.br> , em área restrita aos participantes sendo o acesso via senha pessoal (SOUZA et al, 2007).



Figura 3.2. Tela de acesso à digitação de resultados no programa SEPROLAB.



SEPROLAB - Sistema Ensaio Proficiência para Laboratórios
Ano 2006 Laboratório N° 1 Lote 1

Resultados de Análises - Volumosos e Concentrados

Amostra	MS	DIYMS	FDA	FDN	PB	EE	LIG	CINZAS	FB	NNP	NIDN	NIDA	NITDF
	%												
1	1111												
2			2222										
3						8888							
4								9999					

Amostra	Ca	Mg	P	K	Na	Cu	Fe	Zn	Mn
	g/kg					mg/kg			
1					3333				
2	10101								
3	2020202								
4						50125			

Resultados de Análises - Mistura mineral

Amostra	Ca	Mg	P	K	Na	Cu	Fe	Zn	Mn
	g/kg					mg/kg			
5		5555							
6	77777								

Versão 4.0

Salvar Enviar Legenda Informações Fechar

Figura 3.3. Tela do programa para a digitação de resultados no programa.

3.4 - Determinação da homogeneidade dos materiais de ensaio

Após a formação dos lotes, a homogeneidade das amostras foi avaliada de acordo com o procedimento estatístico recomendado pelas normas internacionais ISO/IEC GUIA 43, (1999).

Para cada tipo de material foram realizadas determinações analíticas com dez repetições (N=10), sendo as alíquotas retiradas das amostras aleatoriamente e analisadas em duplicas (Figura 3.4). Foi quantificado o teor de proteína bruta (PB) para as amostras de volumoso, concentrado e amostras referência (A3ARV e A3ARC). Para as amostras de mistura mineral e A3ARM foram determinados os teores de cálcio.

A homogeneidade das amostras foi avaliada por meio do teste de Fisher (*teste F*) ou da razão s_{am} / σ_p entre o desvio padrão amostral (s_{am}) e o valor do

desvio padrão alvo (σ_p) determinado empregando a equação de HORWITZ (THOMPSON et al, 2006).

A variância entre as amostras (s_{am}^2) e a variância analítica (s_{an}^2) foi calculada utilizando análises de variância de um fator (“one-way” ANOVA), sem excluir valores dispersos. Com esse objetivo foi calculada a soma dos quadrados entre amostras ($\sum Q_{AM}$), a soma dos quadrados analítica ($\sum Q_{AN}$),

o desvio padrão entre as amostras ($s_{am} = \sqrt{\frac{\left(\frac{\sum Q_{AM}}{N-1} - \frac{\sum Q_{AN}}{N}\right)}{2}}$) e o desvio padrão analítico ($s_{an} = \sqrt{\frac{\sum SQ_{AN}}{N}}$).

O valor do desvio padrão alvo (σ_p) foi calculado empregando a equação de HORWITZ, ou seja, para concentrações entre ≥ 120 ppb e $\leq 13,8\%$, $\sigma = 0,02c^{0,8495}/mr$, para concentrações $> 13,8\%$, $\sigma = 0,01c^{0,5}/mr$ ($\sigma_p =$ desvio padrão alvo; $c =$ concentração média; $mr =$ razão adimensional da massa, $\% = 10^{-2}$).

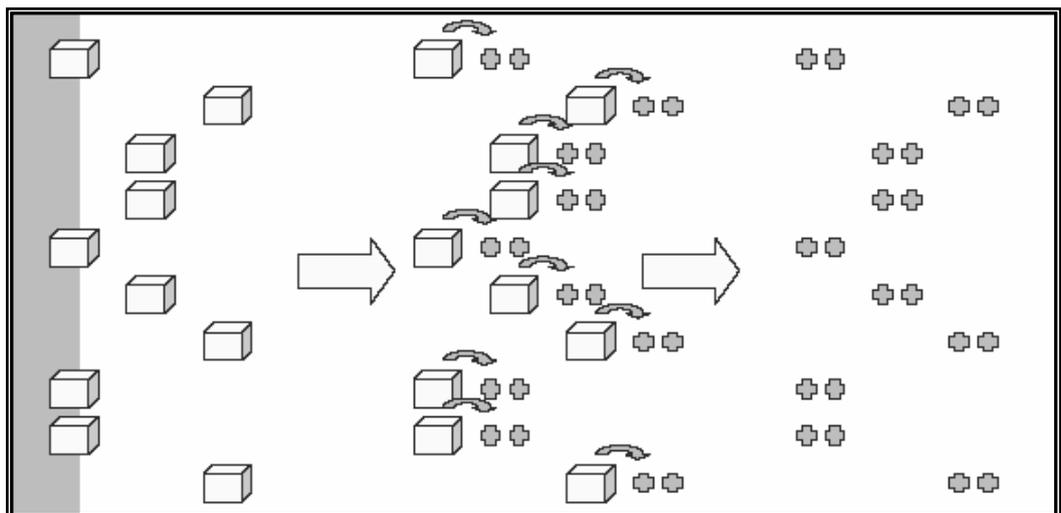


Figura 3.4. Esquema demonstrativo do modelo adotado para os testes de homogeneidade.

3.5 - Métodos analíticos utilizados

Os participantes adotaram procedimentos analíticos independentes, utilizando os de sua escolha e que estivessem de acordo com os métodos empregados em seus procedimentos de rotina.

Em geral, os procedimentos analíticos utilizados pelos laboratórios de nutrição animal participantes do EPLNA mantêm seus protocolos baseados nos métodos-padrão aceitos nacional ou internacionalmente. Porém, apesar de conservarem os princípios teóricos originais, algumas adaptações nos protocolos originalmente estabelecidos foram relatados durante a realização do estudo.

Para as amostras de forrageiras e alimentos concentrados foram realizadas as determinações descritas na Tabela 3.7 sendo os resultados corrigidos com base na matéria seca a 105^o C e expressos nas unidades citadas. Para as amostras de mistura mineral, os resultados expressos como “material como fornecido”, ou seja, sem correção pela matéria seca.

Tabela 3.7. Determinações, abreviações e unidades de concentração previstas no EPLNA para as amostras de volumoso e concentrado.

Ensaio	Abreviações	Unidades
Matéria seca	MS	%
Digestibilidade in Vitro da matéria seca	DIVMS	%
Fibra em detergente ácido	FDA	%
Fibra em detergente neutro	FDN	%
Proteína bruta	PB	%
Extrato etéreo	EE	%
Lignina via ácido sulfúrico	Lignina	%
Cinzas	Cinzas	%
Nitrogênio não protéico	NNP	%
Nitrogênio insolúvel em detergente neutro	NIDN	%
Nitrogênio insolúvel em detergente ácido	NIDA	%
Cálcio	Ca	g kg ⁻¹
Magnésio	Mg	g kg ⁻¹
Fósforo	P	g kg ⁻¹
Potássio	K	g kg ⁻¹
Sódio	Na	g kg ⁻¹
Cobre	Cu	mg kg ⁻¹
Ferro	Fe	mg kg ⁻¹
Manganês	Mn	mg kg ⁻¹
Zinco	Zn	mg kg ⁻¹

3.5.1 – Procedimento empregado na determinação de matéria seca (MS)

O método para a determinação de MS foi baseado na evaporação da água presente na amostra pela ação do calor, sendo o teor de MS, obtido pela diferença das pesagens entre o recipiente com a amostra úmida e o recipiente com a amostra seca.

O procedimento analítico baseia-se na transferência de um recipiente pré-seco e com peso conhecido, contendo cerca de 2000 mg ($\pm 0,1$ mg) de amostra moída, para estufa calibrada a 105°C, até massa constante (aproximadamente 12 h). Após esse período o recipiente contendo a amostra seca é transferido para dessecador para resfriamento até a temperatura ambiente e a seguir sua massa é determinada em balança analítica.

Para essa determinação, foram observadas variações na temperatura e no tempo de permanência da amostra na estufa, conforme Tabela 3.8.

Tabela 3.8. Variações no tempo de secagem para a determinação de matéria seca.

Código	Temperatura e tempo de secagem
MS 1	Temperatura de 105 °C – tempo de 4h
MS 2	Temperatura de 105 °C - tempo de 5h
MS 3	Temperatura de 105 °C - tempo de 12h
MS 4	Temperatura de 105 °C - tempo de 16h
MS 5	Temperatura de 105 °C - tempo de 24h
MS 6	Temperatura de 130 °C - tempo de 2h

3.5.2 – Procedimento empregado na determinação de digestibilidade in vitro da matéria seca (DIVMS) (AOAC, 1995; SILVA & QUEIROZ, 2002; TILLEY & TERRY, 1963).

A estimativa da digestibilidade de plantas forrageiras e de alimentos concentrados utilizados na dieta de ruminantes é amplamente utilizada para avaliação do valor nutricional desses alimentos. O método utilizado pelos

participantes do EPLNA foi o proposto por TILLEY & TERRY (1963), com o propósito de reproduzir as condições predominantes no rúmen-retículo do animal em tubos de ensaio, isto é, ausência de oxigênio, poder tampão a pH 6,9 e temperatura de 39 °C.

Na primeira etapa (digestão microbiana por processo fermentativo), 500 mg (\pm 0,1 mg) de amostra são incubadas em líquido ruminal na presença de uma solução-tampão a pH 6,9 (solução-tampão de McDougall, conhecida como saliva artificial) por 48 h. Na segunda etapa, a atividade microbiana é interrompida pela adição de solução de ácido clorídrico 6 mol L⁻¹ até pH \geq 2,0. Logo após se inicia a atividade enzimática, com a adição em cada amostra de 5 mL de uma solução de pepsina 1:10000 à 0,5 % (m/v), permanecendo a amostra incubada por mais 48 h. Nessa segunda etapa, ocorre a digestão enzimática de proteínas que escaparam da digestão microbiana.

A quantidade de matéria seca solúvel após os dois períodos de incubação é considerada como a parte digerida da amostra, sendo quantificada por meio da diferença entre as massas, inicial e final, da amostra.

3.5.3 – Procedimento empregado na determinação de fibra em detergente ácido (FDA) (VAN SOEST, 1965; SILVA & QUEROZ, 2002; SOUZA, et al, 1999; NOGUEIRA & SOUZA, 2005).

O método de determinação de FDA proposto por VAN SOEST (1965), propicia conhecer os constituintes menos solúveis da parede celular. Nitrogênio insolúvel em detergente ácido, lignina, celulose e sílica fazem parte do resíduo insolúvel, denominado de fibra em detergente ácido (FDA).

O conteúdo celular e a hemicelulose são extraídos a quente com solução brometo de N-cetil-N, N, N-trimetilamônio ($C_{19}H_{42}BrN$) a 20% (m/m) em solução de ácido sulfúrico a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (solução detergente ácido - SDA), restando, principalmente, a lignina e a celulose, que constituem a fibra em detergente ácido.

Para essa determinação, são observadas diferenças nos procedimentos analíticos realizados entre os laboratórios participantes do EPLNA. Essas diferenças foram basicamente relacionadas à proporção entre a massa de amostra e o volume da SDA (FDA1 e FDA2); ao equipamento de extração automatizado (FDA3) e ao método "Nylon bag" (FDA4). A relação dos laboratórios que utilizou cada método é apresentada na Tabela 3.9.

Tabela 3.9. Diferenças observadas na determinação de FDA.

Código	Procedimento
FDA 1	500 mg de amostra e 100 mL de SDA
FDA 2	350 mg de amostra e 35 mL de SDA
FDA 3	Método automático
FDA 4	Método "Nylon Bag"

3.5.3.1 – Determinação de FDA empregando o procedimento original (**FDA1**), proposto por VAN SOEST (1963).

Para a extração do conteúdo celular são transferidos para tubo de digestão de 40 mm de diâmetro x 400 mm de altura, massa de 500 mg ($\pm 0,1\text{mg}$) de amostra e 100 mL de SDA. Em seguida a solução é aquecida até a ebulição (aproximadamente $125 \text{ }^{\circ}\text{C}$) em bloco digestor, permanecendo sob condensação por 60 min.

Após a extração, a solução contendo a parede celular (FDA), é transferida para cadinhos de vidro previamente pesados e a FDA lavada por três vezes com água deionizada fervente e acetona. Os cadinhos contendo a

FDA são colocados em estufa calibrada a 105 °C e após oito horas ou até peso constante, retirados e transferidos para dessecador contendo sílica gel. Após atingirem a temperatura ambiente, a massa dos cadinhos é determinada em balança analítica. A porcentagem dos constituintes da parede celular ou FDA é obtida por meio da diferença entre as massas.

3.5.3.2 – Determinação de FDA empregando o procedimento proposto por SOUZA, (1999) (FDA2).

Nesse procedimento, a extração do conteúdo celular é realizada utilizando massa de 350 mg ($\pm 0,1$ mg) de amostra seca e moída, 35 mL de SDA em tubo de digestão de 25 mm de diâmetro x 250 mm de altura e aquecimento até a ebulição (aproximadamente 125 °C) em bloco digestor para quarenta tubos, permanecendo sob condensação por 60 min. As etapas seguintes são similares às descritas no item 3.5.3.1.

3.5.3.3 - Determinação de FDA empregando equipamento marca Foss Tecator AB (FDA3) (NOGUEIRA & SOUZA, 2005).

Nesse procedimento, 500 mg ($\pm 0,1$ mg) de amostra são transferidos para cadinho de vidro, os quais são conectados ao bloco digestor. A seguir são adicionados 100 mL de SDA e a temperatura do bloco elevada até o início da ebulição da solução (cerca de 125 °C), permanecendo assim por 1 h. O conteúdo solúvel é filtrado por sucção a vácuo, sendo o resíduo insolúvel (FDA) lavado com água deionizada fervente e acetona.

A FDA, remanescente no cadinho, é transferida para estufa a 105 °C por aproximadamente 6 h e após a secagem transferida para dessecador para

resfriamento. Após atingir a temperatura ambiente, a massa do cadinho contendo a FDA é determinada em balança analítica e a porcentagem dos constituintes da parede celular (FDA) obtida por meio da diferença entre as massas.

3.5.3.4 - Procedimento empregado na determinação de fibra em detergente ácido empregando a metodologia “Nylon bag” (KOMAREK, 1993; CONTRERAS, 1999).

Nesse procedimento, o teor de FDA é obtido em um analisador de fibra comercial (Ankom Technology[®], EUA), cujo princípio de funcionamento baseia-se na digestão e filtragem das amostras armazenadas em filtros - “nylon bag” e em ambiente fechado. O equipamento garante condições homogêneas de digestão e filtragem para as amostras, possibilitando a reutilização da solução extratora e a realização de um número maior de determinações por dia.

O procedimento originalmente proposto sofreu algumas adaptações, sendo a principal a substituição do suporte da amostra, com o “Nylon bag” substituído por saquinho confeccionado em TNT (tecido não tecido), constituído de 100% em polipropileno e de gramatura 100 g m², em dimensão de 6 x 5 cm. As amostras contidas nos saquinhos são digeridas em SDA, em ambiente fechado, sob aquecimento a 100 °C e agitação por aproximadamente 80 min.

Após digestão, os filtros contendo as amostras são submetidos a três enxágües com água destilada quente (temperatura de 90 °C) durante 5 min e, posteriormente, escorridos e imersos em acetona. A seguir os filtros são secos em estufa com circulação forçada de ar a 105 °C por três horas. Após a secagem, os filtros são transferidos para dessecador e, após atingirem a temperatura ambiente, pesados para a determinação da massa. O teor de FDA

é obtido por meio da diferença entre as massas do saquinho original contendo a amostra e a massa do saquinho com a FDA. Após cada extração, a solução extratora é separada e armazenada para ser reutilizada.

3.5.4 - Procedimento empregado na determinação de fibra em detergente neutro (FDN). (VAN SOEST, 1965; SILVA & QUEROZ, 2002; SOUZA, et al, 1999; NOGUEIRA & SOUZA, 2005).

O método de determinação da qualidade de plantas forrageiras proposto por VAN SOEST (1965) e descrito por SILVA & QUEROZ (2002) está baseado na obtenção dos componentes solúveis e insolúveis em meio detergente neutro. Por meio da solução detergente neutro (SDN), é possível separar o conteúdo celular (parte da forragem solúvel no detergente a pH 7,0) da parede celular, também chamada de fibra em detergente neutro (FDN), constituída basicamente, de celulose, hemicelulose, lignina e proteína danificada pelo calor e proteína da parede celular e minerais insolúveis em detergente neutro.

Para a determinação de FDN, foram observadas diferenças nos procedimentos analíticos utilizados entre os laboratórios participantes do EPLNA. Essas diferenças foram em relacionadas à proporção entre a massa de amostra e volume da SDN utilizada (FDN1 e FDN2); ao equipamento automatizado para extração (FDN3) e ao método "Nylon bag" (FDN4). Os laboratórios que utilizam cada procedimento estão relacionados na Tabela 3.10.



Tabela 3.10. Procedimentos utilizados na determinação de FDN.

Código	Procedimento
FDN 1	500 mg de amostra e 100 mL de SDA
FDN 2	350 mg de amostra e 35 mL de SDA
FDN 3	Método automático
FDN 4	Método "Nylon Bag"

3.5.4.1 - Procedimento empregado na determinação de FDN originalmente proposto por Van Soest (**FDN1**) (SILVA & QUEROZ, 2002; NOGUEIRA & SOUZA, 2005).

Em bequer de 600 mL, são transferidos 500 mg ($\pm 0,1$ mg) de amostra e adicionados 100 mL de SDN. Em seguida a solução é levada a ebulição (aproximadamente 125 °C), permanecendo sob condensação por 60 min em conjunto digestor tipo Sebelin®.

A solução, com o conteúdo celular solúvel, é filtrada sob sucção a vácuo, em cadinho de vidro com placa porosa, sendo o resíduo insolúvel (FDN) lavado com água fervente e acetona. O cadinho contendo a FDN é transferido para estufa de secagem calibrada à 105 °C e após aproximadamente 6:00 horas, ou até peso constante, transferido para dessecador contendo sílica gel, onde permanece até atingir a temperatura ambiente. Em seguida a massa do cadinho contendo a amostra é determinada, sendo a porcentagem dos constituintes da parede celular ou FDN obtida por meio da diferença entre as massas inicial e final, após a extração com detergente neutro.

3.5.4.2 - Determinação de FDN - procedimento proposto por SOUZA, et al, 1999 (FDN2).

Nesse procedimento são adicionados a tubo de digestão de 25 mm de diâmetro x 250 mm de altura massa de 350 mg ($\pm 0,1$ mg) de amostra e 35 mL

de SDN. A extração do conteúdo celular é obtida com o aquecimento por 1 h em bloco digestor até a ebulição (aproximadamente 125 °C). As etapas seguintes são similares às descritas no item 3.5.4.1.

3.5.4.3 - Determinação de FDN marca Foss Tecator AB (FDA3) (NOGUEIRA & SOUZA, 2005).

Nesse procedimento, 500 mg (\pm 0,1 mg) de amostra são transferidos para cadinhos de vidro com placa porosa e conectados em bloco digestor. A seguir, 100 mL de SDN são adicionados a cada cadinho.

Para a extração da parede celular, a SDN é levada à ebulição (cerca de 125 °C), interrompendo-se o aquecimento após 1 h. O conteúdo solúvel é filtrado por sucção a vácuo e o resíduo insolúvel (FDN) lavado com água deionizada fervente e acetona.

A fibra contida no cadinho é transferida para estufa a 105 °C por aproximadamente 6 h e após a secagem transferida para dessecador para resfriamento. Após atingir a temperatura ambiente, as massas dos cadinhos contendo a FDN são determinadas em balança analítica, sendo a porcentagem dos constituintes da parede celular (FDN) obtida por meio da diferença entre as massas.

3.5.4.4 - Determinação de FDN empregando a metodologia “Nylon bag” (KOMAREK, 1993; CONTRERAS, 1999).

Nesse método, a concentração da FDN é obtida em um analisador de fibra comercial (Ankom Technology[®], EUA), cujo princípio de funcionamento baseia-se na digestão e filtragem das amostras armazenadas em filtros, “Nylon

Bag”, e em ambiente fechado. O equipamento garante condições homogêneas de digestão e filtragem para as amostras, possibilitando a reutilização da solução extratora e a realização de um número maior de determinações por dia.

O saquinho empregado nesse método foi adaptado, sendo confeccionado em TNT (tecido não tecido), como já anteriormente descrito no item 3.5.3.4. A amostra contida no saquinho é digerida em solução detergente neutro, em meio fechado, sob aquecimento a 100 °C e agitação por aproximadamente 80 min.

Após a digestão, o filtro contendo o resíduo insolúvel é submetido a 3 enxágües com água destilada fervente durante cinco minutos e a seguir a água é deixada escorrer e o saquinho imerso durante 3 min em acetona. O filtro é transferido para secagem em estufa calibrada a 105 °C por 3 horas. Em seguida é transferido para dessecador e, após atingir a temperatura ambiente, pesado para a determinação da massa do saquinho mais FDN. Após cada extração, o pH da solução extratora deve ser corrigido para $7,0 \pm 0,1$ sendo assim, armazenada para poder ser reutilizada.

3.5.5 - Procedimento empregado na determinação de proteína bruta (PB) (SILVA & QUEROZ, 2002; NOGUEIRA & SOUZA, 2005).

A determinação do nitrogênio total (NT) proposta por Kjeldahl em 1883, fundamenta-se na decomposição da matéria orgânica dos alimentos pelo ácido sulfúrico, em presença de sulfato de cobre como catalisador, a aproximadamente 400 °C. O nitrogênio presente na solução ácida resultante é

determinado por destilação por arraste a vapor, seguida de titulação com ácido diluído (AOAC, 1990).

Para determinar o teor de PB, basta multiplicar o teor de nitrogênio total pelo fator de nitrogênio correspondente à amostra que está sendo analisada. Convencionalmente, em amostras de alimentos para animais: plantas forrageiras, rações concentradas, etc., a proteína bruta (PB) é expressa pelo fator 6,25, considerando que a maioria das proteínas contém nas suas moléculas aproximadamente 16% de nitrogênio.

Entre os procedimentos realizados pelos participantes do EPLNA para realização da determinação de PB, foi observada distinção na etapa de quantificação do nitrogênio. Assim, alguns laboratórios realizam essa determinação empregando sistemas manuais para a destilação e titulação e outros laboratórios realizam em equipamentos automatizados (Tabela 3.11).

Tabela 3.11. Diferenças observadas nos procedimentos para determinação de proteína bruta.

Código	Procedimento
PB 1	Destilação em sistema manual
PB 2	Destilação sistema automático

3.5.5.1 – Determinação de PB empregando sistemas não automatizados (**PB1**) (SILVA & QUEROZ, 2002; NOGUEIRA & SOUZA, 2005).

Para a decomposição da matéria orgânica, são transferidos para tubo de digestão cerca de 200 mg (\pm 0,1 mg) de amostra, 100 mg de uma mistura catalisadora contendo sulfato de cobre e sulfato de potássio na proporção de 1:10 (m/m) e 3 mL de ácido sulfúrico concentrado (95 – 97% m/v).

Em seguida, os tubos com a amostra são transferidos para bloco digestor e a temperatura elevada lentamente até 400 °C, mantida por aproximadamente 2 horas ou até obtenção de uma solução de coloração azul clara e límpida. Os tubos são então retirados do bloco digestor, e recebem aproximadamente 20 mL de água deionizada para evitar a cristalização do extrato.

Os tubos com o sulfato de amônio em meio ácido, formado após a decomposição da matéria orgânica, são conectados a conjunto de destilação, onde são adicionados cerca de 20 mL de solução de hidróxido de sódio 10 mol L⁻¹. Em seguida inicia-se o aquecimento com vapor d'água para promover a liberação do nitrogênio na forma amoniacal. Nesse sistema de destilação por arraste a vapor, a amônia liberada, é arrastada junto com vapor de água até um condensador. Após condensação, a amônia é coletada em 10 mL de solução de ácido bórico 2% (m/v) com indicador de pH. Em seguida, o borato ácido de amônio (NH₄H₂BO₃) formado é titulado com solução de ácido sulfúrico diluída, até atingir o ponto final da titulação.

O cálculo para obtenção da concentração de nitrogênio é realizado com base no princípio de 1 mL de solução de ácido sulfúrico 1,0 mol L⁻¹ ser equivalente à 28 mg de nitrogênio. Para a definição do teor de proteína bruta, a concentração de nitrogênio é multiplicada por 6,25, valor geralmente utilizado para amostras de alimentos volumosos (forrageiras) e concentrados (rações, farelos de trigo e soja, etc.), pois nessas amostras considera-se que as proteínas possuem valor médio de 16% de nitrogênio.

3.5.5.2 – Determinação de PB empregando equipamentos automatizados (**PB2**) (SILVA & QUEROZ, 2002; NOGUEIRA & SOUZA, 2005).

Em geral, os laboratórios participantes do EPLNA que utilizaram sistemas automatizados para quantificação do nitrogênio, empregaram unidades comerciais de destilação (modelo Kjeltex™, Foss Tecator, EUA).

A digestão das amostras segue o mesmo procedimento indicado no item 3.5.5.1. Nesse método, o tubo contendo o extrato é acoplado ao sistema de destilação, previamente programado para adicionar quantidades de solução necessárias para a destilação e titulação da amostra.

Após a finalização do processo de destilação e titulação, os teores de proteína bruta são calculados de forma automática.

3.5.6 - Procedimento empregado na determinação de extrato etéreo (EE). (SILVA & QUEROZ, 2002; NOGUEIRA & SOUZA, 2005).

O extrato etéreo (EE) é definido como a soma de todas as substâncias extraídas pelo éter etílico (éter sulfúrico) ou éter de petróleo. Esses solventes extraem a fração lipídica neutra, que incluem principalmente ácidos graxos livres, acilgliceróis (mono, di e triacilgliceróis), fosfolípidos, glicolípidos e esfingolípidos. Esteróis, ceras pigmentos lipossolúveis e vitaminas também podem ser extraídos (CECCH, 2003).

Em geral, os métodos mais utilizados para a determinação de EE baseiam-se na extração a quente dos lípidos contidos em amostra de alimentos, empregando refluxo com solvente apolar e com tempo de extração que pode levar de 6 a 24 horas, dependendo da quantidade de lípidos da amostra.

3.5.6.1 - Determinação de EE empregando extrator tipo Soxhlet (**EE1, EE2, EE3 e EE4**) SILVA & QUEROZ, 2002; NOGUEIRA & SOUZA, 2005).

O método baseado no extrator tipo Soxhlet emprega como solvente o éter etílico, que sob refluxo intermitente e por sifonação arrasta a gordura extraída da amostra para um balão de vidro. O período de tempo utilizado pelos laboratórios participantes para a extração Soxhlet, varia de 2 a 20 horas, conforme descrito na Tabela 3.12.

3.5.6.2 - Determinação de EE empregando extrator tipo Goldfisch (**EE5 e EE6**) (SILVA & QUEROZ, 2002; NOGUEIRA & SOUZA, 2005).

A determinação de EE realizada em extrator tipo Goldfisch utiliza refluxo de solvente a quente em processo contínuo, com a amostra imersa em éter de petróleo durante a extração.

Para a extração, a amostra é transferida para cartucho cerâmico (ou cartucho de celulose). O cartucho contendo a amostra é inserido dentro de um tubo de vidro e em seguida acoplado em extrator de gordura tipo Goldfisch. O béquer coletor de gordura contendo cerca de 40 mL de éter de petróleo é conectado ao conjunto de destilação, sendo em seguida iniciado o aquecimento até a ebulição do éter. A temperatura é regulada para que a taxa de condensação do éter seja de 5 a 6 gotas min^{-1} . O período de extração, utilizado pelos laboratórios participantes que adotaram esse método, foi de 4 ou 6 horas, conforme descrito na Tabela 3.12.



3.5.6.3 - Determinação de EE empregando extrator automatizado tipo Soxtec™ (EE7) (AOAC, 1990).

Trata-se de versão automatizada do método Soxhlet. As amostras são pesadas, transferidas para um tubo extrator de celulose e inseridas na unidade de extração, sendo em seguida adicionado éter dietílico por meio de sistema fechado, Auto Fat Extraction System. A extração ocorre em quatro etapas: ebulição, lavagem da amostra, recuperação do solvente e secagem do frasco de extração. Nesse procedimento foram utilizados aproximadamente 80 mL de solvente e o tempo de extração empregado foi 45 min.

3.5.6.4 - Determinação de EE empregando extrator automatizado XT20 Fat Analyzer, (EE8) (ANKOM, 2001).

A extração em analisador de gordura XT20 Fat Analyzer (ANKOM Technology Corp., EUA) é realizada utilizando éter de petróleo, por um período de 30 min em uma câmara fechada à 90 °C. A pressão dentro da câmara atinge 55 psi, inibindo dessa maneira a mudança de fase do éter de petróleo, do estado líquido para o estado de vapor. Nessa condição há uma maior eficiência de extração pela manutenção da temperatura acima do ponto de ebulição do éter.

Nesse método, a amostra é transferida para filtro de Teflon® (filter bags), que após são selados para manter a amostra encapsulada. Os filtros contendo as amostras são secos em estufa calibrada a 100 °C por 3 horas, sendo em seguida transferidos para dessecador para resfriamento. Depois de atingir a temperatura ambiente, os saquinhos são pesados e transferidos para o suporte de filtros da unidade de extração. Em seguida é iniciada a extração das

substâncias solúveis no éter, seguindo as condições operacionais pré-estabelecidas, ou seja, temperatura de 90 °C, pressão de 55 psi e tempo de extração de 30 min.

Após a extração, o resíduo é transferido para estufa a 100 °C para secagem por 60 min. O teor de EE é determinado pela redução de massa da amostra após a extração.

Tabela 3.12. Procedimentos empregados pelos laboratórios participantes do EPLNA para a determinação de extrato etéreo.

Código	Procedimento
EE 1	Método Soxhlet – 4 h
EE 2	Método Soxhlet – 2 h
EE 3	Método Soxhlet – 6:00 h
EE 4	Método Soxhlet - 16-20 h
EE 5	Método Goldisch - 04:00 h
EE 6	Método Goldisch - 06:00 h
EE 7	Extrator Tecator - 45 min
EE 8	Extrator Ankom - 40 min

3.5.7 - Procedimento empregado na determinação de lignina (LIG). (SILVA & QUEROZ, 2002; NOGUEIRA & SOUZA, 2005).

A lignina é um polímero complexo, formado basicamente por três compostos fenólicos (tanto na função ácido como na função aldeído): ácido *p*-coumárico, ácido ferúlico e ácido sinápico. É encontrada integralmente como componente da parede celular das plantas e não pode ser digerida pelas enzimas dos animais mamíferos (FUKUSHIMA & HATFIELD, 2001).

Nas plantas, sua principal função é como componente estrutural para dar resistência e rigidez à parede celular, sendo também importante como limitante na perda de água, reduzindo a permeabilidade da parede celular e dessa forma impedindo a ação de microrganismos.

O teor de lignina, em amostras de forrageiras e de alimentos concentrados, é quantificado a partir da FDA. Geralmente o método mais utilizado para realizar essa determinação em laboratórios de nutrição animal é a oxidação da lignina, que é feita por dois diferentes procedimentos, empregando ácido sulfúrico ou permanganato de potássio.

O método do ácido sulfúrico baseia-se na oxidação da celulose, contida no resíduo da FDA, pelo H_2SO_4 a 72 % (m/m) restando apenas lignina e as cinzas insolúveis em ácido no cadinho de vidro. A seguir, por meio de incineração a 500 °C, a lignina é oxidada, restando somente cinzas insolúveis em ácido. O teor de lignina é calculado pela diferença entre as massas do cadinho após a adição de H_2SO_4 menos a massa do cadinho após a calcinação (VAN SOEST et al., 1991).

No método do permanganato de potássio, a lignina é oxidada por meio de solução tamponada de ácido acético e permanganato de potássio, contendo ferro trivalente e prata monovalente como catalisadores, permanecendo no cadinho apenas celulose e cinzas insolúveis em ácido. O teor de lignina é calculado pela perda de massa após o tratamento com a solução de permanganato de potássio (SILVA & QUEROZ, 2002).

Entre os laboratórios participantes do EPLNA, 90,9 % utilizaram a oxidação com ácido sulfúrico, sendo que 72,7 % empregam a solução de ácido sulfúrico na temperatura ambiente (LIG1) e 18,2 % utilizam a solução de ácido sulfúrico à temperatura de 15 °C (LIG2). Os demais laboratórios (9,1 %) empregam a oxidação com permanganato de potássio (LIG3) (Tabela 3.13).

Tabela 3.13. Procedimentos para a determinação de lignina utilizados pelos laboratórios participantes do EPLNA.

Código	Procedimento
LIG 1	Oxidação da lignina com ácido sulfúrico 72% - temperatura ambiente
LIG 2	Oxidação da lignina com ácido sulfúrico 72% - temperatura 15°C
LIG 3	Oxidação da lignina com permanganato de potássio

3.5.7.1 - Procedimento empregado na determinação de lignina pela oxidação com ácido sulfúrico a 72 % (m/v); (LIG1 e LIG2) (SILVA & QUEROZ, 2002; NOGUEIRA & SOUZA, 2005).

Nos cadinhos contendo a FDA, são adicionados em três alíquotas de 30 mL, solução de ácido sulfúrico a 72%. O conteúdo é agitado para homogeneização, permanecendo durante 3 horas para o lento escoamento do ácido. Com sucção a vácuo, os cadinhos com os resíduos são lavados com água quente (95 -100 °C) até a retirada total do ácido e das substâncias solúveis.

Os cadinhos contendo o resíduo (lignina e cinzas insolúveis) são transferidos para estufa de secagem calibrada a 105 °C. Após aproximadamente oito horas ou até peso constante, são retirados e transferidos para dessecador contendo sílica gel até atingirem a temperatura ambiente, sendo a seguir pesados (massa A) em balança analítica.

Os cadinhos são então colocados em forno mufla e o resíduo incinerado durante 3 horas à 500 °C. Após leve resfriamento, transferidos para dessecador e, após atingir a temperatura ambiente, novamente pesados em balança analítica (massa B).

3.5.7.2 - Procedimento empregado na determinação de lignina pela oxidação com permanganato de potássio (LIG3) (SILVA & QUEROZ, 2002; NOGUEIRA & SOUZA, 2005).

Os cadinhos contendo a FDA são colocados em badeja de vidro com aproximadamente 3 cm de água deionizada. Em seguida são adicionados 30 mL de solução combinada de permanganato de potássio com solução tampão acetato (contendo nitrato férrico e nitrato de prata), permanecendo nessa solução por aproximadamente 90 min. Logo após, a solução de permanganato de potássio é filtrada com auxílio de vácuo, sendo adicionados 30 mL de solução alcoólica de ácido oxálico em ácido clorídrico concentrado (solução de desmineralização), permanecendo nessa solução por 15 min.

Posteriormente, os cadinhos com resíduo são lavados com etanol a 80 % (m/v) e acetona e transferidos para estufa calibrada a 105 °C, permanecendo por aproximadamente 8 horas. A seguir os cadinhos são retirados da estufa, transferidos para dessecador e pesados, após atingirem a temperatura ambiente. O teor de lignina é calculado por diferença de pesagem entre a massa do cadinho com o resíduo da FDA e a massa do cadinho com o resíduo após oxidação da lignina com a solução de permanganato de potássio.

3.5.8 - Procedimento empregado na determinação de cinzas (CIN) (SILVA & QUEROZ, 2002; NOGUEIRA & SOUZA, 2005).

O teor de cinzas em forrageiras e alimentos concentrados fornece uma estimativa da concentração total dos constituintes inorgânicos presente na amostra.

Em cadinhos de porcelana com massa conhecida são transferidos aproximadamente 1 g ($\pm 0,1$ mg) de amostra. A seguir os cadinhos contendo as amostras são transferidos para forno do tipo mufla, sendo a temperatura elevada lentamente até 550 – 600 °C, permanecendo nessa temperatura por aproximadamente 4 horas.

O teor de cinzas das amostras é calculado pela diferença de pesagem entre a massa do cadinho vazio e a massa do cadinho com o resíduo após a calcinação.

Entre os laboratórios participantes do EPLNA, foram observadas diferenças quanto ao tempo de permanência no forno mufla, temperatura e quanto ao tipo de energia de aquecimento do forno (Tabela 3.14).

Tabela 3.14. Procedimentos empregados pelos laboratórios participantes do EPLNA para a determinação do teor de cinzas.

Código	Procedimento
CIN 1	Aquecimento elétrico à 600 °C por 3:00 h
CIN 2	Aquecimento elétrico à 600 °C por 4:00 h
CIN 3	Aquecimento elétrico à 550 °C por 4:30 h
CIN 4	Aquecimento com microondas - 2 h

3.5.9 - Procedimentos empregados na determinação dos constituintes inorgânicos (macro e micronutrientes) (SILVA & QUEROZ, 2002; NOGUEIRA & SOUZA, 2005).

Para a determinação dos teores de elementos químicos individuais em amostras de plantas, normalmente é necessária a transformação da matriz orgânica original em uma forma inorgânica simples. A grande maioria das técnicas analíticas exige que o analito esteja dissolvido em meio aquoso. A análise por ativação neutrônica instrumental apresenta-se como alternativa que pode ser implementada para a determinação de constituintes inorgânicos, sem

a necessidade de solubilização da amostra. No entanto, apresenta problemas relacionados a limite de detecção (ARMELIN et al, 2007).

Em razão da baixa solubilidade das plantas em água, para que o analito de interesse esteja disponível para análise é necessária a decomposição do material orgânico com agentes oxidantes e temperaturas elevadas. Normalmente, a dissolução de amostras de plantas forrageiras e de alimentos concentrados é realizada por um dos seguintes métodos: via seca (mediante alta temperatura de combustão) e via úmida (digestão em meio ácido).

Entre os procedimentos para digestão das amostras utilizados pelos laboratórios participantes do EPLNA, foram observados:

a) método por via seca, ou seja, incineração das amostras e posterior solubilização dos constituintes inorgânicos com solução de ácido clorídrico concentrado (**VS1**); solução de ácido nítrico (**VS2**) ou com água régia (**VS3**).

b) decomposição via úmida empregando mistura ácido nítrico e ácido perclórico na proporção 4:1 v/v (**VU4**) ou 2:1 v/v (**VU5**).

c) determinação direta, sem destruição da matéria orgânica (**SD6**).

Na Tabela 3.15 são descritos os diferentes procedimentos de preparo das amostras com vistas às determinações de elementos químicos na forma inorgânica realizados pelos laboratórios participantes do estudo.

Tabela 3.15. Procedimento de digestão das amostras para a determinação de macro e micronutrientes empregados pelos laboratórios participantes do EPLNA.

Código	Procedimento
VS1	Via seca e HCl 1,0 molL ⁻¹ (v/v)
VS2	Via seca e HNO ₃ 1,0 molL ⁻¹ (v/v)
VS3	Água Régia (HNO ₃ : HCl; 1:3 v/v)
VU4	HNO ₃ : HClO ₄ (4:1) (v/v)
VU5	HNO ₃ : HClO ₄ (2:1) (v/v)
SD6	Sem destruição da matéria orgânica

3.5.9.1 - Procedimentos de digestão das amostras por via seca (VS1; VS2 e VS3).

Para decomposição da matéria orgânica, são transferidos para cadinho de porcelana, 0,50 g ($\pm 0,1$ mg) de amostra. O cadinho é transferido para forno do tipo mufla com temperatura controlada, sendo em seguida a temperatura elevada gradativamente para 500 - 550 °C. Nessa temperatura, a amostra permanece por tempo variável de 2 a 4 horas, sendo incinerada até a obtenção de cinzas claras.

Após a calcinação, as cinzas são dissolvidas com solução de ácido clorídrico 1,0 mol L⁻¹ (**VS1**), ácido nítrico 1,0 mol L⁻¹ (**VS2**) ou com solução com os dois ácido combinados (água régia) (**VS3**). Logo após, o extrato é transferido para balão volumétrico de 25 mL, sendo o volume completado com água deionizada (NOGUEIRA & SOUZA, 2005).



3.5.9.2 - Procedimentos de digestão das amostras por via úmida (VU4; e VU5).

As amostras são solubilizadas com ácidos oxidantes concentrados ou mistura desses. A combinação do ácido nítrico e do ácido perclórico é a mistura mais utilizada pelos laboratórios participantes do EPLNA. A maioria das amostras é totalmente oxidada, deixando os elementos a serem quantificados na solução ácida, em formas inorgânicas simples e apropriados para análise.

Nesse procedimento, são transferidos para tubo de digestão 500 mg ($\pm 0,1$ mg) de amostra e 6,0 mL de mistura de ácido nítrico e de ácido perclórico na proporção de 2:1 v/v (**VU4**) ou 4:1 v/v (**VU5**). Em seguida, as amostras permanecem em pré-digestão por aproximadamente 12 horas, sendo depois, transferidas para bloco de digestão.

No bloco a temperatura é aumentada gradativamente até 120°C, permanecendo nessa temperatura até cessar totalmente o desprendimento de NO₂ (vapor castanho). Em seguida, a temperatura é elevada lentamente até atingir 210°C, permanecendo nessa temperatura até a liberação de fumos brancos de HClO₄·H₂O e obtenção do extrato incolor (± 20 min).

Logo após, os tubos contendo o extrato incolor, são retirados do bloco digestor e depois de esfriar até a temperatura ambiente, transferidos para frascos volumétricos onde o volume é completado para 50,0 mL com água deionizada.



3.5.9.3 - Procedimentos empregados para a quantificação dos constituintes inorgânicos (macro e micronutrientes) (SILVA & QUEROZ, 2002; NOGUEIRA & SOUZA, 2005).

Assim como para os outros ensaios, os laboratórios utilizaram metodologias independentes para a quantificação dos macronutrientes Ca, Mg, P, K e Na e dos micronutrientes Cu, Fe, Mn e Zn. As técnicas utilizadas pelos diferentes laboratórios foram:

A - Espectrometria de Absorção Atômica com Chama - FAAS;

B - Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Acoplado Indutivamente – ICP OES;

C - Análise por Ativação Neutrônica – AAN;

D - Fotometria de Chama;

E - Espectrofotometria de Absorção Molecular;

F - Volumetria de Oxidação-Redução com Permanganato de Potássio.

As determinações foram realizadas com base nas condições operacionais de cada instrumento, não sendo estabelecidas as condições padronizadas dentro da mesma técnica analítica. Na Tabela 3.16, são apresentados para cada constituinte, o número de laboratórios e a porcentagem em cada método utilizado.

Tabela 3.16. Procedimentos empregados para a determinação dos teores de macro e micronutrientes pelos laboratórios participantes do EPLNA.

Elemento	A	B	C	D	E			F
					1	2		
						a	b	
Ca	19 (86,4%)	1 (4,5%)	1 (4,5%)					1 (4,5%)
Mg	19 (90,5%)	1 (4,8%)	1 (4,8%)					
P	1 (4,8%)	1 (4,8%)	1 (4,8%)		11 (52,4%)	6 (28,6)	1 (4,8%)	
K	9 (50%)	2 (11,1%)	1 (5,6%)	6 (33,3%)				
Na	8 (47,1%)	2 (11,8%)	1 (5,9%)	6 (35,3%)				
Cu	17 (85,0%)	2 (10,0%)	1 (5,0%)					
Fe	16 (84,2%)	2 (10,5%)	1 (5,3%)					
Zn	17 (85,0%)	2 (10,0%)	1 (5,0%)					
Mn	17 (85,0%)	2 (10,0%)	1 (5,0%)					

E1: método espectrofotométrico com azul de molibdênio; E2a: método espectrofotométrico com metavanadato e procedimento manual; E2b: método espectrofotométrico com metavanadato e sistema de análise por injeção em fluxo (FIA).

3.6 – Avaliações estatísticas

O projeto estatístico empregado seguiu os conceitos recomendados nas normas ABNT ISO/IEC GUIA 43-1 e no protocolo internacional harmonizado para ensaio de proficiência em laboratórios analíticos (Químicos) (ABNT ISO/IEC 43, 1999; THOMPSON et al, 2006). No entanto, foram avaliadas diferentes técnicas estatísticas para o cálculo do valor designado e da incerteza a ele associada. Foram também incluídos nesse contexto a avaliação de procedimentos para a exclusão de valores dispersos (“outliers”), os quais podem afetar o intervalo de aceitação dos resultados e o desempenho dos laboratórios.

Na Tabela 3.17 são apresentados de forma sintetizada os procedimentos empregados para a avaliação dos resultados. Dessa forma, quando foram considerados os valores da média aritmética para determinar o valor designado e a estimativa do desvio padrão para definir o desvio padrão alvo, esses foram calculados após a exclusão de “outliers”. Entretanto, quando foi utilizada a mediana como valor designado, o desvio padrão alvo foi calculado por meio do intervalo quartílico normalizado (IQN) (CHUI et al, 2004) e da equação de Horwitz (THOMPSON et al, 2006).

Tabela 3.17. Procedimentos estatísticos adotados para estabelecer o valor designado e desvio padrão utilizados para o cálculo do “Índice z”.

Valor designado (\bar{X})	Testes detecção de “outliers”	Desvio padrão alvo (σ_p)	Método estatístico
Média	Dixon	$\sigma_{P-Dixon}$	A
	Grubbs	$\sigma_{P-Grubbs}$	B
	Hampel	$\sigma_{P-Hampel}$	C
	M \pm 1s e M1 \pm 1s	$\sigma_{P-M1\pm1s}$	D
Mediana		σ_{P-IQN}	E
		$\sigma_{P-Horwitz}$	F

3.6.1 – Avaliação do intervalo de aceitação dos resultados

O intervalo de aceitação dos resultados empregado no EPLNA, foi determinado por meio do “Índice z”, onde x_i é o resultado informado pelo laboratório participante; \bar{X} é o valor designado (é uma estimativa do valor verdadeiro, μ), e “ σ_p ” é o desvio padrão alvo, de acordo com a fórmula:.

$$z = \frac{(x_i - \bar{X})}{\sigma_p}$$

3.6.2 – Métodos aplicados para a exclusão de resultados dispersos (“outliers”).

Para verificação dos valores considerados “outliers” foram realizados os seguintes testes estatísticos: teste de Dixon; teste de Grubbs e teste de Hampel.

a) Teste de Dixon.

Este é um teste bilateral, isto é, são testados os valores mínimo e máximo de um conjunto de resultados ordenados em ordem crescente. Sendo o calculo realizado pela razão entre a diferença do valor extremo (menor ou o maior valor) dividida pela amplitude total (Figura 3.5). O resultado foi considerado “outlier” quando o valor dessa razão foi superior ao valor crítico tabelado (CIENFUEGOS, 2005).

Valor mínimo	Valor máximo
<i>total de 3 a 7 resultados</i>	
$D_{3-7} = \frac{Z(2) - Z(1)}{Z(H) - Z(1)}$	$D_{3-7} = \frac{Z(H) - Z(H-1)}{Z(H) - Z(1)}$
<i>total de 8 a 12 resultados</i>	
$D_{8-12} = \frac{Z(2) - Z(1)}{Z(H-1) - Z(1)}$	$D_{8-12} = \frac{Z(H) - Z(H-1)}{Z(H) - Z(2)}$
<i>total de 13 a 40 resultados</i>	
$D_{13-40} = \frac{Z(3) - Z(1)}{Z(H-2) - Z(1)}$	$D_{13-40} = \frac{Z(H) - Z(H-2)}{Z(H) - Z(3)}$

Figura 3.5. Fórmulas utilizadas para verificação de “outliers pelo teste de Dixon. Considerando um conjunto de resultados, Z(H), H=1,2, ...H, agrupados em ordem crescente.

b) Teste de Grubbs.

O teste de Grubbs (G) foi realizado por meio da razão entre a diferença de cada resultados (x_i) com a média de todos os resultados (\bar{X}) em relação ao desvio padrão (s). Um valor foi considerado como “outlier” quando o valor

de “G” é maior que o valor crítico correspondente valores tabelado (GRUBBS, 1969). O teste foi realizado no nível de significância de 95 % e foi repetido até não serem detectados outros “outliers”.

$$G = \frac{[x_i - \bar{X}]}{s}$$

c) Teste de Hampel.

O teste de Hampel é considerado método robusto para detectar resultados considerados “outliers”. Inicialmente, foi calculado o residual individual (r_i) por meio da diferença do resultado do laboratório (x_i) em relação à mediana (\bar{X}_{med}) de todos os resultados. A seguir os valores obtidos dos r_i , foram ordenados em ordem crescente, sendo então encontrado o valor residual mediano (r_m). O valor foi considerado um “outlier” quando o r_i for maior do que $r_m \times 5,06$, considerando nível de significância de 95 % (LINSINGER, et al, 1998).

3.6.3 – Determinação do valor designado (\bar{X}) e do valor alvo para o desvio padrão (s).

Para o estudo dos valores designados (\bar{X}) foram considerados os valores de consenso dos laboratórios participantes, sendo utilizada a média aritmética (estatística clássica) ou a mediana dos resultados (estatística robusta).

Quando foi empregada a estatística clássica, os valores de \bar{X} e s foram obtidos conforme descrito em 3.6.3a e 3.6.3b. Por outro lado, ao se utilizar a mediana como valor designado, não houve necessidade de executar teste para

exclusão de “outliers” já que se trata de estatística robusta. Assim, os valores de \bar{X} e s foram calculados conforme descrito em 3.6.3c.

3.6.3a - Determinação do valor designado (\bar{X}) e o desvio padrão (s) considerando a média ± 1 desvio padrão.

O critério utilizado para definir \bar{X} e “ s ” dos ensaios foi: considerando todos os resultados enviados pelos participantes, calculou-se a média (**M**) e o desvio padrão (**s**). Os resultados que ficaram fora do intervalo entre **M \pm 1s** foram separados. Com os outros dados (os que ficaram dentro do intervalo entre **M \pm 1s**), foi determinada nova média (**M**), e a estimativa do desvio padrão (**s**). A segunda média e o desvio padrão foram considerados como valores designados para determinação do “Índice z ”.

3.6.3b - Determinação do valor designado (\bar{X}) e o desvio padrão (s) considerando a média e o desvio padrão após a exclusão de “outliers”.

Utilizando-se a média como valor designado, aplicaram-se primeiramente os testes para exclusão de “outliers” (itens 3.6.2a, b e c), assim, evitou-se a influência desses resultados na estimativa do valor verdadeiro (valor designado) e a sua incerteza associada (desvio padrão).

3.6.3c - Determinação do valor designado (\bar{X}) e o desvio padrão (s) considerando a mediana e o desvio padrão a partir do Intervalo Interquartílico Normalizado (**IQN**) (CHUI et al, 2004).e da equação de Horwitz (THOMPSON et al, 2006).

- A mediana (MED) é definida como o valor central ou o valor que divide a distribuição dos pontos em duas partes iguais quando esses são ordenados em ordem crescente. Assim, a MED é muito pouco influenciada pelos resultados considerados dispersos podendo ser empregada como valor designado para o cálculo do “Índice z robusto”.
- Intervalo quartílico normalizado (IQN) (ANALITICA METHODS COMMITTEE, 1989): o intervalo quartílico (IQ) é a diferença entre o maior quartil (Q_3) e o menor quartil (Q_1) de um conjunto de resultados ordenados em ordem crescente. Sendo o Q_1 o valor abaixo do qual estão presentes 25 % dos resultados e o Q_3 o valor acima do qual estão presentes outros 25 % dos resultados. O desvio padrão (s) torna-se comparável com valor do IQN quando o mesmo é expresso como 0,7413 do valor do IQ, ou seja, $IQN = IQ \times 0,7413$.
- Equação de Horwitz (THOMPSON et al, 2006): neste modelo existe uma relação entre os parâmetros de precisão e a concentração dos analitos presentes em uma determinada amostra. Dessa forma, foi empregado esse modelo para prever o valor do desvio padrão alvo utilizado no cálculo do “Índice z robusto”. Utilizando esse critério, o desvio padrão alvo (σ_p) foi determinado para as concentrações (c) expressa como uma grandeza adimensional (p.e.: $1 \text{ mg kg}^{-1} = 10^{-6}$; $1\% = 10^{-2}$), sendo utilizados o valor da mediana obtida para cada ensaio e amostra.

Assim, para se expressar o desvio padrão adimensional por meio da equação de Horwitz, nas unidades de concentração originais, foi necessário ser dividida pela ordem de grandeza (m), conforme as fórmulas.

$$\sigma_p = \frac{0,02c^{0,8495}}{m}$$

Fórmula de Horwitz para a faixa de concentração entre $\geq 120 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $\leq 13,8 \%$.

$$\sigma_p = \frac{0,01c^{0,5}}{m}$$

Fórmula de Horwitz para a faixa de concentração $> 13,8 \%$.

3.6.4 - Avaliação de desempenho

O desempenho dos laboratórios foi avaliado para cada ensaio considerando o valor do “Índice z ”, o qual representa uma medida relativa do resultado obtido pelo laboratório em relação ao valor designado como referência do ensaio de proficiência. Para definir os resultados que estão fora do intervalo de confiança foi adotado o seguinte critério: o resultado que estivesse dentro do intervalo $|z| \leq 2$ foi considerado satisfatório; o resultado que estivesse no intervalo $2 < |z| < 3$ foi considerado resultado questionável e foi sinalizado com um asterisco (*); e o resultado que estivesse acima do intervalo $|z| \geq 3$ foi considerado insatisfatório e recebeu dois asteriscos (**).

Para a classificação dos laboratórios foi considerada a quantidade de ensaios com desempenho satisfatório e o número de ensaios com asteriscos, ou seja, com desempenho considerado questionável ou insatisfatório. Foi designado peso dois (2) para os resultados com dois asteriscos (**), A2, e

peso um (1) para os dados com um asterisco (*), A1. O índice de acerto do laboratório (IA) foi calculado conforme as fórmulas:

$$N^* = \frac{[(A1 \times 1) + (A2 \times 2)]}{3} \qquad ID(\%) = 100 - \left[\frac{N^* \times 100}{NE} \right]$$

Sendo o Índice de Desempenho (ID) de cada Laboratório participante, N* quantidade de asteriscos recebidos e NE a quantidade de ensaios realizados.

Capítulo 4

Resultados e Discussão



4 - Resultados e Discussão

4.1 - Resultados do teste de homogeneidade

Na Tabela 4.1, são apresentados os resultados médios (M) obtidos para cada material de ensaio, acompanhados do desvio padrão alvo (σ) estimado pela equação de Horwitz (THOMPSON et al, 2006); da soma dos quadrados entre amostras ($\sum Q_{AM}$); da soma dos quadrados analítica

($\sum Q_{AN}$); do desvio padrão entre as amostras ($s_{am} = \sqrt{\frac{\left(\frac{\sum Q_{AM}}{N-1} - \frac{\sum Q_{AN}}{N}\right)}{2}}$) e

do desvio padrão analítico ($s_{an} = \sqrt{\frac{\sum SQ_{AN}}{N}}$).

A homogeneidade das amostras pode ser avaliada por meio do teste de Fisher (*teste F*) ou da razão entre o s_{am} e o valor de σ (s_{am} / σ).

Considerando-se 3,02 como o valor crítico de $F_{9,10}$ para $p=0,05$, observa-se que não houve diferença significativa para as amostras empregadas no 3º ano do EPLNA em 2006 (Tabela 4.1), indicando homogeneidade suficiente desses materiais para atingir os objetivos estabelecidos pelo Ensaio de Proficiência. O mesmo pode ser considerado para todas as amostras avaliadas quando considerada a razão s_{am} / σ como

critério de avaliação de homogeneidade. Nesse caso, o recomendado pela ABNT ISO/IEC 43-1 deve ser inferior a 0,30 para que a amostra tenha homogeneidade aceitável para Ensaio de Proficiência (ABNT ISO/IEC 43, 1999).

Deve ser enfatizado que esses resultados foram empregados apenas para a avaliação da homogeneidade dos materiais utilizados pelo Ensaio de Proficiência, não sendo utilizadas como valor alvo ou referência.

Tabela 4.1. Resultados dos ensaios proteína bruta (PB) e cálcio (Ca), obtidos no teste de homogeneidade dos materiais que foram utilizados no Ensaio de Proficiência.

Nº. da amostra	Ensaio	M	σ^*	$\sum Q_{AM}$	$\sum Q_{AN}$	S_{am}	Teste $F_{9, 10}$	s_{am} / σ
Amostras de volumoso								
A3V01 e A3V07	PB (%)	6,46	0,20	0,2024	0,2189	0,017	1,03	0,09
A3V13	PB (%)	2,76	0,09	0,0346	0,0527	0,026	1,35	0,29
A3V19	PB (%)	14,90	0,40	1,2169	1,0992	0,112	1,23	0,28
A3ARV	PB (%)	15,08	0,39	0,5141	0,3922	0,094	1,46	0,24
Amostras de concentrado								
A3C03 e A3C21	PB (%)	22,24	0,56	3,7488	3,7909	0,143	1,11	0,26
A3C09	PB (%)	12,91	0,35	0,3086	0,2933	0,055	1,18	0,16
A3C15	PB (%)	6,64	0,20	0,1104	0,1793	0,053	1,46	0,27
A3ARC	PB (%)	40,53	0,93	5,3270	4,5162	0,265	1,31	0,29
Amostras de mistura mineral								
A3M05	Ca (g/kg)	141,80	3,77	34,3172	35,3331	0,374	1,08	0,10
A3M11 e A3M17	Ca (g/kg)	136,71	3,32	290,4991	317,1792	0,529	1,02	0,16
A3M23	Ca (g/kg)	131,66	3,22	439,3378	467,2812	1,021	1,04	0,30
A3ARM	Ca (g/kg)	115,51	2,88	295,0642	325,8106	0,319	1,01	0,11

a) para concentrações entre $\geq 120 \mu\text{g/kg}$ e $\leq 13,8\%$, $\sigma = 0,02c^{0,8495}/mr$, b) para concentrações $> 13,8\%$, $\sigma = 0,01c^{0,5}/mr$. σ = desvio padrão alvo; c = concentração média; mr = razão adimensional da massa ($\% = 10^{-2}$).

4.2 - Avaliação dos métodos utilizados no EPLNA.

Durante a realização do Ensaio de Proficiência foi aplicado questionário aos participantes (Anexo B), que forneceram informações sobre o método analítico empregado em cada ensaio. Esse levantamento foi efetuado em complementação ao Ensaio, pois as metodologias não foram previamente estabelecidas. Dessa forma, após a tabulação das informações contidas no questionário, foi possível obter um quadro sinóptico dos métodos utilizados pelos laboratórios de nutrição animal em atividade no Brasil.

Na Tabela 4.2, é possível observar que para um mesmo tipo de ensaio, os laboratórios participantes do EPLNA utilizam métodos distintos de análise. Dentre os ensaios avaliados, PB é o que apresentou menor variação no método utilizado, sendo observado que todos os participantes empregam o método Kjeldahl para a digestão da amostra. No entanto, 68,8% dos laboratórios utilizam destilação em sistema manual e 41,7% utilizam sistemas automatizados para a destilação e titulação do nitrogênio.

O oposto ocorre para o ensaio EE. Foram observados quatro métodos distintos entre os laboratórios que realizam esse ensaio: extração pelo método Soxhlet, extração pelo método Goldfish, extrator Tecator[®] e extrator Ankon[®]. Entre os laboratórios que utilizam a extração pelo método Soxhlet, foram empregados tempos de extração diferente, sendo: 4:00 horas (34,5% dos laboratórios), 2:00 horas (3,4% dos laboratórios), 6:00 horas (24,1% dos laboratórios) e de 16:00 a 20:00 horas (3,4% dos laboratórios). Para a extração empregando o método Goldfish foram descritos dois tempos de extração: 4:00 horas (10,3% dos laboratórios) e 6:00 horas (13,7% dos laboratórios).

As informações contidas neste levantamento serviram de base para avaliação dos procedimentos empregados pelos laboratórios. Esses resultados permitem a proposição de uma padronização ou a substituição de procedimentos que apresentem maior variabilidade entre os resultados.

Tabela 4.2. Informações sobre os métodos analíticos utilizados pelos laboratórios participantes do EPLNA.

Matéria Seca (MS)			
Código	Temperatura e tempo de secagem	Número de laboratórios	% de laboratórios*
MS 1	Temperatura de 105 °C – tempo de 4h	3	9,7
MS 2	Temperatura de 105 °C - tempo de 5h	1	3,2
MS 3	Temperatura de 105 °C - tempo de 12h	19	61,3
MS 4	Temperatura de 105 °C - tempo de 16h	5	16,1
MS 5	Temperatura de 105 °C - tempo de 24h	2	6,5
MS 6	Temperatura de 130 °C - tempo de 2h	1	3,2
Fibra em Detergente Ácido (FDA)			
Código	Procedimento	Número de laboratórios	% de laboratórios
FDA 1	500 mg de amostra e 100 mL de SDA	12	52,2
FDA 2	350 mg de amostra e 35 mL de SDA	7	30,4
FDA 3	Método automático	1	4,3
FDA 4	Método “Nylon Bag”	3	13,0
Fibra em Detergente Neutro (FDN)			
Código	Procedimento	Número de laboratórios	% de laboratórios
FDN 1	500 mg de amostra e 100 mL de SDA	13	54,2
FDN 2	350 mg de amostra e 35 mL de SDA	7	29,2
FDN 3	Método automático	1	4,2
FDN 4	Método “Nylon Bag”	3	12,5
Proteína Bruta (PB)			
Código	Procedimento	Número de laboratórios	% de laboratórios
PB 1	Destilação em sistema manual	21	67,7
PB 2	Destilação sistema automático	10	32,3
Extrato Etéreo (EE)			
Código	Procedimento	Número de laboratórios	% de laboratórios
EE 1	Método Soxhlet - 4 h	10	34,5
EE 2	Método Soxhlet - 2 h	1	3,4
EE 3	Método Soxhlet - 6:00 h	7	24,1
EE 4	Método Soxhlet - 16-20 h	1	3,4
EE 5	Método Goldisch - 04:00 h	3	10,3
EE 6	Método Goldisch - 06:00 h	4	13,7
EE 7	Extrator Tecator - 45 min	2	6,9
EE 8	Extrator Ankom - 40 min	1	3,4
Lignina (LIG)			
Código	Procedimento	Número de laboratórios	% de laboratórios
LIG 1	Método ácido sulfúrico 72% - temperatura ambiente	16	72,7
LIG 2	Método ácido sulfúrico 72% - temperatura 15°C	4	18,2
LIG 3	Método Permanganato de potássio	2	9,1
Cinzas (CIN)			
Código	Procedimento	Número de laboratórios	% de laboratórios
CIN 1	Aquecimento elétrico à 600 °C por 3:00 h	11	39,3
CIN 2	Aquecimento elétrico à 600 °C por 4:00 h	14	50,0
CIN 3	Aquecimento elétrico à 550 °C por 4:30 h	2	7,1
CIN 4	Aquecimento com microondas - 2 h	1	3,6

Tabela 4.2. Continuação.

Procedimentos de digestão das amostras para análises de macronutrientes e micronutrientes			
Código	Procedimento	Número de laboratórios	% de laboratórios
VS1	Via seca e HCl 1,0 molL ⁻¹ (v/v)	10	45,5
VS2	Via seca e HNO ₃ 1,0 molL ⁻¹ (v/v)	1	4,5
VS3	Água Régia (HNO ₃ : HCl; 1:3 v/v)	2	9,0
VU4	HNO ₃ : HClO ₄ (4:1) (v/v)	7	31,8
VU5	HNO ₃ : HClO ₄ (2:1) (v/v)	1	4,5
SD6	Sem destruição da matéria orgânica	1	4,5

*Obs.: Os valores em % foram considerados em função do número total de laboratórios que forneceram resultados para o ensaio em questão.

4.3 - Avaliação da variabilidade interlaboratorial

Com o objetivo de se realizar a análise exploratória dos resultados dos laboratórios foram utilizados diagramas de caixa (*Box-Plot*), os quais representam a análise gráfica a partir de cinco medidas estatísticas: valor mínimo, valor máximo, mediana, e primeiro e terceiro quartil da variável quantitativa. Por meio deste conjunto de informações é possível avaliar características importantes do conjunto de dados como: a dispersão dos dados em torno da média, o grau e a direção da assimetria e a presença de dados discrepantes.

Dessa forma, como uma primeira avaliação da distribuição dos dados em relação à mediana e à diferença interquartilica, foram construídos diagramas *Box-Plot* considerando os ensaios realizados nos três anos do Ensaio de Proficiência (primeiro ano (A1), segundo ano (A2) e terceiro ano (A3)).



4.3.1 - Avaliação da distribuição dos resultados analíticos das amostras de volumoso e concentrado

4.3.1.a - Ensaios avaliados

Os valores dos coeficientes de variação (cv) dos resultados dos ensaios avaliados para as amostras de volumoso e concentrado são apresentados na Tabela 4.3. Esses valores possibilitaram a comparação entre os ensaios, com a indicação daqueles que apresentam maior dispersão dos resultados e a avaliação da variabilidade interlaboratorial durante o decorrer dos anos.

Entre os ensaios avaliados para as amostras de volumoso, os menores valores médios de cv, considerando os três anos, foram apresentados pela MS (cv = 1,4%), FDN (cv = 7,5%) e FDA (cv = 8,6%). Para as amostras de concentrado, os menores valores médios de cv foram observados na MS (cv = 1,6%), DIVMS (cv = 8,2%) e PB (cv = 18,7%).

Considerando o valor médio dos coeficientes de variação dos três anos, para as amostras de volumoso o EE foi o ensaio com maior variabilidade (cv = 47,2%). Entre as amostras de concentrado o ensaio de LIG apresentou maior dispersão entre os resultados (cv = 77,1%). LANARI et al. (1991), em estudo interlaboratorial com amostras de alimentos, também encontraram elevados coeficientes de variação para as determinações de EE e LIG.

Tabela 4.3. Coeficiente de variação médio observado nos ensaios avaliados.

Ensaio	Volumoso			Concentrado		
	Ano 1	Ano 2	Ano 3	Ano 1	Ano 2	Ano 3
	cv (%)					
MS	1,2	1,7	1,2	1,8	1,8	1,3
DIVMS	14,6	11,9	15,8	11,1	8,2	5,4
FDA	8,7	7,7	9,3	37,5	9,2	48,4
FDN	5,9	10,2	6,3	39,6	18,8	41,9
PB	48,0	12,0	7,7	16,4	14,1	25,6
EE	65,6	43,8	32,1	58,8	29,6	25,8
LIG	38,0	26,4	59,3	65,0	51,8	114,4
CIN	15,1	11,3	37,9	37,0	24,1	61,6

Nas Figuras 4.1 e 4.2 são apresentados os gráficos *Box-Plot* das amostras de volumoso e concentrado referentes aos ensaios FDN e PB, respectivamente. A presença de resultados considerados discrepantes (“outliers”), indicada por meio das marcações individuais nos extremos das caixas, foi observada para a maioria das amostras.

Como é possível visualizar na Figura 4.1, as amostras de volumoso apresentam menor variabilidade em comparação com as amostras de concentrado para o ensaio de FDN. A diminuição da dispersão caracterizada pela menor diferença interquartílica nas amostras do A3 em relação ao A1 e ano A2 também foi observada.

Dentre as amostras avaliadas para o ensaio de FDN (Figura 4.1), os resultados das amostras de *Estilosantes Campo Grande* (A2V01) e *Leucaena leucocephala* (A3V19) apresentaram elevada dispersão, com coeficientes de variação respectivamente iguais a 27,0% e 14,2%. Essas espécies, leguminosas contêm em sua constituição maiores teores de proteína quando comparadas com as demais amostras de volumoso analisadas, que se caracterizam como gramíneas.

Conforme pode ser observado na Figura 4.1, as distribuições dos dados das amostras de concentrado em geral apresentam assimetria positiva. Nessas amostras geralmente a concentração de amido é elevada, o que resulta em interferência positiva nos teores de FDN. A solução detergente neutro a quente promove a gelatinização do amido contido nas amostras de concentrado, o qual por entupimento dos poros do cadinho bloqueia a filtragem do conteúdo celular solubilizado pela solução detergente. Dessa forma, apesar de ser recomendada hidrólise enzimática desse carboidrato antes da realização do ensaio FDN, os resultados fornecidos por alguns laboratórios não se apresentaram precisos.

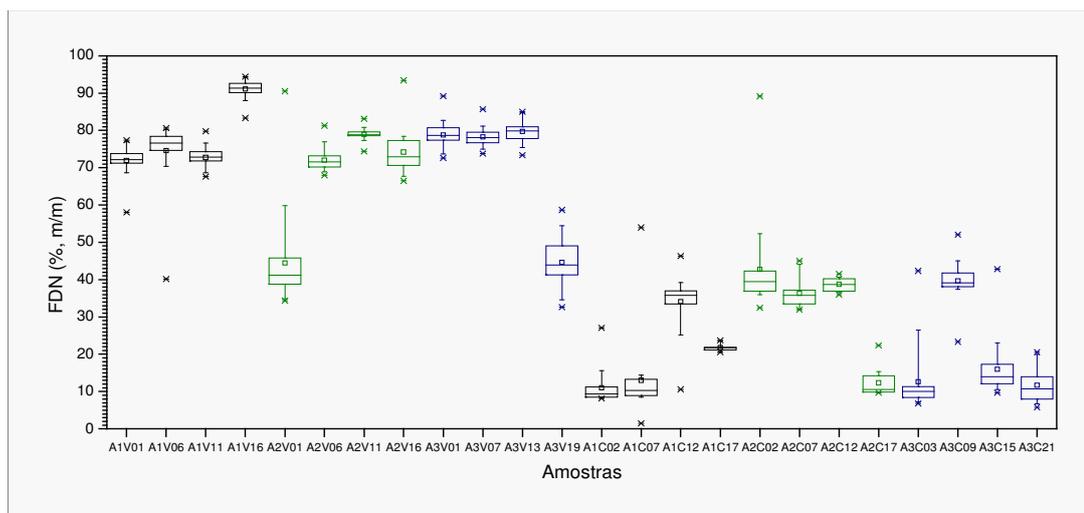


Figura 4.1. Distribuição dos resultados fornecidos pelos laboratórios referentes ao ensaio FDN para as amostras de volumoso e concentrado.

A dispersão dos dados para o ensaio de PB é razoavelmente baixa, como pode ser observado no gráfico *Box-Plot* apresentado na Figura 4.2. Foi observada menor variabilidade entre as amostras do A3 quando considerado o coeficiente de variação médio desse ensaio por ano para as amostras de volumoso ($cv_{A1} = 48,0\%$; $cv_{A2} = 12,0\%$ e $cv_{A3} = 7,0\%$).

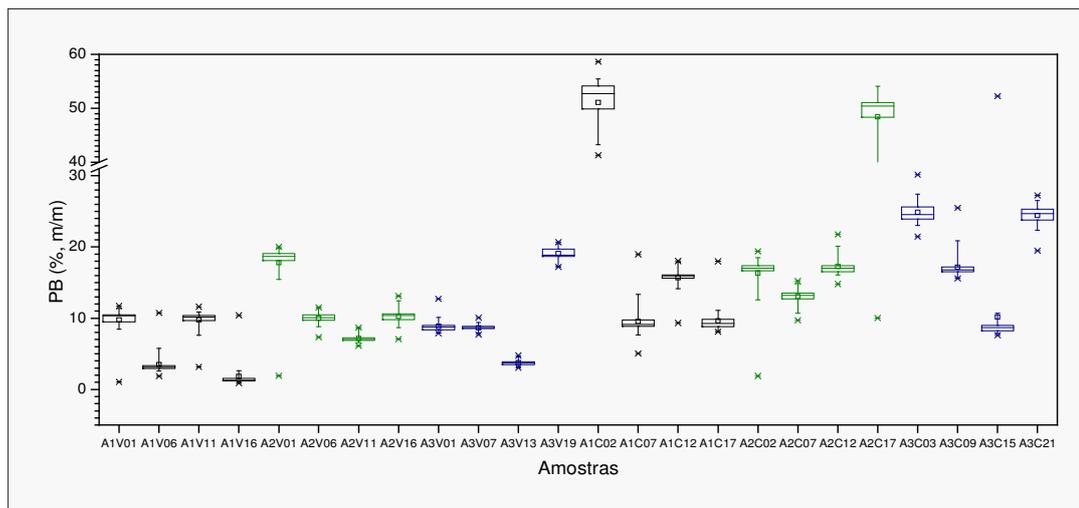


Figura 4.2. Distribuição dos resultados do ensaio PB para as amostras de volumoso e concentrado.

A elevada variabilidade entre os resultados do ensaio EE possivelmente ocorreu devido ao emprego pelos laboratórios de diferentes métodos de determinação e de tempos de extração. No entanto, uma diminuição na dispersão dos resultados foi observada para esse ensaio nas amostras referentes ao terceiro ano do ensaio (A3) (Figura 4.3).

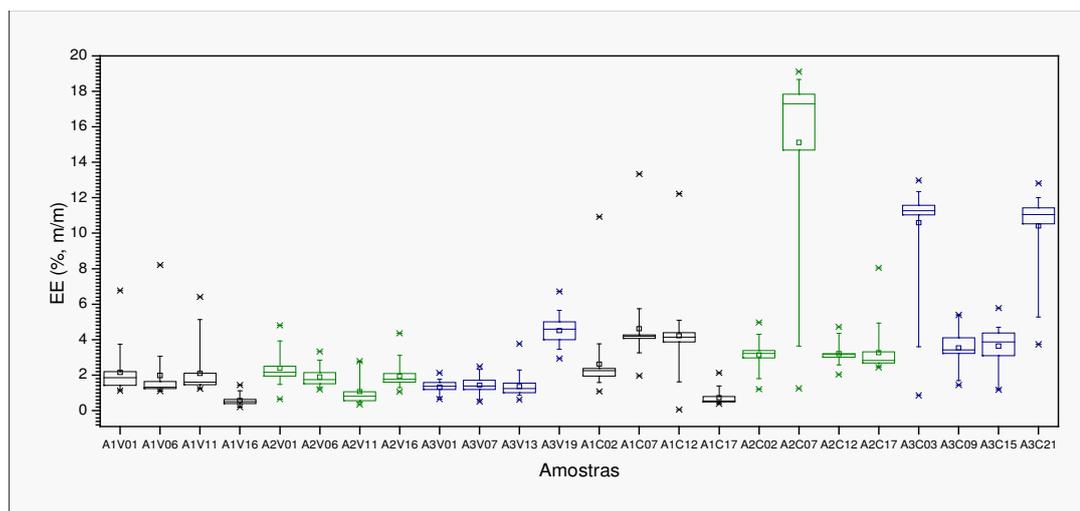


Figura 4.3. Distribuição dos resultados do ensaio extrato etéreo (EE) das amostras de volumoso e concentrado.

Para o ensaio LIG foi observada maior variabilidade entre as amostras relativas ao terceiro ano (A3V01, A3V07, A3V13 e A3V19) quando comparadas com as amostras dos dois primeiros anos do ensaio. Essas amostras apresentaram maior número de resultados discrepantes, resultando em comportamento assimétrico na distribuição dos dados (Figura 4.4).

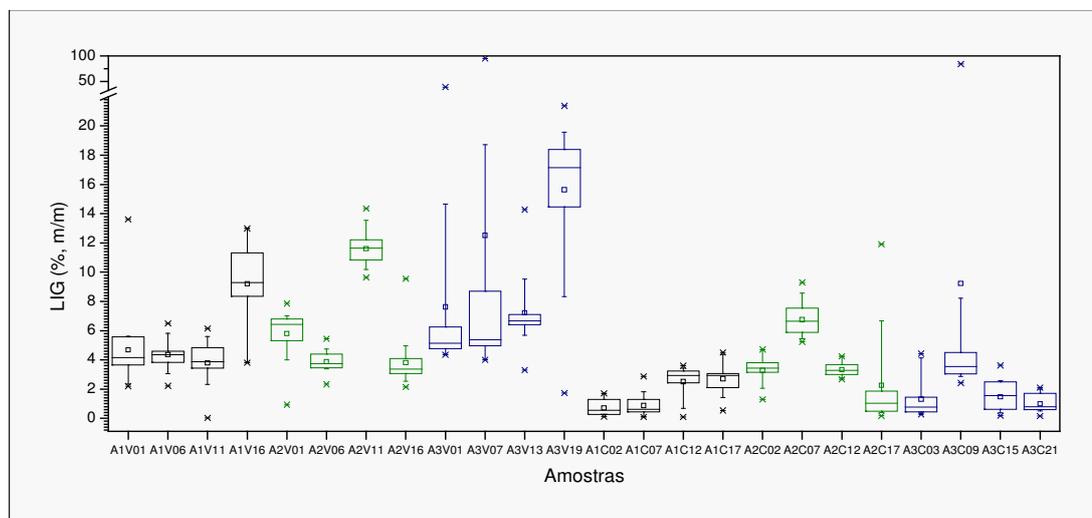


Figura 4.4. Distribuição dos resultados do ensaio lignina (LIG) para as amostras de volumoso e concentrado.

Para os outros ensaios referentes às amostras de volumoso (MS, FDA, DIVMS e Cinzas) e de concentrado (MS, DIVMS), também pode ser observada a redução da dispersão dos dados, quando os coeficientes de variação referentes ao terceiro ano foram comparados aos obtidos nos dois primeiros anos (Anexo C). BOVERA et al. (2003) em estudo interlaboratorial para avaliar a repetitividade e reprodutibilidade de análises bromatológicas em amostras de volumoso e concentrado encontraram, para ambos os estudos, coeficientes de variação insatisfatórios, de acordo com os critérios estatísticos estabelecidos, o que não ocorreu no presente estudo.

4.3.1b- Ensaios relacionados à determinação de macronutriente (Ca, Mg, P, K e Na) e de micronutrientes (Cu, Fe, Zn e Mn) das amostras de volumoso e concentrado.

Os ensaios relacionados aos macro- e micronutrientes das amostras de volumoso e concentrado apresentaram elevados coeficientes de variação para a maioria das determinações e amostras. Entretanto, redução da variabilidade interlaboratorial dos resultados dos ensaios Ca, P, K, Fe e Mn foi observada para as amostras de volumoso e P, K e Mn para as amostras de concentrado, quando o coeficiente de variação médio das amostras do ano três foi comparado com os coeficientes de variação médios obtidos nos anos um e dois do experimento (Tabela 4.4).

Tabela 4.4. Coeficiente de variação dos ensaios macro- e micronutrientes das amostras de volumoso e concentrado.

Ensaio	Volumoso			Concentrado		
	Ano 1	Ano 2	Ano 3	Ano 1	Ano 2	Ano 3
	cv (%)					
Ca	62,9	53,6	33,8	75,5	110,0	112,7
Mg	55,7	30,4	36,6	43,4	117,7	87,0
P	76,4	48,3	47,3	43,5	40,4	33,4
K	43,2	44,5	22,0	50,8	45,0	29,4
Na	88,9	160,0	95,8	85,4	179,7	117,1
Cu	72,2	97,7	78,3	61,6	89,3	58,4
Fe	50,3	33,9	27,7	111,8	49,0	71,8
Zn	37,9	105,9	92,2	32,1	73,4	85,0
Mn	60,2	55,9	19,1	142,1	57,0	28,0

Por meio dos gráficos de *Box-Plot* (Anexo C) observa-se que para a maioria das amostras, os ensaios macro e micronutrientes apresentaram resultados discrepantes. Esses resultados, considerados “outliers”, promoveram comportamento assimétrico na forma de distribuição dos dados. Como se observa nas figuras do Anexo C, em algumas amostras a tendência da assimetria foi positiva, ou seja, o valor da média foi maior do

que o valor da mediana e para outras amostras é observado tendência negativa para a distribuição dos dados.

A dispersão dos resultados de Ca para as amostras de leguminosas (A2V01 e A3V19) foi maior do que os resultados observados para as outras amostras de volumoso (Figura 4.5). No entanto, houve redução da variabilidade no terceiro ano do experimento (A3).

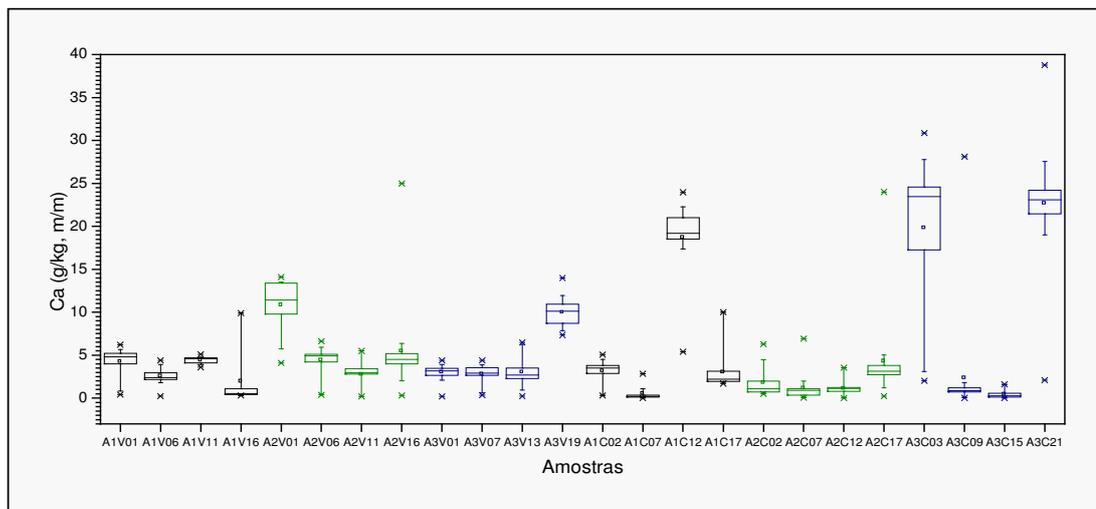


Figura 4.5. Distribuição dos resultados do ensaio cálcio apresentado pelas amostras de volumoso e concentrado.

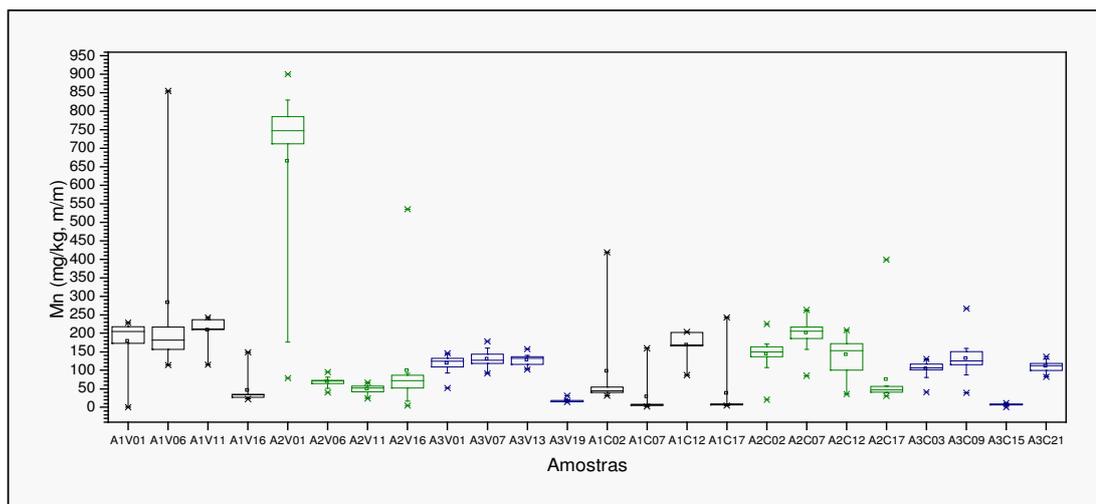


Figura 4.6. Distribuição dos resultados do ensaio manganês para as amostras de volumoso e concentrado.

Menor dispersão dos resultados também foi observada no terceiro ano do experimento para o ensaio Mn (Figura 4.6).

Conforme pode ser observado por meio dos gráficos *Box-Plot* (Anexo C) e pelos coeficientes de variação (Tabela 4.4), a maioria das amostras apresentou valores discrepantes para os ensaios referentes às determinações de Mg, Na, Cu e Zn, resultados considerados “outliers”, que promoveram comportamento assimétrico na distribuição dos dados.

4.3.2 - Avaliação da distribuição dos resultados dos ensaios referentes às amostras de mistura mineral.

Considerando-se o coeficiente de variação como medida de dispersão relativa para as amostras de mistura mineral, observa-se que a variabilidade entre os laboratórios em geral é elevada. Ressalta-se a diminuição do coeficiente de variação médio do ensaio Ca no ano três em relação aos valores dos coeficientes de variação dos dois primeiros anos (Tabela 4.5).

Os maiores coeficientes de variação dentre os macronutrientes foi apresentado pelo Mg (Figura 4.7) (cv médio dos 3 anos = 92,1%). Com relação aos micronutrientes o maior cv foi obtido com o ensaio Mn (cv médio 3 anos = 53,7%).

Tabela 4.5. Coeficiente de variação dos resultados dos ensaios referentes aos macro- e micronutrientes nas amostras de mistura mineral.

Ensaio	Mistura mineral		
	Ano 1	Ano 2	Ano 3
	cv (%)		
Ca	45,4	33,5	20,6
Mg	38,3	125,0	113,2
P	26,2	33,2	18,0
K	65,7	108,8	83,8
Na	17,8	71,6	65,1
Cu	26,69	33,48	61,87
Fe	40,32	36,88	37,05
Zn	17,64	29,45	43,36
Mn	17,93	45,10	98,16

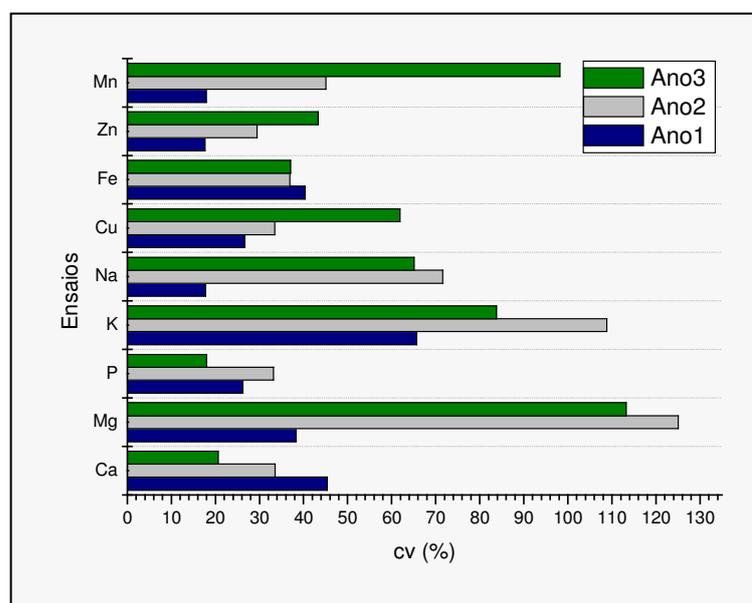


Figura 4.7. Valores dos coeficientes de variação (cv %) dos ensaios macro- e micronutrientes nas amostras de mistura mineral.

Por meio do gráfico de *Box-Plot* (Figura 4.8) é possível visualizar a redução da variabilidade interlaboratorial para o ensaio Ca nas amostras do ano três, quando comparada com as análises das amostras dos dois primeiros anos.

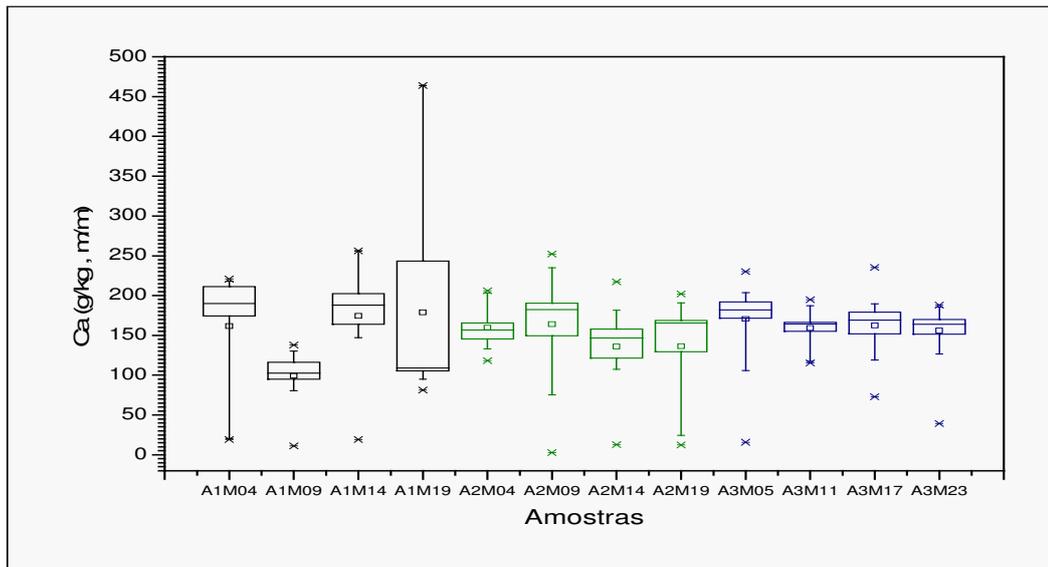


Figura 4.8. Gráfico Box-Plot para o ensaio cálcio (Ca) nas amostras de mistura mineral.

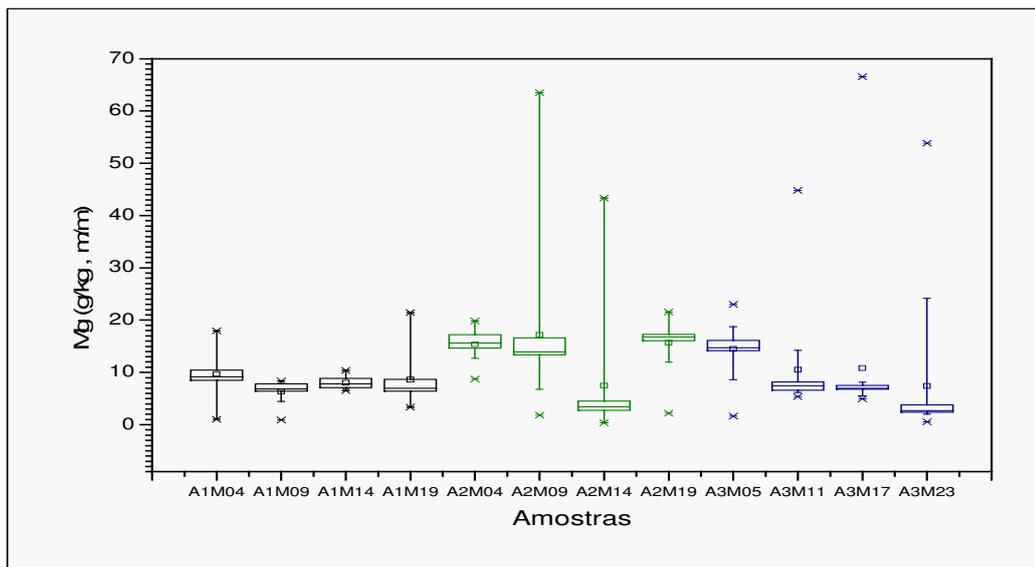


Figura 4.9. Gráfico Box-Plot para o ensaio magnésio (Mg) nas amostras de mistura mineral.

A dispersão dos resultados observados para o Mg pode ser observada visualizando-se a Figura 4.9. É possível avaliar que as amostras do ano um apresentaram coeficientes de variação inferiores às amostras dos anos dois e três. São ainda observados resultados “outliers” para a maioria

das amostras dos anos dois e três, os quais contribuíram para a maior dispersão dos dados.

4.3.3 - Resultados das amostras repetidas

Dentre as amostras encaminhadas para a realização dos ensaios previstos pelo EPLNA, uma amostra de volumoso, uma amostra de concentrado e uma amostra de mistura mineral foram repetidas (conforme descrito no item 3.2). A definição da ocasião para que as amostras fossem repetidas foi feita por meio de sorteio, sendo as amostras escolhidas de forma aleatória.

A repetição de amostras durante o ano visou avaliar a precisão do laboratório na realização dos ensaios previstos. Entre as principais medidas de precisão incluem o desvio padrão da repetitividade, o qual indica a variabilidade observada dentro do laboratório quando o ensaio é realizado em um curto período, pelo mesmo analista e sob condições instrumentais análogas.

4.3.3.1- Amostra de volumoso

Este estudo foi realizado utilizando a amostra de volumoso, feno de *coast cross*, que foi repetida na primeira e na segunda rodadas do terceiro ano (identificadas com o código A3V01 e A3V07). Dentre os ensaios realizados para essas amostras, o extrato etéreo (EE) apresentou elevados valores de coeficiente de variação ($cv_{A3V01} = 26,4\%$ e $cv_{A3V07} = 36,5\%$).

Considerando os resultados dos laboratórios que realizaram o ensaio nas duas rodadas, não foram observadas diferenças significativas entre as

médias das duas amostras quando aplicado teste t para o nível de 95% de confiança.

Na Figura 4.10 são apresentados os resultados médios e os respectivos desvios padrão do ensaio EE. Os laboratórios identificados com os códigos 01, 11, 16, 21, 22, 23 e 34 realizaram esse ensaio com baixa precisão analítica quando considerado o desvio padrão para avaliação da dispersão. Já os laboratórios 03 e 26, apesar de apresentarem precisão satisfatória, apresentaram exatidão inadequada.

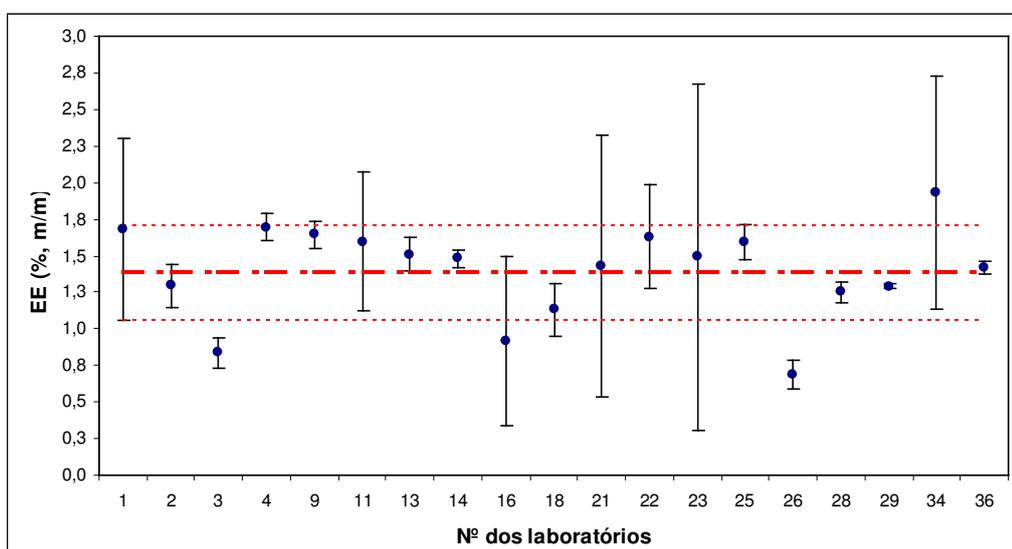


Figura 4.10. Resultados do ensaio extrato etéreo (EE) para mesma amostra de volumoso (A3V01 e A3V07).

É possível identificar laboratórios dispersos e avaliar a precisão do ensaio no diagrama de dispersão apresentado na Figura 4.11. Os resultados da amostra de feno de *coast cross* repetida em duas rodadas (A3V01 e A3V07) são apresentados, sendo que cada laboratório é representado por um ponto e identificado com o seu número código. Na abscissa (X) encontra-se a mediana obtida para a amostra A3V01 e na ordenada (Y) encontra-se a mediana para a amostra A3V07. Conforme pode ser observado, alguns

laboratórios apresentaram resultados afastados do eixo central, indicando elevada dispersão entre os resultados.

Os laboratórios 16, 21, 23 e 24 apresentaram resultados distantes do ponto central e do eixo maior, indicando a presença de erro aleatório na realização desse ensaio. Por outro lado, os laboratórios 3 e 26 apresentaram resultados próximos ao eixo maior, indicando boa precisão, porém com erros sistemáticos em sua rotina analítica, o que resulta em desempenho insatisfatório quanto à exatidão.

Conforme apresentado no Anexo B, a maioria dos laboratórios com resultados dispersos realizaram o ensaio EE empregando a extração por sistema Soxhlet com tempo de extração igual ou inferior a 6 horas (código EE 1, EE 2 ou EE 3). A exceção foi o laboratório 16 que utiliza o extrator Goldfish com 4 horas de extração.

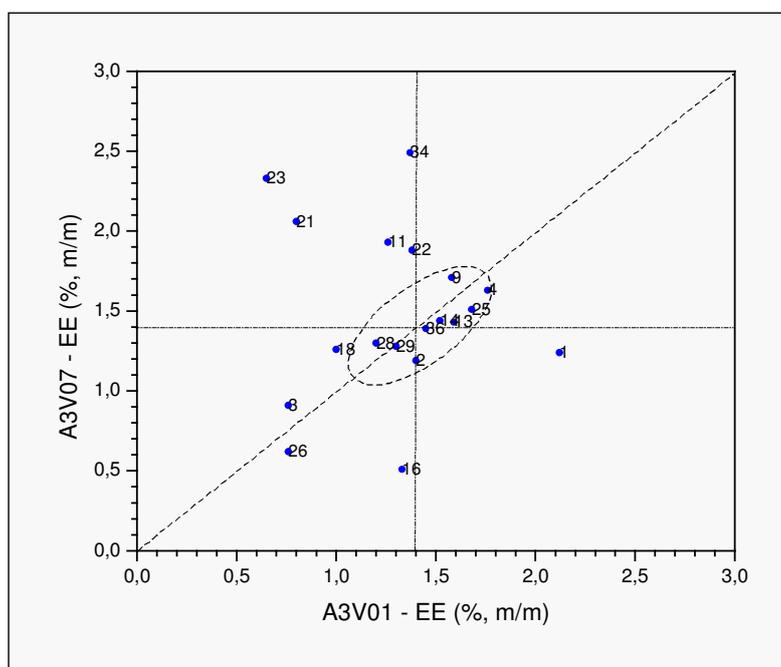


Figura 4.11. Diagrama de dispersão para o ensaio extrato etéreo (EE) da amostra de volumoso repetida, A3V01 e A3V07.

Para os ensaios K e Cu também não foram observadas diferenças significativas ($p = 0,05$) entre as médias dos laboratórios na amostra de volumoso repetida quando aplicado teste t para o nível de 95% de confiança.

Por meio dos gráficos de dispersão (Figura 4.12 e Figura 4.13) observa-se que para o ensaio referente à determinação de potássio os laboratórios 4, 21, 23, 24 e 29 apresentaram resultados dispersos, o mesmo ocorrendo para o ensaio referente à determinação de cobre para os laboratórios 4, 21, 22, 23 e 24.

Foi possível identificar uma possível causa para a ocorrência dessa alta dispersão. A maioria dos laboratórios que apresentaram problemas utiliza a via seca como forma de preparo das amostras (Anexo B). Esse procedimento é utilizado por cerca de 60% dos laboratórios participantes. No entanto, aparentemente é mais suscetível a erros analíticos do que os procedimentos por via úmida. É importante salientar a atenção que deve ser tomado nos procedimentos de preparo das amostras, seja em relação a possíveis perdas por volatilização do analito, em função das altas temperaturas utilizadas, adsorção nas fissuras das paredes dos cadinhos de porcelana ou ainda a contaminação promovida pelo efeito de memória devido à porosidade promovida pelo desgaste da porcelana.

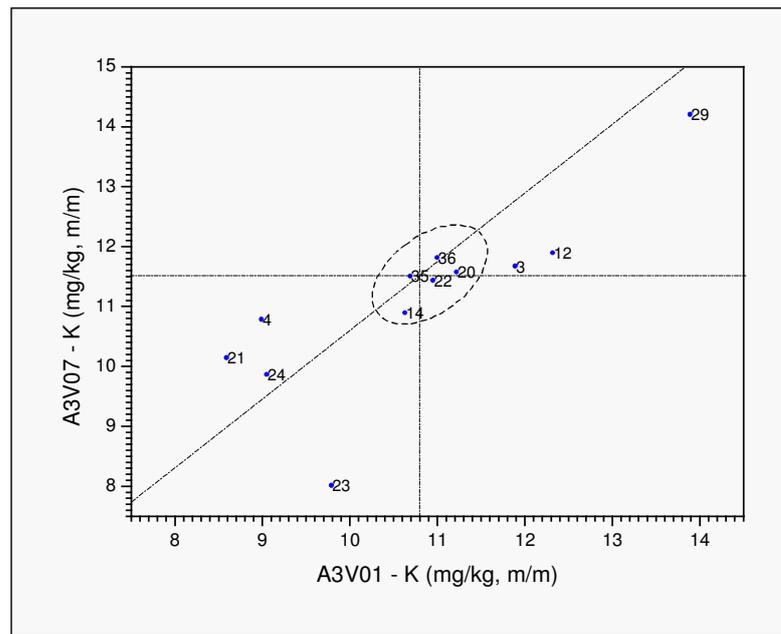


Figura 4.12. Diagrama de dispersão para o ensaio referente à determinação de potássio (K) na amostra de volumoso que foi repetida (A3V01 e A3V07).

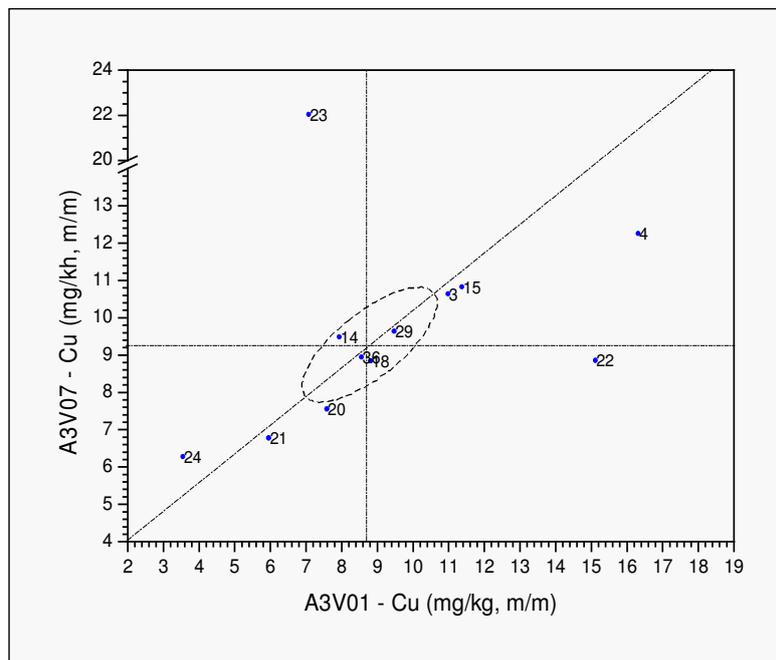


Figura 4.13. Diagrama de dispersão para o ensaio referente à determinação de cobre (Cu) na amostra de volumoso que foi repetida (A3V01 e A3V07).

Ainda considerando os ensaios referentes aos macro- e micronutrientes, deve ser ressaltado que apesar da relativamente baixa

sensibilidade da técnica, a maioria dos analitos quantificados por meio de Análise por Ativação Neutrônica - AAN (SD 6), sem destruição da matéria orgânica, apresentou resultados satisfatórios. Como exemplo no ensaio referente a determinação de manganês, os resultados informados pelo laboratório 12, o qual utilizou o método SD 6, apresentaram-se concordantes com os apresentados por laboratórios que executam procedimentos tradicionais de preparo e determinação (Figura 4.14).

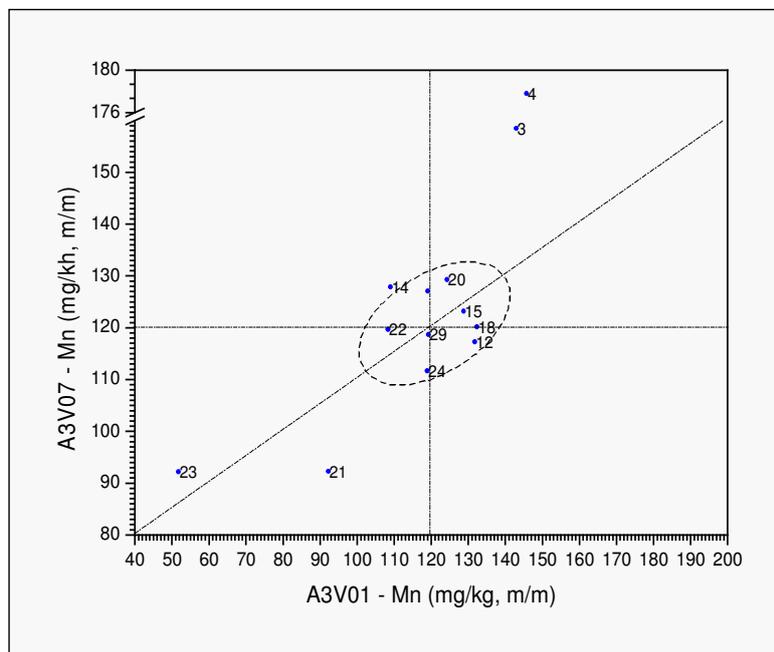


Figura 4.14. Diagrama de dispersão para o ensaio manganês (Mn) na amostra de volumoso que foi repetida (A3V01 e A3V07).

4.3.4- Avaliação dos diferentes procedimentos estatísticos adotados para a definição do valor designado e do intervalo de aceitação.

4.3.4.1 - Testes para exclusão de “outliers”.

Dentre os procedimentos estatísticos existentes para exclusão dos valores considerados “outliers”, os testes de Dixon; de Grubbs e de Hampel foram avaliados.

A avaliação foi realizada em quatro amostras de volumoso, uma amostra de concentrado e uma amostra de mistura mineral, correspondentes ao terceiro ano do EPLNA: A3V01 (N=357), A3V07 (N=342), A3V13 (N=358), A3V19 (N=352), A3C03 (N=345) e A3M05 (N=131). Todos os ensaios previstos no programa foram considerados, somando um total de 1885 determinações.

Conforme é observado na Figura 4.15, o teste de Hampel demonstrou algumas vantagens em relação aos testes de Dixon e Grubbs. Foi o procedimento que detectou um maior número de resultados “outliers”, excluindo um total de 144 resultados para as amostras avaliadas. Ainda, em termos operacionais, o teste de Hampel também proporcionou vantagens, uma vez que não depende de valores tabelados para ser utilizado, sendo aplicado em uma única etapa, o que o torna mais simples e menos trabalhoso em relação aos demais métodos avaliados.

Salienta-se que em termos operacionais, o teste de Dixon, necessita de valores tabelados para ser aplicado que por sua vez dependem do tamanho das amostras. Apresenta ainda certas limitações, pois avalia apenas o menor ou o maior valor presente na amostra e na maioria das vezes necessita que vários passos sejam executados a fim de se detectar todos “outliers”.

O teste de Grubbs, da mesma forma como o teste de Dixon, apresenta as mesmas dificuldades de aplicação quanto ao uso de valores tabelados e de várias etapas. No entanto, é menos trabalhoso para ser executado, sendo que para a aplicação neste trabalho foi empregado um

programa estatístico disponibilizado na internet no endereço <http://www.graphpad.com/>.

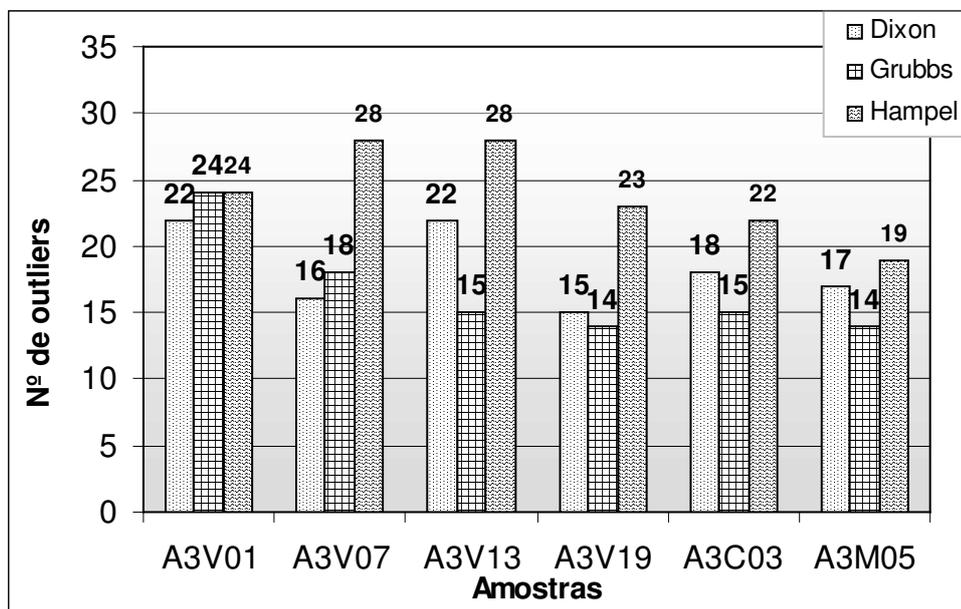


Figura 4.15. Número de resultados “outliers” detectado em amostras de volumosos, concentrado e mistura mineral do terceiro ano do EPLNA.

4.3.4.2 - Avaliação do intervalo de aceitação.

O intervalo de aceitação foi avaliado para a amostra de volumoso “feno de *coast cross*” (A3V01) (Tabela 4.6) e para a amostra de concentrado “ração para vacas secas” (A3C03) (Tabela 4.7). Para os métodos estatísticos A, B e C os valores de \bar{X} e σ_p , representam a média aritmética calculada após a exclusão de “outliers” pelos testes de Dixon, de Grubbs e de Hampel, respectivamente; para o método D os valores de \bar{X} e σ_p foram calculados a partir dos resultados que ficaram dentro do intervalo de $M \pm 1s$; e para os métodos E e F, para os valores de \bar{X} foi considerada a mediana, e os valores σ_p foram calculados a partir do intervalo interquartilico normalizado (IQN), para E, e por meio da equação de Horwitz, para F (THOMPSON et al, 2006).

Observa-se que em geral, os valores obtidos para a variável \bar{X} (valor designado) obtida pelo diferentes métodos, não apresentaram diferenças significativas. Entretanto, os valores alvo para o desvio padrão (σ_p) apresentaram diferenças dependendo do método utilizado. Para a maioria das análises, o método estatístico F foi o mais restritivo, proporcionando os menores intervalos de aceitação. LINSINGER et al (1998) comparando diferentes procedimentos estatísticos para exclusão de “outliers”, verificaram que o valor da média não é muito afetado dependendo do método estatístico para detecção de “outliers”, ao contrário do desvio padrão, que define o intervalo de confiança.

Tabela 4.6. Valores dos parâmetros obtidos com os diferentes procedimentos estatísticos para a amostra de volumoso “feno de coast cross” (A3V01).

Ensaio	Parâmetros	Todos dados	Métodos Estatísticos					
			A	B	C	D	E	F
MS	\bar{X}	90,94	91,04	91,04	91,11	90,97	91,00	91,00
	σ_p	0,94	0,77	0,77	0,67	0,46	0,51	0,95
DIVMS	\bar{X}	59,40	59,40	59,40	59,40	58,40	58,25	58,25
	σ_p	2,74	2,74	2,74	2,74	0,85	3,36	0,76
FDA	\bar{X}	38,94	38,08	38,08	38,08	38,08	38,33	38,33
	σ_p	3,92	1,23	1,23	1,23	1,23	1,27	0,62
FDN	\bar{X}	78,76	78,27	78,27	78,27	78,82	78,61	78,61
	σ_p	3,41	2,56	2,56	2,56	1,58	2,48	0,89
PB	\bar{X}	8,85	8,71	8,66	8,66	8,72	8,73	8,73
	σ_p	0,87	0,48	0,41	0,41	0,37	0,47	0,25
EE	\bar{X}	1,32	1,32	1,32	1,32	1,38	1,37	1,37
	σ_p	0,36	0,36	0,36	0,36	0,20	0,28	0,05
LIG	\bar{X}	7,62	5,25	5,25	5,25	5,80	5,09	5,09
	σ_p	8,06	0,80	0,80	0,80	2,41	1,09	0,16
Cinzas	\bar{X}	4,53	4,48	4,48	4,48	4,57	4,56	4,56
	σ_p	0,37	0,28	0,28	0,28	0,17	0,34	0,15
Ca	\bar{X}	2,98	3,14	3,14	3,14	3,01	3,15	3,15
	σ_p	0,90	0,58	0,58	0,58	0,47	0,60	0,15
Mg	\bar{X}	2,62	2,78	2,78	2,78	2,73	2,74	2,74
	σ_p	0,74	0,39	0,39	0,39	0,35	0,25	0,13

Tabela 4.6. Continuação.

P	\bar{X}	1,67	1,55	1,58	1,55	1,59	1,60	1,60
	σ_p	0,82	0,16	0,11	0,16	0,22	0,14	0,08
K	\bar{X}	11,12	11,12	11,12	11,12	11,16	10,99	10,99
	σ_p	1,77	1,77	1,77	1,77	0,78	1,56	0,43
Na	\bar{X}	0,53	0,53	0,53	0,53	0,54	0,34	0,34
	σ_p	0,43	0,43	0,43	0,43	0,35	0,48	0,02
Cu	\bar{X}	9,41	9,41	9,41	9,41	8,73	8,84	8,84
	σ_p	3,48	3,48	3,48	3,48	1,68	2,52	1,02
Fe	\bar{X}	290,30	303,92	303,92	294,55	294,55	297,35	297,35
	σ_p	67,67	46,33	46,33	33,12	33,12	29,79	20,19
Zn	\bar{X}	36,77	25,11	25,11	25,11	25,11	22,62	22,62
	σ_p	45,92	8,64	8,64	8,64	8,64	10,64	2,26
Mn	\bar{X}	118,20	123,29	123,29	123,29	122,11	122,00	122,00
	σ_p	23,61	14,52	14,52	14,52	8,55	16,93	9,47

Tabela 4.7. Valores dos parâmetros obtidos com os diferentes procedimentos estatísticos para a amostra de concentrado “ração para vacas secas” (A3V03).

Ensaio	Parâmetros	Todos dados	Métodos Estatísticos					
			A	B	C	D	E	F
MS	\bar{X}	94,79	94,79	94,79	94,88	94,94	94,90	94,90
	σ_p	1,03	1,03	1,03	0,91	0,54	0,76	0,97
DIVMS	\bar{X}	85,16	85,16	85,16	85,16	84,83	84,55	84,55
	σ_p	5,00	5,00	5,00	5,00	3,44	6,20	0,92
FDA	\bar{X}	6,48	4,33	4,15	4,15	4,33	4,05	4,05
	σ_p	7,55	1,08	0,76	0,76	1,08	1,10	0,13
FDN	\bar{X}	12,66	9,63	9,63	9,63	10,24	9,84	9,84
	σ_p	8,44	2,00	2,00	2,00	3,24	2,16	0,28
PB	\bar{X}	24,88	24,70	24,70	24,70	24,58	24,51	24,51
	σ_p	1,62	1,31	1,31	1,31	0,77	1,27	0,50
EE	\bar{X}	10,58	11,27	11,34	11,34	11,34	11,24	11,24
	σ_p	2,68	0,57	0,67	0,67	0,67	0,41	0,31
LIG	\bar{X}	1,32	0,86	1,32	0,86	0,86	0,76	0,76
	σ_p	1,31	0,54	1,31	0,54	0,54	0,74	0,03
Cinzas	\bar{X}	10,50	10,50	10,50	10,50	10,57	10,60	10,60
	σ_p	0,38	0,38	0,38	0,38	0,22	0,41	0,30
Ca	\bar{X}	19,79	19,79	19,79	19,79	22,39	23,33	23,33
	σ_p	8,16	8,16	8,16	8,16	3,42	5,44	0,82
Mg	\bar{X}	3,25	2,25	2,25	2,25	2,11	2,29	2,29
	σ_p	4,59	0,32	0,32	0,32	0,61	0,30	0,11
P	\bar{X}	11,97	13,52	11,97	13,52	13,24	13,29	13,29
	σ_p	4,45	1,49	4,45	1,49	1,08	1,50	0,51
K	\bar{X}	9,04	9,04	9,04	9,04	8,81	9,14	9,14
	σ_p	1,76	1,76	1,76	1,76	1,09	1,42	0,37
Na	\bar{X}	6,54	6,54	6,54	6,54	6,14	6,32	6,32
	σ_p	1,55	1,55	1,55	1,55	0,90	1,78	0,27
Cu	\bar{X}	28,74	28,74	28,74	28,74	28,53	28,51	28,51
	σ_p	5,22	5,22	5,22	5,22	2,95	4,43	2,75

Tabela 4.7. Continuação.

Fe	\bar{X}	1035,83	1035,83	1035,83	884,07	923,26	912,94	912,94
	σ_p	430,17	430,17	430,17	206,84	163,68	204,92	52,35
Zn	\bar{X}	56,92	44,20	44,20	44,20	44,20	42,55	42,55
	σ_p	50,29	10,48	10,48	10,48	10,48	12,36	3,87
Mn	\bar{X}	103,51	108,31	108,31	108,31	106,79	105,25	105,25
	σ_p	22,50	14,06	14,06	14,06	8,77	11,49	8,35

Tomando como base nos valores dos índices z calculados a partir dos valores designados e dos valores alvo para o desvio padrão determinado pelos diferentes métodos estatísticos, pode-se observar no ensaio MS da amostra “feno de *coast cross*” (A3V01), que os métodos estatísticos D e E foram os mais rigorosos (Figura 4.16). Ainda neste exemplo, os valores dos índices z obtidos por meio dos métodos A, B, C e F apresentaram valores similares quanto ao desempenho (resultado dentro do intervalo $|z| \leq 2$ é considerado satisfatório; dentro do intervalo $2 < |z| < 3$ é considerado resultado questionável; e resultado acima do intervalo $|z| \geq 3$ é considerado insatisfatório).

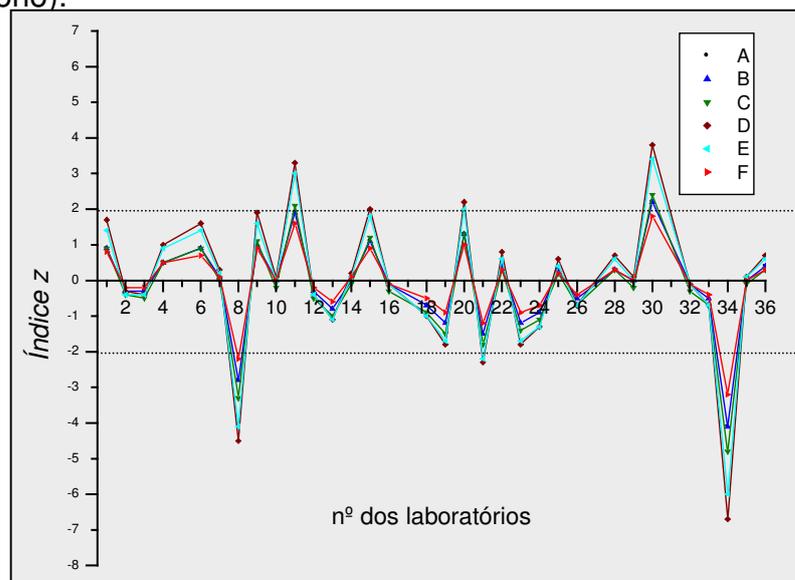


Figura 4.16. Comparação dos índices z calculados por meio dos métodos A, B, C, D, E e F, para MS para a amostra “feno de *coast cross*” (A3V01).

No caso do ensaio FDN, cuja dispersão dos dados foi maior do que para o ensaio MS, observa-se que os métodos D e F foram os mais restritivos, quando comparados os valores dos índices z dos métodos A, B, C e E (Figura 4.17).

Os valores dos índices z calculados por meio dos métodos A, B, C e E não apresentaram diferenças significativas entre si, sugerindo que o emprego de qualquer um dos modelos forneça conceitos equivalentes quanto ao desempenho.

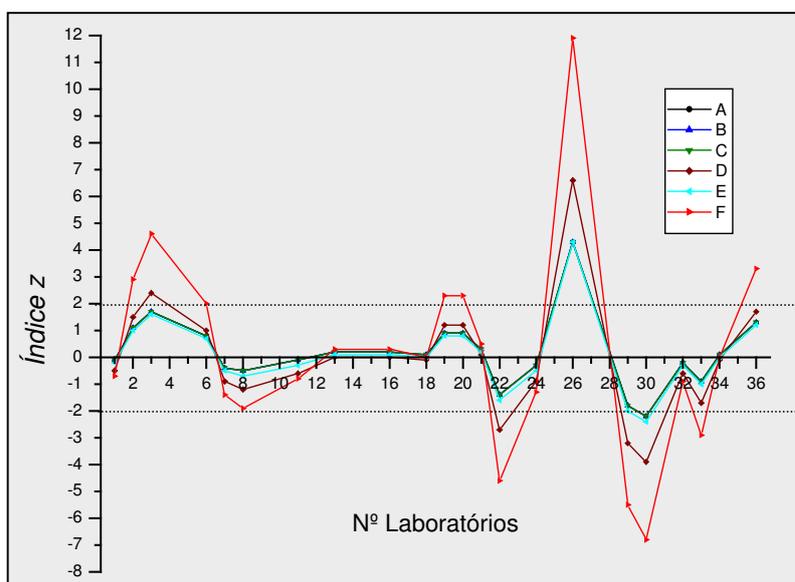


Figura 4.17. Comparação dos índices z calculados por meio dos métodos A, B, C, D, E e F, para FDN na amostra “feno de *coast cross*” (A3V01).

Na Tabela 4.8 são apresentados os ensaios com índice $z > 2$, indicando desempenho questionável ou insatisfatório para os ensaios das amostras “feno de *coast cross*” (A3V01) e “ração para vacas secas” (A3C03). São informados o número de determinações realizadas (N) e o número de resultados que apresentaram valor de índice z maior do que dois. O índice de desempenho (ID) foi calculado considerando a porcentagem de

dados com desempenho satisfatório em relação ao total de ensaios realizados.

Neste estudo, observa-se que entre os métodos clássicos (A, B e C) não houve diferença significativa nos valores dos ID's dos laboratórios. Dentre os métodos que empregam estatística robusta (E e F), conforme apresentado anteriormente, o método F foi mais rigoroso, fornecendo ID inferior ao calculado pelo o método E.

Tabela 4.8. Informações sobre o número de ensaios com índice $z > 2$ em relação ao total de ensaios realizados nas amostras “feno de *coast cross*” (A3V01) e “ração para vacas secas” (A3C03).

Ensaio	Amostra A3V01							Amostra A3C03						
	Métodos estatísticos							Métodos estatísticos						
	N	A	B	C	D	E	F	N	A	B	C	D	E	F
MS	32	3	3	4	6	5	2	32	2	2	2	6	4	2
DIVMS	7	0	0	0	3	0	3	6	0	0	0	0	0	4
FDA	23	4	4	4	4	4	8	21	3	3	3	3	3	16
FDN	22	2	2	2	5	1	10	20	3	3	3	3	3	15
PB	30	2	2	2	4	2	8	30	3	3	3	5	5	11
EE	23	1	1	1	5	3	15	24	4	4	4	4	6	6
LIG	18	3	3	3	2	2	9	15	2	2	2	2	2	13
CIN	30	1	1	1	8	1	10	30	1	1	1	7	2	4
Ca	18	2	2	2	2	2	10	18	1	1	1	3	3	11
Mg	16	1	1	1	2	5	6	16	2	2	2	2	2	8
P	17	4	4	4	4	4	6	16	3	2	3	3	3	8
K	14	0	0	0	5	1	7	14	0	0	0	2	2	9
Na	12	0	0	0	1	1	12	12	0	0	0	2	0	9
Cu	13	0	0	0	3	3	6	13	2	2	2	4	2	4
Fé	14	2	2	2	2	3	4	14	2	2	4	4	3	8
Zn	15	1	1	1	1	1	10	15	2	2	2	2	1	6
Mn	14	2	2	2	4	1	4	14	1	1	1	4	3	5
Soma total	318	28	28	29	61	39	130	310	31	30	33	59,4	44	139
ID (%)		91,2	91,2	90,9	80,8	87,7	59,1		90,9	91,2	90,4	82,6	87,1	59,4

ID: Índice de desempenho.



4.3.5 - Avaliação do desempenho dos laboratórios

A seguir são apresentados os valores médios dos índices de desempenho (ID) dos laboratórios participantes do Ensaio de Proficiência. O

calculado do ID foi realizado com base nos valores do índice z , sendo considerados os seguintes critérios:

- O resultado que estivesse dentro do intervalo $|z| \leq 2$ foi considerado **satisfatório** e, portanto não recebeu asterisco; o resultado que estivesse no intervalo $2 < |z| < 3$ foi considerado resultado **questionável** e recebeu um asterisco (*); e o resultado que estivesse acima do intervalo $|z| \geq 3$ foi considerado **insatisfatório** e recebeu dois asteriscos (**).
- Para o cálculo do ID dos laboratórios, foi considerado o número de ensaios com desempenho satisfatório e o número de ensaios com asteriscos. Foi designado peso dois (2) para os resultados com dois asteriscos (**), e peso um (1) para os dados com um asterisco (*).

No gráfico de *Box-Plot* (Figura 4.18), as amostras de volumosos estão identificadas pelos códigos, A1V, A2V e A3V; as amostras de concentrado identificadas pelos códigos A1C, A2C e A3C; e as amostras de mistura mineral pelos códigos, A1MM, A2MM e A3MM.

Como é possível observar entre os três tipos de amostra, a mistura mineral apresentou maior variabilidade quanto ao desempenho. No entanto, por meio do gráfico *Box-Plot* é possível visualizar a melhora no desempenho dos laboratórios no terceiro ano do EPLNA (A3MM).

Outra informação pode ser obtida com relação aos valores da mediana dos ID's, cujos valores são sempre superiores à média geral (76,9%) dos ID's, identificados pelo traço vermelho no gráfico. Essa

avaliação indica uma tendência aos laboratórios obterem ID's mais elevados no decorrer dos anos.

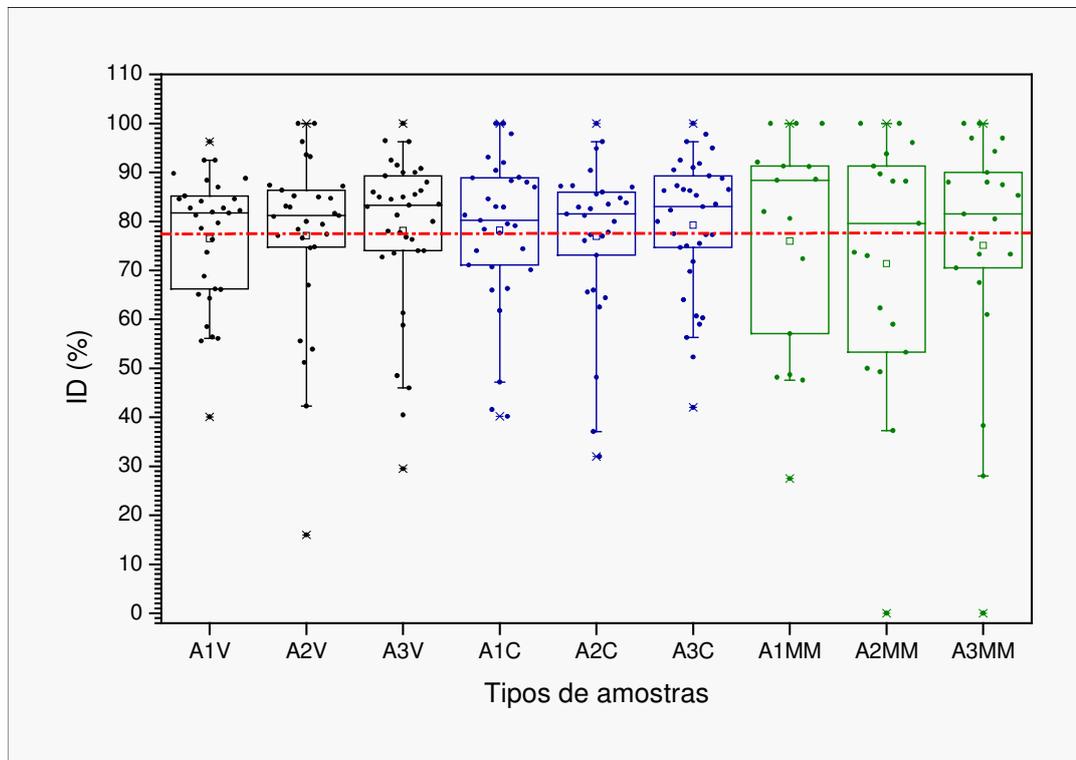


Figura 4.18. Gráfico de Box-Plot com os índices de desempenho obtidos por ano para as amostras de volumoso, concentrado e mistura mineral.

Na Tabela 4.9 são apresentados os ID's obtidos pelos laboratórios, considerando-se o valor médio de todas as amostras e ensaios realizados em cada ano (Ano 1, Ano2 e Ano3). Pode-se observar um agrupamento entre o tipo de atividade (categoria) dos laboratórios, sendo esses identificados apenas pelo número código.

Numa avaliação pontual, é observado aumento no valor do ID para alguns laboratórios (U.E.: 2, 5, 13, 22 e 32; I.E.S.: 1, 11, 25 e 40; I.P.E.: 9, 14 e 28; E.I.P.: 15 e 36), indicando que esses laboratórios apresentaram um melhor desempenho com base nos critérios do Índice z.

Tabela 4.9. Valores dos índices de desempenho médios obtidos nos três anos de EPLNA.

Unidades da Embrapa (U.E.)				Instituições de Ensino Superior (I.E.S.)			
Nº dos Laboratórios	ANO 1	ANO 2	ANO 3	Nº dos Laboratórios	ANO 1	ANO 2	ANO 3
2	79,7	81,5	86,1	1	82,8	82,8	85,2
5	73,8	79,4	82,5	6	-	-	52,6
7	88,6	78,5	85,3	8	79,9	65,7	76,2
13	82,8	85,6	90,9	11	87,1	75,1	86,2
19	92,6	98,2	88,8	12	-	95,3	94,2
22	86,0	75,9	87,3	21	70,2	72,7	67,2
24	89,4	88,6	83,8	25	59,1	71,4	75,4
26	65,7	50,8	44,0	30	80,5	87,1	77,7
27	40,2	24,0	38,8	31	90,0	87,3	
29	87,5	89,3	84,8	34	77,7	59,6	69,0
32	92,0	83,6	93,7	39	90,2	-	-
33	93,8	87,3	91,5	40	61,2	84,1	-
37	51,3	-	-	42	66,1	-	-
41	86,9	85,0	-	-	-	-	-
44	62,9	-	-	-	-	-	-
M	78,2	77,5	79,8	M	76,8	78,1	75,9
Instituições de Pesquisa Estaduais (I.P.E.)				Empresas da Iniciativa Privada (E.I.P.)			
Nº LAB	ANO 1	ANO 2	ANO 3	Nº LAB	ANO 1	ANO 2	ANO 3
9	85,1	42,3	87,3	3	-	-	85,8
14	48,4	68,6	60,0	4	-	-	73,9
16	-	-	78,4	10	-	-	62,5
18	91,4	94,0	90,9	15	-	75,8	86,0
28	54,9	57,3	67,3	20	-	87,2	77,3
43	82,7	-	-	23	-	-	69,6
-	-	-	-	35	-	-	94,3
-	-	-	-	36	-	82,4	89,0
-	-	-	-	38	-	-	84,2
M	72,5	65,5	76,8	M	-	81,8	80,3

Em outra avaliação, considerando a média dos ID's obtidos entre os laboratórios dentro de cada categoria, observa-se valores médios relativamente próximos, porém com uma leve tendência e melhor desempenho dos laboratórios de Empresas da Iniciativa Privada ($ID_{E.I.P.} = 80,7\%$) e menor desempenho foi para as Instituições de Pesquisa Estaduais ($ID_{I.P.E.} = 72,0$) (Figura 4.19).

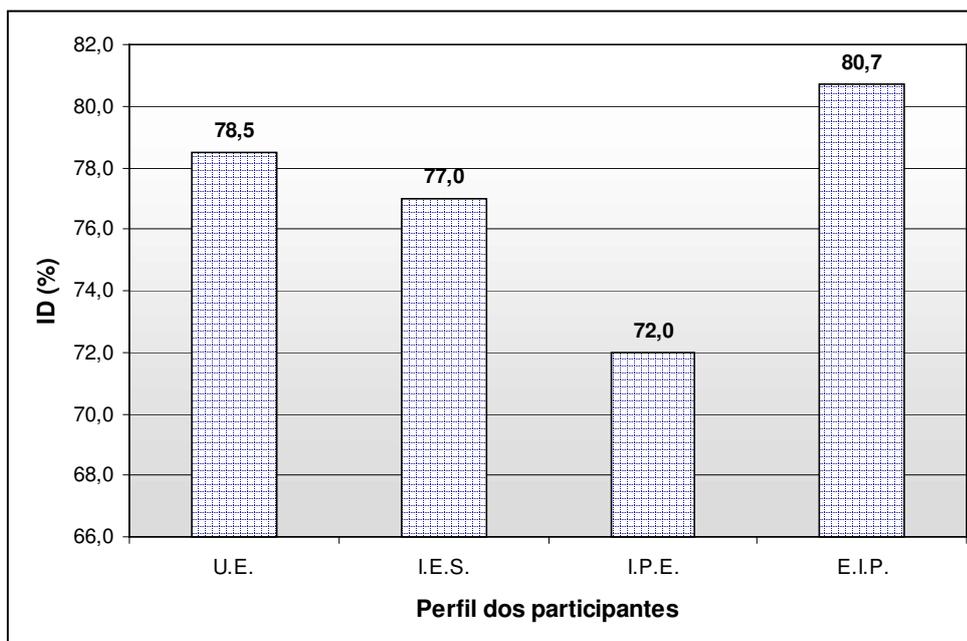


Figura 4.19. Índice de desempenho médio por categoria dos participantes. UE – Unidades da Embrapa, IES – Instituições de ensino superior; IPE – Instituições de pesquisa estaduais; EIP – Empresas da iniciativa privada.

4.3.6 - Resultados das amostras referência

A seguir são apresentados os resultados das amostras referência de volumoso (A3ARV – *Capim Estrela Roxa*), concentrado (A3ARC – *Farelo de Soja*) e mistura mineral (A3ARM – *mistura mineral para vacas em lactação*). Essas amostras foram repetidas nas quatro rodadas e analisadas pelos laboratórios durante o terceiro ano (A3).

A avaliação estatística dos resultados foi realizada empregando o Software GraphPad Inc., disponibilizado via Internet no endereço www.graphpad.com. A primeira etapa consistiu em excluir os resultados dispersos (“outliers”) empregando o teste de Grubbs. Esse teste verifica se o resultado é considerado “outlier”, por meio da diferença entre o resultado suspeito e a média dos laboratórios relacionada com o desvio padrão do mesmo conjunto de dados. Se o valor resultante dessa relação for maior do que o valor crítico (tabelado), o resultado é considerado “outlier”.

Após a exclusão dos “outliers”, o valor da média (**M**), o desvio padrão (**s**), a mediana (**MED**), o coeficiente de variação (**cv%**), o número de dados (**N**) e o intervalo de confiança da média (**IC**) para os níveis de confiança de 90%, 95% e 99% foram determinados para cada ensaio. O **IC** é uma avaliação estatística que associa a variabilidade dos resultados (**s**) e o tamanho da população (**N**), sendo obtido por meio do erro padrão da média. É definido como o intervalo onde pode ser encontrado com certo nível de confiança o valor verdadeiro. As amostras foram distribuídas para os laboratórios participantes, com o objetivo de uso como amostra padrão nas atividades de rotinas dos mesmos, ficando a critério de cada participante definir qual o **IC** apropriado. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 4.10, 4.11 e 4.12.

Tabelas 4.10. Resultado estatístico da amostra referencia de volumoso: A3ARV - *Capim Estrela Roxa*.

		Ensaio							
		MS	PB	DIVMS	FDA	FDN	Cinzas	EE	Lignina
		% (m/m)							
M		92,20	18,69	64,19	34,47	70,14	9,11	1,88	4,29
S		1,30	1,19	3,24	1,66	4,15	0,44	0,52	1,23
N		121	112	22	84	87	110	89	60
Méd		92,24	18,69	63,39	34,32	69,85	9,10	1,83	4,11
cv %		1,41	6,37	5,05	4,82	5,92	4,83	27,66	28,67
IC_{90%}	Min	92,01	18,50	63,00	34,16	69,40	9,04	1,79	4,03
	Max	92,40	18,88	65,38	34,77	70,88	9,18	1,97	4,56
IC_{95%}	Min	91,97	18,47	62,75	34,11	69,25	9,03	1,78	3,98
	Max	92,44	18,91	65,63	34,83	71,02	9,19	1,99	4,61
IC_{99%}	Min	91,90	18,40	62,23	33,99	68,96	9,00	1,74	3,87
	Max	92,51	18,99	66,15	34,94	71,31	9,22	2,03	4,72

Tabelas 4.10. Continuação.

		Ensaio								
		Ca	Mg	P	K	Na	Cu	Fe	Zn	Mn
		g/kg (m/m)				mg/kg (m/m)				
M		5,27	2,82	4,19	27,89	0,54	9,55	126,79	45,60	99,08
s		0,99	0,36	0,40	3,97	0,50	3,00	22,75	12,52	12,98
N		73	62	65	53	48	55	50	58	60
Med		5,29	2,80	4,22	28,34	0,34	8,59	123,76	43,74	100,50
cv %		18,79	12,77	9,55	14,23	92,59	31,41	17,94	27,46	13,10
IC_{90%}	Min	5,08	2,75	4,11	26,98	0,42	8,88	121,39	42,85	96,28
	Max	5,46	2,90	4,27	28,80	0,66	10,23	132,18	48,35	101,88
IC_{95%}	Min	5,04	2,73	4,09	26,80	0,40	8,74	120,32	42,31	95,73
	Max	5,50	2,91	4,29	28,98	0,69	10,36	133,26	48,89	102,44
IC_{99%}	Min	4,96	2,70	4,06	26,43	0,35	8,47	118,17	41,22	94,62
	Max	5,57	2,94	4,32	29,35	0,73	10,63	135,41	49,98	103,54

M = média; **s** = desvio padrão; **Med** = mediana; **cv(%)** = coeficiente de variação; **N** = n^o de determinações; **IC** = intervalo de confiança da média; **min** e **max** = limites inferior e superior para o **IC**.

Tabelas 4.11. Resultado estatístico da amostra referencia de concentrado: A3ARC - Farelo de Soja.

		Ensaio							
		MS	PB	DIVMS	FDA	FDN	Cinzas	EE	Lignina
		% (m/m)							
M		90,32	51,45	89,48	10,35	17,66	6,24	1,32	0,95
S		0,95	2,80	3,48	1,73	4,97	0,40	0,41	0,66
N		119	111	22	77	70	106	84	51
Méd		90,17	51,61	88,40	10,33	16,67	6,22	1,29	0,69
cv %		1,05	5,43	3,94	16,75	29,81	6,43	31,78	95,65
IC_{90%}	Min	90,17	51,00	88,21	10,03	16,67	6,18	1,24	0,79
	Max	90,46	51,89	90,76	10,68	18,65	6,30	1,39	1,10
IC_{95%}	Min	90,17	51,00	88,21	10,03	16,67	6,18	1,23	0,76
	Max	90,46	51,89	90,76	10,68	18,65	6,30	1,41	1,13
IC_{99%}	Min	90,15	50,92	87,94	9,96	16,47	6,16	1,20	0,70
	Max	90,49	51,97	91,02	10,75	18,84	6,32	1,44	1,19

		Ensaio								
		Ca	Mg	P	K	Na	Cu	Fe	Zn	Mn
		g/kg (m/m)				mg/kg (m/m)				
M		2,87	2,86	5,58	22,02	0,90	16,99	214,03	50,62	35,45
s		0,86	0,36	0,71	3,41	0,56	4,26	43,24	7,68	7,65
N		73	62	64	53	47	55	50	50	60
Med		2,83	2,92	5,70	21,85	0,63	16,50	207,28	49,73	35,59
cv %		30,39	12,33	12,46	15,61	88,89	25,82	20,86	15,44	21,49
IC_{90%}	Min	2,70	2,78	5,43	21,24	0,77	16,02	203,78	48,80	33,80
	Max	3,04	2,94	5,73	22,80	1,04	17,95	224,28	52,44	37,10
IC_{95%}	Min	2,67	2,77	5,40	21,08	0,74	15,83	201,74	48,44	33,47
	Max	3,07	2,95	5,76	22,96	1,07	18,14	226,32	52,80	37,42
IC_{99%}	Min	2,60	2,74	5,34	20,77	0,69	15,45	197,63	47,71	32,82
	Max	3,14	2,98	5,81	23,27	1,12	18,52	230,42	53,53	38,07

Tabelas 4.12. Resultado estatístico da amostra referencia de mistura mineral: **ARM** – *mistura mineral para vacas em lactação*.

		Ensaio								
		Ca	Mg	P	K	Na	Cu	Fe	Zn	Mn
		g/kg (m/m)					mg/kg (m/m)			
M		145,77	6,84	64,43	0,99	141,34	1323,33	1430,87	3949,83	898,63
S		21,10	0,83	3,55	0,27	40,95	189,37	339,55	1292,36	211,82
N		70	52	59	40	51	55	53	60	62
Méd		146,83	6,83	64,34	1,00	149,32	1291,00	1426,00	4110,00	865,74
cv %		14,37	12,15	5,52	27,00	27,42	14,67	23,81	31,44	24,47
IC_{90%}	Min	141,56	6,65	63,66	0,91	131,73	1280,70	1352,76	3671,02	853,70
	Max	149,97	7,03	65,20	1,06	150,95	1366,16	1508,98	4228,64	943,56
IC_{95%}	Min	140,74	6,61	63,51	0,90	129,82	1272,24	1337,28	3615,98	844,84
	Max	150,80	7,07	65,36	1,07	152,86	1374,62	1524,46	4283,74	952,42
IC_{99%}	Min	139,09	6,53	63,20	0,87	125,99	1255,25	1306,17	3505,74	827,10
	Max	152,45	7,14	65,66	1,10	156,70	1391,61	1555,58	4393,93	970,16

M = média; **s** = desvio padrão; **Med** = mediana; **cv(%)** = coeficiente de variação; **N** = n^o de determinações; **IC** = intervalo de confiança da média; **min** e **max** = limite inferior e superior para o **IC**.

Capítulo 5



Conclusões

5 – Conclusões

O Ensaio de Proficiência para Laboratório de Nutrição Animal (EPLNA), possibilitou esboçar um perfil dos laboratórios de instituições e empresas que realizam análises químicas de alimentos fornecidos para animais. Por meio de levantamento realizado sobre os métodos empregados, observou-se que em geral os laboratórios utilizam métodos distintos para um mesmo ensaio. Um dos objetivos do programa é identificar problemas analíticos relacionados às metodologias. Dessa forma, por meio dos coeficientes de variação, concluiu-se que os ensaios que mostraram maior dispersão interlaboratorial foram EE, Lignina e Na para as amostras de volumosos e de concentrado. Dentre estes, o extrato etéreo apresentou elevada variabilidade dos resultados entre os laboratórios ($cv = 47,2\%$), observou-se que este efeito, provavelmente ocorre devido ao emprego de diferentes procedimentos analíticos para realizar esse ensaio.

Ainda, observaram-se por meio das amostras que foram repetidas durante o ano, alguns laboratórios que realizam o preparo de amostras por via seca para análises dos macro e micronutrientes, apresentaram resultados analíticos dispersos.

Dentre os testes utilizados para exclusão de “outliers”, Hampel foi o teste que detectou maior quantidade de resultados discrepantes, apresentando a vantagem de ser simples à aplicação, não necessitando de uso de valores tabelados. Observou-se que em geral, os valores obtidos para valor designado, calculado pelos diferentes métodos, não apresentaram diferenças significativas. No entanto, para o intervalo de confiança o método baseado na equação de Horwitz foi o mais restritivo.

O projeto estatístico empregado foi eficaz e de fácil aplicação, sendo possível por meio do Índice z, detectar diferenças significativas no desempenho entre os laboratórios. O uso do desvio-padrão (s) para definir a dispersão dos dados experimentais e o coeficiente de variação (cv) conhecido como desvio padrão relativo (RSD) expresso em porcentagem estão relacionados à precisão das determinações em questão. Assim, foi possível identificar o nível de desempenho dos laboratórios, sendo observado que dentre os participantes, os laboratórios representantes da iniciativa privada foram os que obtiveram o maior índice de desempenho satisfatório (ID = 80,7%)..

O EPLNA possibilitou avaliar o desempenho histórico dos laboratórios participantes, tornando-se uma ferramenta de controle da qualidade por monitoramento externo, além da possibilidade de verificar continuamente a existência de erros sistemáticos (tendências) em suas atividade de rotina. O EPLNA tornou-se imprescindível na produção e validação de materiais de referência não certificados (amostras referência de volumosos), viabilizando o uso desse tipo de matriz no controle interno de qualidade dos laboratórios de nutrição animal participantes do programa.

Capítulo 6

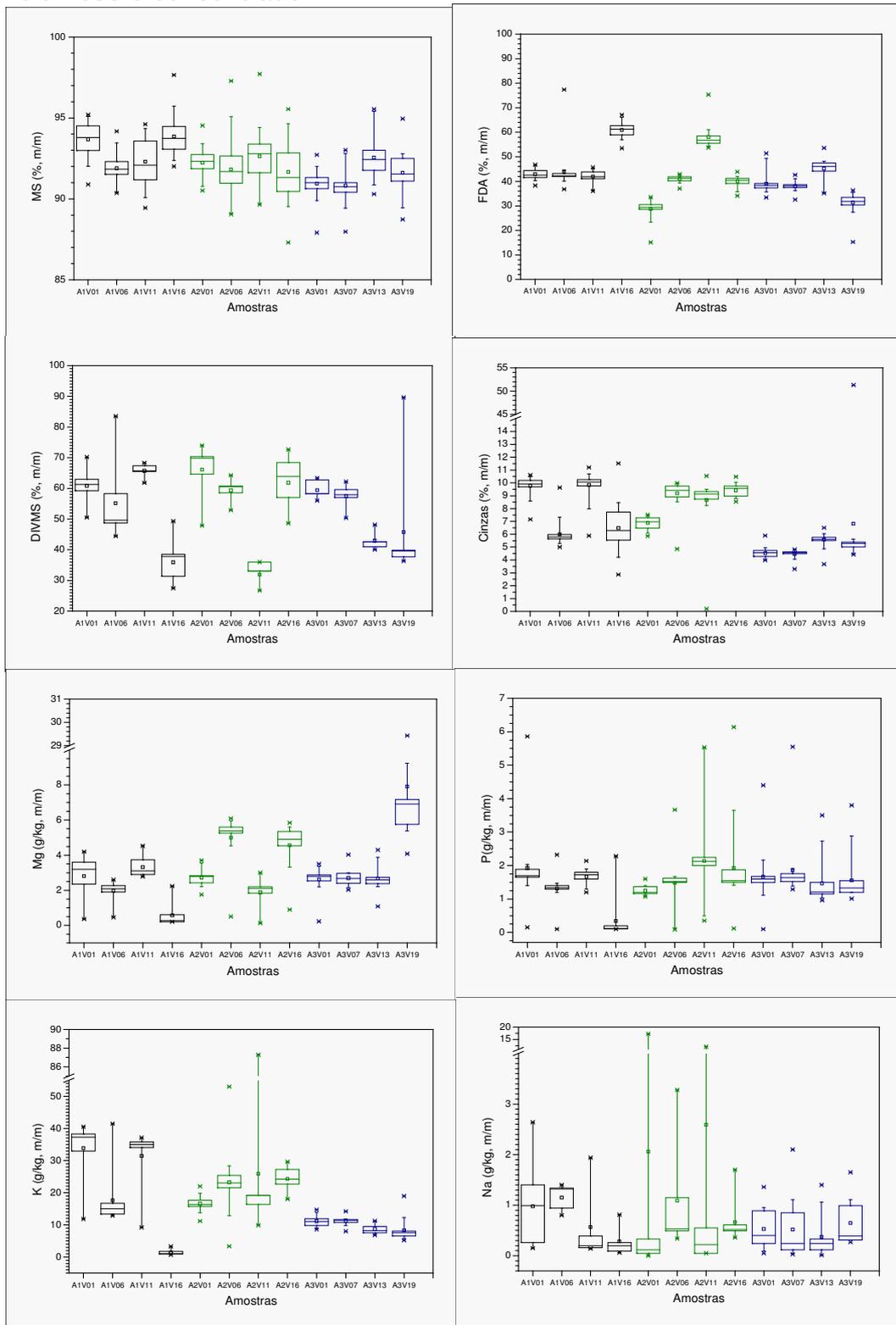
Anexos

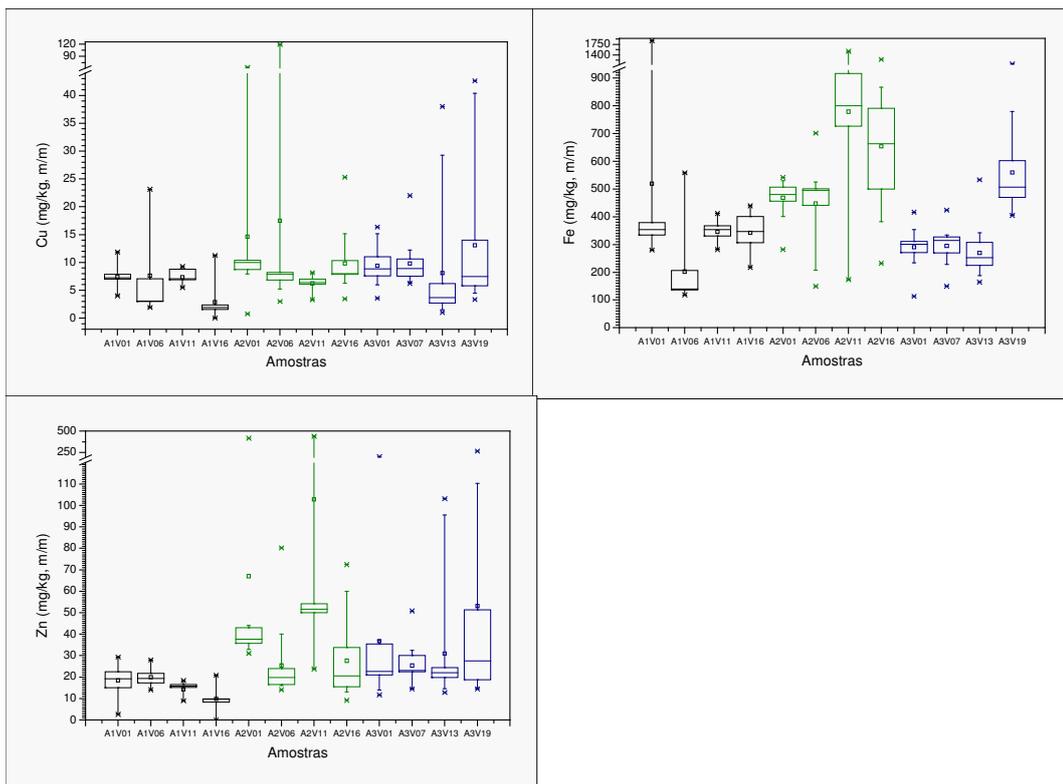
ANEXO A. Tabela com a relação das amostras de volumoso, concentrado e mistura mineral, utilizadas no primeiro ano (A1) e no segundo ano (A2) do EPLNA.

Lotes	Nº da amostra	Identificação das amostras do ano 1
1º Rodada	A1V01	Volumoso: Panicum maximum , cv capim mombaça
	A1C02	Concentrado: Farelo de soja
	A1ARV	ARV: Pennisetum purpureum cv iguaçu, (capim napier, venezuelano)
	A1M04	Mistura mineral para bovinos de leite
	A1ARM	ARM: Mistura mineral para bovinos de cortex
2º Rodada	A1V06	Volumoso: Brachiária Humidícola
	A1C07	Concentrado: Milho
	A1ARV	ARV: Pennisetum purpureum cv iguaçu, (capim napier, venezuelano)
	A1M09	Mistura mineral para equinos
	A1ARM	ARM: Mistura mineral para bovinos de corte
3º Rodada	A1V11	Volumoso: Panicum maximum, cv capim mombaça
	A1C12	Concentrado: Ração para equinos
	A1ARV	ARV: Pennisetum purpureum cv iguaçu, (capim napier, venezuelano)
	A1M14	Mistura mineral para bovinos de leite
	A1ARM	ARM: Mistura mineral para bovinos de corte
4º Rodada	A1V16	Volumoso: Bagaço de Cana
	A1C17	Concentrado: Algaroba
	A1ARV	ARV: Pennisetum purpureum cv iguaçu, (capim napier, venezuelano)
	A1M19	Mistura mineral para equinos
	A1ARM	ARM: Mistura mineral para bovinos de corte

Lotes	Nº da amostra	Identificação das amostras do ano 2
1º Rodada	A2V01	Volumoso: Leguminosa: Foliolos de Estilosantes Campo Grande
	A2C02	Concentrado: Farelo de trigo
	A2ARV	ARV: Feno de Tifton
	A2M04	Mistura Mineral: Sal mineral para vacas secas
	A2ARM	ARM: Sal mineral para vacas em lactação
2º Rodada	A2V06	Volumoso: Capim Tanzânia
	A2C07	Concentrado: Farelo de Arroz Integral
	A2ARV	ARV: Feno de Tifton
	A2M09	Mistura Mineral: Sal Mineral para Suínos
	A2ARM	ARM: Sal mineral para vacas em lactação
3º Rodada	A2V11	Volumoso: Capim Elefante
	A2C12	Concentrado: Farelo de trigo
	A2ARV	ARV: Feno de Tifton
	A2M14	Mistura Mineral: Sal Mineral
	A2ARM	ARM: Sal mineral para vacas em lactação
4º Rodada	A2V16	Volumoso: Capim Tanzânia
	A2C17	Concentrado: Farelo de Soja
	A2ARV	ARV: Feno de Tifton
	A2M19	Mistura Mineral: Sal mineral para vacas secas
	A2ARM	ARM: Sal mineral para vacas em lactação

ANEXO C. Gráficos *Box-Plot* com resultados analíticos das amostras de volumoso e concentrado





Capítulo 7

Referências Bibliográficas

7 – Referências Bibliográficas

- ABNT ISO/IEC GUIA 43, 1999, **Ensaio de Proficiência por Comparações Interlaboratoriais** - Parte 1: Desenvolvimento e Operação de Programas de Ensaio de Proficiência.
- [ABNT] Associação Brasileira de Normas Técnicas. ABNT ISO / IEC 17025. **Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração**. Rio de Janeiro, 2001.
- ANALYTICAL METHODS COMMITTEE, Robust Statistics – How not to reject outliers Part 1. Basic Concepts. **Analyst**, 1989, 114, 1693-1697.
- ANALYTICAL METHODS COMMITTEE. Internal quality control of analytical data. **Analyst**, v. 120, p. 29-34, 1995.
- ANALYTICAL METHODS COMMITTEE. Robust statistics: a method of coping with outliers. Technical Brief N.6, 2001. Disponível em: <http://www.rsc.org/pdf/amc/brief6.pdf>.
- ANKOM Methods, Method for Crude Fat Determinations, ANKOM Technology Corporation, Macedon, NY (2001). Disponível em: <http://www.ankom.com/>.
- ANFAL/SINDIRAÇÕES. SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL/ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS FABRICANTES DE RAÇÕES. 1999. **Alimentação animal. Perfil do Mercado Brasileiro 1999/2000**. Folder. São Paulo. 2000.
- AEMELIN, M.J.A., PRIMAVESI, O., PRIMAVESI, A.C., SAIKI, M. Effect of liming and fertilizer on mineral content and productivity of Brachiaria Decumbens grass forage. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v.271, N.1 p.221–224, 2007.

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC 15 ed. **Official Methods of Analysis**. Virginia, 1990. 1298p., 2 v.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT/ISO/IEC Guia 43: **Ensaio de proficiência por comparações interlaboratoriais**. Parte I: Desenvolvimento e operação de programas de ensaios de proficiência. Rio de Janeiro, ABNT, 1999.
- BELARMINO, M.C.J.; PINTO, J.C.; ROCHA, G.P.; EVANGELISTA, A.R.; MORAIS, A.R.; BOMFIM, E.R.P.; SOARES, K.R. Teores de FDN na forragem de *Panicum maximum* Jacq. Cv. Tanzânia 1 em função da aplicação de doses de fósforo e nitrogênio. In. **REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA**, 38, Piracicaba, SP, 2001. Anais. Piracicaba, SP, SBZ, 2001, 1 CD-Rom seção artigos.
- BOLEY, N., van der VEEN, A.M.H., ROBOUCH, P., GOLZE, M., van de KREEKE, J., ÖRNEMARK, U., TYLEE, B. Comparability of PT Scheme – What did we learn from COEPT. **Accreditation and Quality Assurance**, 2006.
- BOVERA, F., SPANGHERO, G.G., MASOERO, F., BUCCIONI, A. Repeatability and Reproducibility of the Cornell Net Carbohydrate and Protein System Analytical Determinations. **Italian Journal Animal Science**. V.2, p.41-50, 2003.
- CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2ª ed. rev. Campinas:Unicamp, 2003, 207p.
- CIENFUEGOS, F. **Estatística Aplicada ao Laboratório**. Rio de Janeiro, Interciência, 2005, 200p.
- CNPGC – Embrapa Gado de Corte. **Engorda de Bovinos em Confinamento - Aspectos Gerais**. Disponível em: <http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/doc/doc64/05alimentos.html>.
- CHUI, Q. S. H., BISPO, J. M. A., IAMASHITA, C. O., Estudo de homogeneidade de lote de material silício metálico candidato a material de referência, **Química Nova**, v.27, p.993, 2004.
- EURACHEM/CITAC Guide: **Determinando a Incerteza na Medição Analítica**, 2ª Ed., ABNT, INMETRO, SBM - Brasil, 1998.

- EUROPEAN PROFICIENCY TESTING INFORMATION SYSTEM – EPTIS.
<http://www.eptis.bam.de/>. Acesso em: 20 de março de 2007.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2004.
Assessing Quality and Safety of and Animal Feeds. Disponível em:
<http://www.fao.org/agrippa/>.
- FOOD ANALYSIS PERFORMANCE ASSESSMENT SCHEME – FAPAS.
Protocol for the Organisation and Analysis of Data. CSL, Sant Hutton:
York Y41 1LZ, UK, 6^a ed., 2002.
- FUKSHIMA, R.S.; HATFIELD, R.D. Extraction and isolation of lignin and its utilization as a standard to determine lignin concentration through a spectrophotometric method. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.7, p.3133-3139, 2001.
- GRUBBS, F.E. Procedures for Detecting Outlying Observations in Sample. **Technometrics**, v.11, p.1-21, 1969.
- KUSELMAN, I., Comparability of Analytical Results Obtained in Proficiency Testing Based on a Metrological Approach. **Accreditation and Quality Assurance**, v.10, p.466-470, 2006.
- LANARI, D., PINOSA, M., TIBALDI, E., D'AGARO, E. Risultati di due ring test condotti sulla composizione chimica di alcuni alimenti e sulla digeribilità in vivo. **Zootecnica e Nutrizione Animale**, v.17, p.285-295, 1991.
- LAWN, R.E., THOMPSON, M., WALKER, R.F., **Proficiency Testing in Analytical Chemistry**. The Royal Society of Chemistry, 1997, p110.
- LIMA, G.J.M.M. de; NONES, K. **Os cuidados com a mistura de rações na propriedade**. Concórdia: EMBRAPA-CNPSA, 1997. 29p. (Circular Técnica, 19).
- LINSINGER, T.P.J., KANDLER, W., KRŠKA, R. GRASSERBAUER, M. The Influence of Different Evaluation Techniques on the Results of Interlaboratory Comparison. **Accreditation and Quality Assurance**, v.3, p.322-327, 1998.
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento,
<http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em: 20 de março de 2007.

- McDOWELL, L. R. **Minerais para ruminantes sob pastejo em regiões tropicais, enfatizando o Brasil**. 3. ed. Gainesville: University of Florida, 1999. 92 p.
- MAIER, E. A., BOENKE, A., MÉRIGUET, P., Importance of the certified reference materials programs for the European union, **Trends Analytical Chemistry**, v.16, p.496-503, 1997.
- MAIO, F. D. ; ZENEBON, O. ; TIGLEA, P. ; SAKUMA, A. M. Avaliação de Técnicas Estatísticas Aplicáveis a Programas de Ensaio de Proficiência para Chumbo em Sangue. In: **VI Encontro do Instituto Adolfo Lutz**, 2005, São Paulo. Revista do Instituto Adolfo Lutz. São Paulo, 2005.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL, **Nutrient Requirements of Beef Cattle**, Washington, D.C., National Academy of Sciences, 1996.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL, **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**, Washington, D.C., National Academy of Sciences, 2001.
- NOGUEIRA, A.R.A., SOUZA, G.B. **Manual de Laboratório: Solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005. 313p.
- OLIVIERI, J. C. **Programa interlaboratorial: proposta de modelo para interpretação de resultados de análises químicas**. 2004. 102 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Engenharia Mecânica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas 2004.
- Portal do Agronegócio, <http://www.portaldogronegocio.com.br/>. Acesso em: 20 de março de 2007.
- SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3 ed. Viçosa:UFV, 2002, 235p.
- SIMONET B.M., Quality control in qualitative analysis, **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 6, 2005.
- SOUZA, G.B., NOGUEIRA, A.R.A, SUMI, L.M., BATISTA, L.A.R., **Método alternativo para a determinação de fibra em detergente neutro e detergente ácido**. São Carlos: EMBRAPA-CPPSE, 1999. 21 p. EMBRAPA-CPPSE, Boletim de Pesquisa, 4.

- SOUZA, G.B., GUIMARÃES, E.S., SILVA, R.F., NOGUEIRA, A.R.A., PICCHI, C.M.C., BARIONI Jr., W. **Seprolab: Sistema para Gerenciamento do Ensaio de Proficiência para Laboratórios de Nutrição Animal da Embrapa. Registro:** Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI), protocolo n. 012070000188, 2007.
- The Forage and Grassland Terminology Committee (FGTC). Terminology for Grazing Lands and Grazing Animals. **Journal of Production Agriculture**, v.5, p.191-201, 1992.
- TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two-stage technique for the "in vitro" digestion of forage crops. **J.Brit. Grassl. Soc.**, v.18(2), p.104-111, 1963..
- TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **Trends in Analytical Chemistry**, v.23, n. 8, 2004.
- THOMPSON, M., LOWTHIAN, P.J. Statistical Aspects of Proficiency Testing in Analytical Laboratories. Part 3. Confirmatory Statistical Test for Scheme Organisers. **Analyst**, v.121, p.1597-1602, 1996.
- THOMPSON, M. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. **Analyst**, v.3, p. 385-386, 2000.
- THOMPSON, M., ELLISON, L.R. Fitness for purpose – the integrating theme of the revised Harmonised Protocol for Proficiency Testing in Analytical Chemistry Laboratories. **Accreditation and Quality Assurance**, v.11, p.373-378, 2006.
- THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R.; The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories. **Pure Applied Chemistry**, v.78, n.1, p.145–196, 2006.
- UHLIG, S., LISCHER, P. Statistically-based Performance Characteristics in Laboratory Performance Studies. **Analyst**, v.123, p.167-172, 1998.
- VAN SOEST, P.J. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. A rapid method for the determination of fiber and lignin. **J. Assoc. Official Agr. Chem.**, v.46(5), p.829-835, 1963.

- VAN SOET, P.J.; WINE, R.H. Determination of lignin and cellulose in acid detergent fiber with permanganate. **J. Assoc. Official Agr. Chem.**, v.51, p. 780-785, 1968.
- VAN SOEST, P.J., ROBERTSON, J.B., LEWIS, B.A. Symposium: Carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal Dairy Science**, v.74, p.3583-97. 1991.
- VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2a Ed. Ithaca, New York, Cornell University Press, 1994. 476p.
- VENELINOV, T., QUEVAUVILLER P., Are Certified Reference Materials Really Expensive?, **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n.1, 2003
- VISSER, R.G. Interpretation of Interlaboratory Comparison Results to Evaluate Laboratory Proficiency. **Accreditation and Quality Assurance**, v.10, p.521-526, 2006.
- WONG, S.K. A comparison of performance statistics for proficiency testing programmes. **Accreditation and Quality Assurance**, v.12, p.59-66, 2007.