AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE UM MATERIAL DE REFERÊNCIA DE RIM BOVINO

LILIANA CASTRO

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

Orientadora:

Profa. Dra. Marina B. Agostini Vasconcellos

Coorientador:

Prof. Dr. Edson Gonçalves Moreira

São Paulo

2017

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE UM MATERIAL DE REFERÊNCIA DE RIM BOVINO

LILIANA CASTRO

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

Orientadora:
Profa. Dra. Marina B. Agostini Vasconcellos

Coorientador:
Prof. Dr. Edson Gonçalves Moreira

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2017

AGRADECIMENTOS

A Norma Junqueira por ser minha primeira professora e amiga. Sem suas aulas a escrita de esta tese teria sido impossível.

A Vera Ponçano por ter me ajudado desinteressadamente quando cheguei a São Paulo e me apresentar a Dra. Marina Vasconcellos.

À Dra. Marina Beatriz Agostini Vasconcellos pela sua orientação, amizade, apoio e confiança em meu trabalho.

Ao Dr. Edson Gonçalves Moreira pela orientação, amizade e ajuda nas diferentes etapas deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Rymer Ramiz Tullio da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA, pela doação dos rins utilizados neste trabalho.

Ao Dr. Almir Faria Clain, do Instituto de Radioproteção e Dosimetria, IRD-CNEN/RJ pela sua ajuda na moagem dos rins liofilizados.

À Dra. Marilene Morelli Serna do Centro de Ciências e Tecnologia de Materiais do IPEN-CNEN/SP pela sua ajuda na caracterização granulométrica do material de referência.

A Lucilena Rebelo Monteiro pela sua grande ajuda na difusão da comparação interlaboratorial.

Ao Dr. Bruno Lemos Batista do Centro de Ciências Naturais e Humanas da Universidade Federal do ABC por permitir a utilização do seu equipamento de ICP-MS e por sua ajuda durante as análises.

À Dra. Ana Maria Graciano Figueiredo, Dra. Deborah Teixeira Favaro e Mitiko Saiki, pela sua amizade e apoio, fazendo-me sentir sempre como em casa.

A Edson Alves e Regina Beck Ticianelli por ter me aberto as portas da sua sala e compartilhar tantos momentos bons comigo.

A todos os demais professores e funcionários do CRPq, Dra Vera Maihara, Dr. Guilherme Soares Zahn, Dr. Renato Semmler, Dra Marília Catharino Semmler, Dr. Paulo Cardoso da Silva, Dra. Maria Jose Armelin, Rosemeire Paiva, Dr. Casimiro Munita e Dr. Frederico Genezini por ter me recebido afetuosamente e compartilhado comigo bons papos e cafés.

A Camila Neves Lange por andar o caminho junto comigo fazendo o percurso mais leve e divertido.

A todos os alunos e amigos do IPEN que de alguma maneira ajudaram, acompanharam e compartilharam meu dia a dia ao longo destes anos: Tassiane, Roberto, Rosiana, Jessica, Robson, Rodolfo, Jefferson, Wellington, Sussa, Vitor, Amanda, Eliane, Daniel, Uanda, Bruno, Nicole, Matheus, as três Carolines e a Isabella. Com certeza estarei esquecendo alguém. Minhas desculpas.

Aos meus pais e irmãs, por entender e apoiar minhas decisões e por estarem sempre presentes e me ajudando apesar da distancia.

A Cassio pelo amor, por estar sempre ao meu lado apoiando minhas escolhas e por ter me empurrado por trilhas pelas que não teria tido a coragem de transitar sozinha.

A Martín e Tomás por ser os que dão sentido a tudo na minha vida.

*“Que otros se jacten de las páginas que han escrito;
a mí me enorgullecen las que he leído.”*

*Jorge Luis Borges
Un lector, em Elogio de la sombra, 1969.*

RESUMO

CASTRO, L. Preparo e caracterização de um material de referência de rim bovino.

2017. 271 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

A utilização de materiais de referência é uma ferramenta fundamental na obtenção da comparabilidade e rastreabilidade das medições químicas. No presente trabalho foram desenvolvidas todas as etapas necessárias para a preparação, caracterização e certificação de um material de referência de rim bovino segundo os requisitos aceitos internacionalmente. Dado que o uso pretendido do material de referência é o controle de qualidade de produtos cárneos, alguns elementos com relevância nutricional ou que poderiam constituir contaminantes alimentares potenciais foram escolhidos para serem determinados. Foi estudada a homogeneidade do material tanto dentro quanto entre os diversos frascos preparados e a estabilidade do material em diferentes temperaturas e tempos, obtendo resultados satisfatórios. Para poder abarcar todos os elementos de interesse, os estudos de homogeneidade e estabilidade foram realizados utilizando-se três técnicas analíticas diferentes, análise por ativação neutrônica, espectrometria de massa com fonte de plasma acoplada indutivamente e espectrometria de absorção atômica de vapor frio. Para a avaliação dos estudos de homogeneidade e estabilidade foram utilizadas técnicas estatísticas univariadas clássicas como os testes de análise de variância e de regressão, e técnicas de análise multivariada como análise de componentes principais e análise de agrupamento hierárquico. Para atribuir valores às concentrações dos elementos de interesse, foi organizada uma comparação interlaboratorial com 33 laboratórios participantes, tanto de Brasil quanto do exterior. A avaliação conjunta dos resultados da comparação interlaboratorial e dos estudos de homogeneidade e estabilidade realizados possibilitou atribuir valores a 20 elementos com suas respectivas incertezas, sendo 9 valores certificados (As, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Se e Zn), 10 valores indicativos (Br, Ca, Cd, Cl, Co, Cs, Hf, Mo, P e Rb) e 1 como informação adicional (Hg).

Palavras chave: material de referência, rim bovino, análise por ativação neutrônica, análise multivariada, análise de componentes principais.

ABSTRACT

CASTRO, L. Preparation and characterization of a bovine kidney reference material.

2017. 271 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

The use of reference materials is a fundamental tool in obtaining comparability and traceability of chemical measurements. In the present work, all necessary steps for the preparation, characterization and certification of bovine kidney reference material were developed according to internationally accepted requirements. Since the intended use of the reference material is the quality control of meat products, some elements of nutritional relevance or that could constitute potential food contaminants have been chosen to be determined. Between and within bottle homogeneity of the material was assessed as well as its stability at different temperatures and times, obtaining satisfactory results. In order to cover all elements of interest, homogeneity and stability studies were performed using three different analytical techniques, neutron activation analysis, inductively coupled plasma mass spectrometry and cold vapor atomic absorption spectrometry. For the evaluation of the homogeneity and stability studies, classical univariate statistical techniques such as analysis of variance and regression analysis were used. Multivariate analysis such as principal component analysis and hierarchical cluster analysis were used as complementary techniques. To assign values to the concentrations of the elements of interest, an interlaboratory comparison was organized with 33 participating laboratories, both from Brazil and abroad. From the overall evaluation of the interlaboratory comparison results and the homogeneity and stability studies, it was possible to assign values to 20 elements with their respective uncertainties, being 9 certified values (As, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Se and Zn), 10 indicative values (Br, Ca, Cd, Cl, Co, Cs, Hf, Mo, P and Rb) and 1 as additional information (Hg).

Key words: reference materials, bovine kidney, neutron activation analysis, multivariate analysis, principal component analysis.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	19
2 PAPEL DOS MATERIAIS DE REFERÊNCIA NO SISTEMA METROLÓGICO	25
2.1 Organização internacional da metrologia	25
2.2 Rastreabilidade metrológica	28
2.3 Algumas considerações na preparação de materiais de referência	31
2.3.1 Coleta e preparação do material	31
2.3.2 Caracterização química e física do material	34
2.3.3 Certificação do MR	37
3 ALIMENTOS DE ORIGEM CÁRNEA	39
3.1 Importância nutricional e comercial na região	39
3.2 Medições químicas necessárias para assegurar a inocuidade dos produtos cárneos e sua qualidade nutricional	42
3.3 Escolha da matriz do candidato a MR e dos elementos a serem certificados	46
4 FUNDAMENTOS TEÓRICOS DOS MÉTODOS UTILIZADOS	60
4.1 Técnicas analíticas	60
4.1.1 Análise por Ativação Neutrônica, NAA	60
4.1.2 Espectrometria de Absorção Atômica de Vapor Frio, CV AAS	63
4.1.3 Espectrometria de Massa com Fonte de Plasma Acoplada Indutivamente, ICP-MS	64
4.2 Técnicas estatísticas multivariadas	66
4.2.1 Análise de Componentes Principais, PCA	66
4.2.2 Análise de Agrupamentos Hierárquica, HCA	67
5 PARTE EXPERIMENTAL	69
5.1 Preparação do material	69
5.1.1 Aquisição do material	69
5.1.2 Pré-tratamento do material	70
5.1.3 Liofilização do material processado	70
5.1.4 Moagem do material liofilizado	71
5.1.5 Peneiramento do material moído	71
5.1.6 Homogeneização do candidato a MR	72
5.1.7 Envase do candidato a MR	73

5.1.8	Armazenamento do candidato a MR	73
5.1.9	Esterilização com radiação gama	73
5.2	Caracterização química e física do material	74
5.2.1	Medição da atividade microbiológica	74
5.2.2	Determinação do teor de umidade	74
5.2.3	Determinação da distribuição do tamanho de partículas	75
5.2.4	Determinação de elementos por INAA	75
5.2.4.1	Preparo de amostras e padrões	76
5.2.4.2	Irradiação de amostras e medição	77
5.2.5	Determinação de elementos por ICP-MS	79
5.2.5.1	Preparo de amostras e padrões	80
5.2.5.2	Condições de operação do ICP-MS	81
5.2.6	Determinação de mercúrio por CV AAS	82
5.2.6.1	Preparo de amostras, padrões e soluções complementares	82
5.2.6.2	Condições de operação do CV AAS	84
5.2.7	Avaliação da homogeneidade	84
5.2.8	Avaliação da estabilidade	85
5.3	Certificação do candidato a MR	87
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	90
6.1	Determinação da atividade microbiológica	90
6.2	Determinação do teor de umidade residual	91
6.3	Determinação da distribuição do tamanho de partículas	92
6.4	Caracterização de alguns dos parâmetros de validação das metodologias utilizadas	95
6.4.1	Determinação dos limites de detecção e quantificação	95
6.4.2	Análises de materiais de referência certificados	97
6.4.3	Incertezas de medição	102
6.4.3.1	Avaliação das incertezas de medição associadas aos resultados obtidos por INAA	104
6.4.3.2	Avaliação das incertezas de medição associadas aos resultados obtidos por ICP-MS e CV AAS	106
6.5	Avaliação da homogeneidade	109
6.5.1	Avaliação da homogeneidade dos elementos analisados por INAA	109
6.5.1.1	Homogeneidade entre frascos	109
6.5.1.2	Homogeneidade intra-frasco	117
6.5.1.3	Micro-homogeneidade	120

6.5.2	Avaliação da homogeneidade dos elementos analisados por ICP-MS	125
6.5.3	Avaliação da homogeneidade do elemento Hg analisado por CV AAS	131
6.5.4	Estimativa da componente de incerteza devida à homogeneidade	134
6.6	Avaliação da estabilidade de curto prazo	136
6.6.1	Avaliação da estabilidade de curto prazo dos elementos analisados por INAA	136
6.6.2	Avaliação da estabilidade de curto prazo dos elementos analisados por ICP-MS	142
6.6.3	Avaliação da estabilidade de curto prazo do elemento Hg analisado por CV AAS	147
6.6.4	Estimativa da componente de incerteza devida à estabilidade de curto prazo	150
6.7	Avaliação da estabilidade de longo prazo	150
6.7.1	Avaliação da estabilidade de longo prazo dos elementos analisados por INAA	150
6.7.2	Avaliação da estabilidade de longo prazo dos elementos analisados por ICP-MS	154
6.7.3	Avaliação da estabilidade de longo prazo do elemento Hg analisado por CV AAS	158
6.7.4	Estimativa da incerteza devida à estabilidade de longo prazo	160
6.8	Certificação do candidato a MR	162
6.8.1	Avaliação dos resultados da comparação interlaboratorial	164
6.8.1.1	Avaliação dos resultados enviados para o material de referência IPEN 001–Trace element in fish tissue (MRC QC)	165
6.8.1.1.1	Valor de referência e valor de consenso	165
6.8.1.1.2	Avaliação do desempenho dos laboratórios participantes	175
6.8.1.2	Avaliação dos resultados enviados para o candidato a material de referência IPEN RB1–Trace Elements in Bovine Kidney	177
6.8.1.2.1	Valor de consenso	177
6.8.1.2.2	Metodologias analíticas aplicadas na determinação do valor de consenso.	180
6.8.1.2.3	Avaliação do desempenho dos laboratórios participantes	182
6.8.2	Calculo de incertezas de certificação dos valores obtidos	182
6.8.3	Atribuição de valores aos elementos no candidato a material de referência de rim bovino	185
6.8.4	Rastreabilidade dos valores atribuídos aos elementos no candidato a material de referência de rim bovino	188
7	CONCLUSÕES	189

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	191
APÊNDICE A – Lista de participantes do programa de comparação interlaboratorial para caracterização de candidato a material de referência de rim bovino	211
APÊNDICE B – Carta convite e instruções de medição do programa de comparação interlaboratorial para caracterização de candidato a material de referência de rim bovino	215
APÊNDICE C – Estudo de tendências na avaliação da homogeneidade entre frascos: a) resultados apresentados por ordem de medição com ajuste de curva linear; b) resultados apresentados por ordem de frasco com ajuste de curva linear	220
APÊNDICE D – Estudo de tendências em função do tempo de exposição às duas temperaturas avaliadas no estudo de estabilidade de curto prazo. a) resultados obtidos a 20°C com ajuste de curva linear; b) resultados obtidos a 50°C com ajuste de curva linear	226
APÊNDICE E – Estudo de tendências em função do tempo de exposição a 20°C no estudo de estabilidade de longo prazo. Resultados obtidos com ajuste de curva linear.	232
APÊNDICE F – Resultados informados pelos laboratórios participantes na comparação interlaboratorial de certificação.	234
APÊNDICE G – Métodos utilizados pelos participantes para a determinação dos elementos na comparação interlaboratorial.	244
APÊNDICE H – Gráficos de distribuição de densidade de Kernel para os resultados da comparação interlaboratorial.	245
APÊNDICE I – Resultados informados pelos participantes na comparação interlaboratorial, valor de consenso e valor certificado, quando disponível. Valores em vermelho não foram considerados nos cálculos do valor de consenso e incerteza associada.	249
APÊNDICE J – Valores de z e zeta obtidos pelos laboratórios participantes na comparação interlaboratorial de certificação.	256
APÊNDICE K – Resultados utilizados para estimar o valor de consenso do candidato a material de referência IPEN RB1–Trace Elements in Bovine Kidney ordenados segundo a metodologia analítica utilizada pelos participantes.	262
APÊNDICE L – Contribuição das fontes de incerteza das diferentes etapas da caracterização (u_{car} , u_{bb} e u_{Its}) na estimativa das incertezas padrão combinadas (u_{MRC}) para os valores de concentração dos elementos no candidato a material de referência IPEN RB1–Trace Elements in Bovine Kidney.	265
ANEXO A – Certificado do material de referência IPEN 001–Trace element in fish tissue	267

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 2.1 – Comitês consultivos do CIPM	26
Tabela 2.2 – Organismos regionais de metrologia	27
Tabela 3.1 – Consumo de carne per capita na América do Sul	40
Tabela 3.2 – Dados econômicos da pecuária Argentina no ano 2015	42
Tabela 3.3 – Limites estabelecidos pela Comunidade Europeia para os elementos Cd, Hg e Pb expressados em mg kg ⁻¹ de alimento fresco	43
Tabela 3.4 – Limites estabelecidos por ANVISA para os elementos As, Cd e Pb, expressados em mg kg ⁻¹ de carne in natura	44
Tabela 3.5 – Limites máximos estabelecidos em vários países para os elementos Cu e Zn, expressados em mg kg ⁻¹ de carne in natura	45
Tabela 3.6 – Dados de composição nutricional aproximada da carne magra de diferentes origens e de rim bovino	46
Tabela 5.1 – Padrões de calibração utilizados para INAA	77
Tabela 5.2 – Condições utilizadas no estudo de micro-homogeneidade	78
Tabela 5.3 – Dados nucleares dos radionuclídeos utilizados neste trabalho	79
Tabela 5.4 – Condições utilizadas na digestão por micro-ondas	80
Tabela 5.5 – Padrões de calibração utilizados para ICP-MS	81
Tabela 5.6 – Condições de operação utilizadas na determinação de Hg por CV AAS	82
Tabela 5.7 – Condições utilizadas na digestão por micro-ondas	83
Tabela 5.8 – Curva de calibração utilizada na determinação de Hg com CV AAS	83
Tabela 5.9 – Condições de operação utilizadas na determinação de Hg por CV AAS	84
Tabela 6.1 – Atividade microbiológica por grama de amostra seca, expressada em unidades formadoras de colônias (UFC)	90
Tabela 6.2 – Dados de umidade obtidos nas amostras analisadas	91
Tabela 6.3 – Limites de detecção e de quantificação dos elementos analisados por INAA	96
Tabela 6.4 – Limites de detecção e de quantificação dos elementos analisados por CV AAS e ICP-MS	97
Tabela 6.5 – Valores certificados, valores medidos e valores de En calculados para os MRCs analisados por INAA	99
Tabela 6.6 – Valores certificados, valores medidos e valores de En calculados para os MRCs analisados por ICP-MS	100
Tabela 6.7 – Valores certificados, valores medidos e valores de En calculados para o Hg nos MRCs analisados por CV AAS	100

Tabela 6.8 – Dados de concentração e incerteza expandida, em mg kg^{-1} , obtidos por INAA para uma amostra do candidato a material de referência de rim bovino (base úmida)	106
Tabela 6.9 – Dados de concentração e incerteza expandida, em mg kg^{-1} , obtidos por ICP-MS e CV AAS para uma amostra do candidato a material de referência de rim bovino (base úmida)	108
Tabela 6.10 – Concentrações obtidas por INAA para cada um dos frascos analisados do candidato a material de referência no estudo de homogeneidade entre frascos (base úmida)	109
Tabela 6.11 – Resultados dos testes estatísticos realizados para avaliar os requisitos de ANOVA na avaliação da homogeneidade entre frascos por INAA	111
Tabela 6.12 – Estatísticas de ANOVA da regressão linear para o estudo de tendências na avaliação dos resultados da homogeneidade entre frascos por INAA	112
Tabela 6.13 – Estatísticas de ANOVA para resultados obtidos por INAA no estudo de homogeneidade entre frascos	114
Tabela 6.14 – Concentrações médias e incertezas expandidas obtidas por INAA para cada uma das massas do candidato a material de referência analisadas no estudo de homogeneidade intra- frasco (base úmida)	117
Tabela 6.15 Resultados dos testes estatísticos realizados para avaliar os requisitos de ANOVA na avaliação da homogeneidade intra-frasco por INAA	118
Tabela 6.16 – Resultados do estudo da quantidade mínima de amostra no estudo de homogeneidade intra-frasco	120
Tabela 6.17 – Valores de concentração, desvio padrão relativo e número de determinações no estudo de micro-homogeneidade	122
Tabela 6.18 – Incertezas combinadas, RSE, RSD e fatores de homogeneidade relativos (H_E) calculados para cada elemento analisado	123
Tabela 6.19 – Massa mínima requerida para alcançar uma precisão de 5% e 10% com um nível de confiança de 95%	124
Tabela 6.20 – Concentrações médias e incertezas expandidas obtida por ICP-MS para cada um dos frascos analisados do candidato a material de referência no estudo de homogeneidade entre frascos (base úmida)	126
Tabela 6.21 – Resultados dos testes estatísticos realizados para avaliar os requisitos de ANOVA na avaliação da homogeneidade entre frascos por ICP-MS	126
Tabela 6.22 – Estatísticas de ANOVA da regressão linear para o estudo de tendências na avaliação dos resultados da homogeneidade entre frascos por ICP-MS	127
Tabela 6.23 – Estatísticas de ANOVA para resultados obtidos por ICP-MS no estudo de homogeneidade entre frascos	129
Tabela 6.24 – Concentrações médias e incertezas expandidas obtidas por CV AAS para cada um dos frascos analisados do candidato a material de referência no estudo de homogeneidade entre frascos (base úmida)	131
Tabela 6.25 – Resultados dos testes estatísticos realizados para avaliar os requisitos de ANOVA na avaliação da homogeneidade entre frascos por CV AAS	132

Tabela 6.26 – Estatísticas de ANOVA da regressão linear para o estudo de tendências na avaliação dos resultados da homogeneidade entre frascos por CV AAS	132
Tabela 6.27 – Estatísticas de ANOVA e teste de Kruskal-Wallis para os resultados obtidos para o elemento Hg por CV AAS	134
Tabela 6.28 – Estimativa da incerteza padrão devida à homogeneidade e médias quadráticas obtidas por ANOVA no estudo de homogeneidade entre frascos	135
Tabela 6.29 – Concentração média obtida por INAA para cada um dos frascos analisados no estudo de estabilidade de curto prazo (base úmida)	136
Tabela 6.30 – Resultados dos testes estatísticos realizados para avaliar os requisitos de ANOVA na avaliação da estabilidade de curto prazo por INAA	137
Tabela 6.31 – Estatísticas de ANOVA da regressão linear para o estudo de tendências em função do tempo de exposição às duas temperaturas analisadas na avaliação da estabilidade de curto prazo por INAA	138
Tabela 6.32 – Estatísticas de ANOVA para resultados obtidos por INAA para o estudo de estabilidade de curto prazo	140
Tabela 6.33 – Concentração média obtida por ICP-MS para cada um dos frascos analisados no estudo de estabilidade de curto prazo (base úmida)	142
Tabela 6.34 – Resultados dos testes estatísticos realizados para avaliar os requisitos de ANOVA na avaliação da estabilidade de curto prazo por ICP-MS	143
Tabela 6.35 – Estatísticas de ANOVA da regressão linear para o estudo de tendências em função do tempo de exposição às duas temperaturas analisadas na avaliação da estabilidade de curto prazo por ICP-MS	143
Tabela 6.36 – Estatísticas de ANOVA para resultados obtidos por ICP-MS para o estudo de estabilidade de curto prazo	145
Tabela 6.37 – Concentração média obtida por CV AAS para cada um dos frascos analisados no estudo de estabilidade de curto prazo (base úmida)	147
Tabela 6.38 – Resultados dos testes estatísticos realizados para avaliar os requisitos de ANOVA na avaliação da estabilidade de curto prazo do Hg por CV AAS	148
Tabela 6.39 – Estatísticas de ANOVA da regressão linear para o estudo de tendências em função do tempo de exposição às duas temperaturas analisadas na avaliação da estabilidade de curto prazo do Hg por CV AAS	148
Tabela 6.40 – Estatísticas de ANOVA para resultados obtidos para o Hg por CV AAS no estudo de estabilidade de curto prazo	150
Tabela 6.41 – Concentração média obtida por INAA para cada um dos frascos analisados no estudo de estabilidade de longo prazo (base úmida)	151
Tabela 6.42 – Resultados dos testes estatísticos realizados para avaliar os requisitos de ANOVA na avaliação da estabilidade de longo prazo por INAA	152
Tabela 6.43 – Estatísticas de ANOVA da regressão linear para o estudo de tendências em função do tempo na avaliação da estabilidade de longo prazo por INAA	153

Tabela 6.44 – Concentração média obtida por ICP-MS para cada um dos frascos analisados no estudo de estabilidade de longo prazo (base úmida)	155
Tabela 6.45 – Resultados dos testes estatísticos realizados para avaliar os requisitos de ANOVA na avaliação da estabilidade de longo prazo por ICP-MS	155
Tabela 6.46 – Estatísticas de ANOVA da regressão linear para o estudo de tendências em função do tempo na avaliação da estabilidade de longo prazo por ICP-MS	156
Tabela 6.47 – Concentração média obtida para o Hg por CV AAS para cada um dos frascos analisados no estudo de estabilidade de longo prazo (base úmida)	158
Tabela 6.48 – Resultados dos testes estatísticos realizados para avaliar os requisitos de ANOVA na avaliação da estabilidade de longo prazo do Hg por CV AAS	159
Tabela 6.49 – Estatísticas de ANOVA da regressão linear para o estudo de tendências em função do tempo na avaliação da estabilidade de longo prazo do Hg por CV AAS	159
Tabela – 6.50 Estimativa da incerteza padrão devida à estabilidade de longo prazo para um tempo de prateleira de 24 meses	161
Tabela 6.51 – Métodos analíticos utilizados pelos laboratórios participantes na determinação dos elementos nas amostras da comparação interlaboratorial	163
Tabela 6.52 – Teor de umidade informado pelos participantes para as amostras enviadas no ensaio interlaboratorial de certificação	164
Tabela 6.53 – Métodos estatísticos aplicados para o cálculo do valor de consenso e desvio padrão dos resultados obtidos na comparação interlaboratorial para o MRC IPEN 001-Trace element in fish tissue	165
Tabela 6.54 – Valores certificados e valores de consenso, em mg kg ⁻¹ , obtidos pela aplicação dos cinco testes estatísticos estudados, junto com as incertezas expandidas associadas (k=2)	170
Tabela 6.55 – Valores certificados e valores de consenso e desvio padrão calculados para o MRC IPEN 001-Trace element in fish tissue utilizando o método robusto da mediana e IQN, com incertezas expandidas (k = 2)	172
Tabela 6.56 – Valores de consenso e desvio padrão calculados para o candidato a material de referência IPEN RB1 Trace Elements in Bovine Kidney utilizando o método robusto da mediana e IQN, com incertezas expandidas (k=2)	178
Tabela 6.57 – Valores de consenso e desvio padrão calculados para alguns dos elementos adicionais informados pelos participantes no candidato a material de referência IPEN RB1 Trace Elements in Bovine Kidney, com incertezas expandidas (k=2)	180
Tabela 6.58 – Estimativa das incertezas padrão combinadas, em mg kg ⁻¹ , para os valores de concentração dos elementos analisados na comparação interlaboratorial de caracterização do candidato a material de referência IPEN RB1 Trace Elements in Bovine Kidney	183
Tabela 6.59 – Classificação dos elementos no candidato a material de referência IPEN RB1 Trace Elements in Bovine Kidney, junto com os critérios considerados	186

Tabela 6.60– Valores certificados para a concentração, atribuídos aos elementos no material de referência de rim bovino IPEN RB1 Trace Elements in Bovine Kidney	187
Tabela 6.61 – Valores indicativos para a concentração, atribuídos aos elementos no material de referência de rim bovino IPEN RB1 Trace Elements in Bovine Kidney	187
Tabela 6.62 – Informação adicional para a concentração do elemento Hg no material de referência de rim bovino IPEN RB1 Trace Elements in Bovine Kidney	187

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 2.1 – Organização internacional da metrologia	25
Figura 2.2 – Intercomparações chave para estabelecer a comparabilidade internacional	28
Figura 2.3 – Pirâmide de rastreabilidade	29
Figura 3.1 – Representação gráfica do consumo total de carne por pessoa por ano nos países da América do sul. A linha vermelha representa a média de consumo mundial	40
Figura 3.2 – Evolução anual do abate de bovinos e suínos no Brasil entre 1997 e 2016	41
Figura 3.3 – Características morfológicas dos rins suínos e bovinos	48
Figura 3.4 – Conteúdo de arsênio na água na Argentina, por departamento	50
Figura 4.1 – Esquema que representa a sequência de eventos de uma reação (n, γ)	61
Figura 5.1 – Diferentes estágios no pré-tratamento do material de referência	70
Figura 5.2 – Peneira vibratória utilizada no peneiramento do candidato a material de referência	72
Figura 5.3 – Homogeneizador em Y utilizado na homogeneização do candidato a material de referência	72
Figura 5.4 – Lote do candidato a material de referência após o envase	73
Figura 5.5 – Estudo isócrono de estabilidade de curto prazo	86
Figura 5.6 – Estudo isócrono de estabilidade de longo prazo	87
Figura 6.1 – Distribuição granulométrica para os três frascos do candidato a MR analisados	92
Figura 6.2 – Comparação da distribuição granulométrica do candidato a MR de rim bovino e outros MRC de matriz similar	93
Figura 6.3 – Ajuste de curva gaussiana à distribuição granulométrica do candidato a MR de rim bovino	94
Figura 6.4 – Valores de $ En $ obtidos para os MRC analisados por INAA, ICP-MS e CV AAS	101
Figura 6.5 – Diagrama de causa e efeito para a determinação da concentração dos elementos analisados por INAA	105
Figura 6.6 – Diagrama de causa e efeito para a determinação da concentração dos elementos analisados por ICP-MS e CV AAS	107
Figura 6.7 – Representação gráfica dos resultados para o analito Mn no estudo de tendências em função da ordem de medição (a) e do número de frasco (b) com ajuste de curva linear	113

Figura 6.8– Representação gráfica das duas componentes principais para o estudo de homogeneidade entre frascos por INAA	115
Figura 6.9 – Dendograma para os resultados do HCA usando método de agrupamento de Ward e distâncias Euclidianas para o estudo de homogeneidade entre frascos por INAA	116
Figura 6.10 – Representação gráfica das duas componentes principais no estudo da quantidade mínima de amostra	119
Figura 6.11 – Representação gráfica dos resultados para o analito Cu no estudo de tendências em função da ordem de medição (a) e do número de frasco (b) com ajuste de curva linear	128
Figura 6.12 – Representação gráfica das duas componentes principais para o estudo de homogeneidade entre frascos por ICP-MS	129
Figura 6.13 – Dendograma para os resultados do HCA usando método de agrupamento de Ward e distâncias Euclidianas para o estudo de homogeneidade entre frascos por ICP-MS	130
Figura 6.14 – Representação gráfica dos resultados para o analito Hg no estudo de tendências em função da ordem de medição (a) e do número de frasco (b) com ajuste de curva linear	133
Figura 6.15 – Estudo de tendências em função do tempo de exposição às duas temperaturas avaliadas para o analito Zn no estudo de estabilidade de curto prazo. Resultados obtidos para 20°C (a) e 50°C (b) com ajuste de curva linear	139
Figura 6.16 – Representação gráfica das duas componentes principais (a) e dendograma obtido na HCA usando método de agrupamento de Ward e distâncias Euclidianas (b) para o estudo de estabilidade de curto prazo por INAA	141
Figura 6.17 – Estudo de tendências em função do tempo de exposição às duas temperaturas avaliadas para o analito As no estudo de estabilidade de curto prazo. Resultados obtidos para 20°C (a) e 50°C (b) com ajuste de curva linear	144
Figura 6.18 – Representação gráfica das duas componentes principais (a) e dendograma obtido na HCA usando método de agrupamento de Ward e distâncias Euclidianas (b) para o estudo de estabilidade de curto prazo por ICP-MS	146
Figura 6.19 – Estudo de tendências em função do tempo de exposição às duas temperaturas avaliadas para o analito Hg no estudo de estabilidade de curto prazo. Resultados obtidos para 20°C (a) e 50°C (b) com ajuste de curva linear	149
Figura 6.20 – Estudo de tendências em função do tempo de exposição a 20°C no estudo de estabilidade de curto prazo. Resultados obtidos para o analito Mn (a) e o analito Na (b) com ajuste de curva linear	154
Figura 6.21 – Estudo de tendências em função do tempo de exposição a 20°C no estudo de estabilidade de longo prazo. Resultados obtidos para o analito As (a), o analito Cd (b) e o analito Cu (c) com ajuste de curva linear	157
Figura 6.22 – Estudo de tendências em função do tempo de exposição a 20°C no estudo de estabilidade de longo prazo. Resultados obtidos para o analito Hg com ajuste de curva linear	159

Figura 6.23 – Resultados obtidos com os métodos estatísticos aplicados na avaliação do MRC QC para alguns elementos selecionados, em vermelho o valor de referência certificado e sua incerteza expandida	171
Figura 6.24 – Representação gráfica da densidade de Kernel para os dados informados pelos participantes para o elemento Cd no MRC IPEN 001-Trace element in fish tissue	173
Figura 6.25– Resultados informados pelos participantes para o MRC QC, junto com os valores de referência, valores de consenso e incertezas expandidas associadas, para elementos selecionados	174
Figura 6.26 – Valores de z obtidos para o MRC IPEN 001-Trace element in fish tissue, para alguns elementos selecionados	177
Figura 6.27 – Valores obtidos pelos laboratórios no candidato a material de referência IPEN RB1 Trace Elements in Bovine Kidney, valor de consenso e incerteza expandida, para alguns elementos selecionados. Em vermelho, resultados não considerados no cálculo do valor de consenso e incerteza	179
Figura 6.28 – Resultados utilizados para estimar o valor de consenso do candidato a material de referência IPEN RB1 Trace Elements in Bovine Kidney ordenados segundo a metodologia analítica utilizada pelos participantes, para elementos selecionados	181
Figura 6.29 – Contribuição das fontes de incerteza das diferentes etapas da caracterização (u_{car} , u_{bb} e u_{lts}) na estimativa das incertezas padrão combinadas para os valores de concentração de elementos selecionados no candidato a material de referência	184

1 INTRODUÇÃO

A busca pela obtenção da comparabilidade nas medições tem sido constante desde que a humanidade começou a trocar bens e produtos e desenvolver a agricultura. As medições começaram a ficar importantes na hora de distribuir as colheitas, por exemplo, e determinar quanto grão devia ser entregue a cada família. Padrões naturais, baseados no corpo humano, como mão, palma ou pé, foram usados desde quase o ano 6000 a.C, porém o primeiro registro de estabelecimento de um padrão de medida permanente data do ano 2900 a.C na construção da grande pirâmide de Khufu no Egito. O faraó Khufu foi o primeiro a estabelecer uma unidade padrão de comprimento por decreto real, baseada no comprimento de seu antebraço e mão (do cotovelo até a ponta do 3º dígito). O padrão escolhido foi construído em granito preto e foi chamado de Côvado Real Egípcio. Todos os côvados de trabalho eram feitos em madeira e deviam ser comparados com o côvado de granito toda lua cheia. Quem não o fizesse podia ser punido com pena de morte (MSC, 2017).

De aqui em diante, o desenvolvimento dos padrões de medida foi evoluindo na mesma medida que a ciência e a tecnologia. Atualmente, a diversidade de medições que são realizadas cresceu exponencialmente, mas a necessidade de comparabilidade entre elas continua sendo de vital importância.

Em particular, as medições químicas têm grande importância porque estão relacionadas com quase todos os aspectos da nossa vida. O cuidado com a saúde, o resguardo da segurança pública e do meio ambiente estão baseados em decisões que dependem numa grande parte de medições químicas. Os países devem se preocupar com a qualidade e inocuidade dos alimentos para preservar a saúde da população e também devem garantir a qualidade das medições que determinam as propriedades dos produtos que exportam para evitar barreiras técnicas ao comércio (HIBBERT, 2007).

A comparabilidade dos resultados das medições é um requisito chave tanto para o comércio internacional, que requer que as medições necessárias para a certificação de produtos e a garantia da qualidade possam ser aceitas globalmente, quanto para a implementação de regulações ambientais internacionais. Se uma determinada propriedade

é medida num determinado material pelas duas partes envolvidas, estas devem ter confiança de que os resultados obtidos serão comparáveis, de acordo com as suas respectivas incertezas de medição (DE BIEVRE, 2011).

A necessidade de comparabilidade metrológica também é muito importante para as medições que têm que ser realizadas durante longos períodos de tempo, por exemplo, para estudos de monitoramento ambiental, nutricional ou toxicológico (IH NAT, 2000).

Um dos fatores mais importantes para garantir a comparabilidade e a rastreabilidade dos resultados das medições químicas é a utilização de materiais de referência, MR. Os sistemas de medição em química precisam ser calibrados de forma a assegurar a rastreabilidade metrológica dos resultados das medições. Na prática geralmente isso se consegue usando como calibradores materiais de referência de matriz similar com a amostra em estudo. Quando se realiza uma medição química de uma amostra real, deve-se comparar o resultado obtido, com um valor designado de um material conhecido, o material de referência, MR. Os valores das propriedades (geralmente a concentração do composto químico de interesse) nos materiais de referência são suficientemente homogêneos e bem estabelecidos. Portanto, desta forma, é possível a identificação e quantificação da substância de interesse. No Capítulo 2 se trata com maior detalhe as características do sistema metrológico e o papel que os MR têm dentro dele.

MR também são utilizados em outras etapas dos processos necessários para garantir a qualidade das medições, tais como a validação de métodos analíticos, estimativa de incertezas de medição, treinamento de pessoal, em estudos interlaboratoriais e testes de proficiência e nos controles internos de qualidade que utilizem controle estatístico de processo com gráficos de controle (MAGNUSSON e ÖRNEMARK, 2014; ELLISON, 2003; ISO, 2015a).

Na hora da escolha de um MR há vários aspectos a se levar em conta. O MR deve ser o mais semelhante possível (em matriz e nível de concentração) com a amostra a ser analisada para que abarque todos os problemas analíticos que possam causar erros nas medições (ISO, 2006). Também se deve considerar a homogeneidade, a estabilidade e a incerteza dos valores das propriedades de interesse. A utilidade de um MR vai depender de cada processo analítico em particular, e o usuário deve decidir que aspectos são os mais importantes a levar em conta. Por exemplo, para alguns casos onde o efeito matriz seja muito significativo, pode ser mais importante utilizar um material de exatamente a mesma

matriz que as amostras, mas com uma incerteza mais alta nos valores das propriedades (ISO, 2015a).

Principalmente, na área de análises de alimentos, os efeitos matriz são muito importantes. Denomina-se efeito matriz a variação no sinal do analito em estudo devido a outros constituintes na amostra, diferentes desse analito. Essas variações podem ser devidas à forma em que o analito está ligado aos constituintes da matriz, às outras substâncias presentes que afetem o sinal (interferências) ou às perdas que acontecem quando se realizam os pré-tratamentos necessários para separar o analito da matriz. (THOMPSON e STEPHEN, 2005).

Face ao exposto, fica evidente a enorme importância dos MR na garantia da qualidade dos resultados analíticos, porém seu uso ainda está longe de estar difundido nos laboratórios de ensaios rotineiros. Em alguns casos isto se deve a que o preço dos MR é elevado devido à complexidade do preparo e caracterização e, em muitos outros, se deve a dificuldades e restrições na importação de tais materiais. Por outro lado, muitas vezes não é possível dispor de um MR de matriz semelhante à das amostras em estudo ou com níveis de concentração similares.

Por todos estes fatores, seria de vital importância poder contar com MR produzidos localmente, o que permitiria obter matrizes de interesse regional e, por outro lado, diminuiria seu preço.

A produção de MR na região da América do Sul é ainda incipiente, sobretudo em matrizes complexas, como podem ser as de origem biológica (COMAR, 2017). Isso se deve principalmente à dificuldade do preparo e caracterização dos MR e à impossibilidade, em muitos casos, de assegurar a rastreabilidade das propriedades medidas.

Contribuições muito importantes na área dos MR no Brasil têm sido realizadas pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, INMETRO, que produz MR em: etanol em água; etanol combustível; benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno em metanol; monóxido de carbono em nitrogênio; metano em ar sintético; soluções de condutividade electrolítica; tampões e soluções multielementares de ânions e metais em água, entre outros (COMAR, 2017; INMETRO, 2017).

Outros aportes muito importantes são os do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, IPT, na área de MR de materiais siderúrgicos (ligas metálicas e materiais não ferrosos) e para o segmento da indústria do petróleo (IPT, 2017) e os do

Centro de Tecnologia Mineral, CETEM, na área dos minerais (bauxita e concentrados de sulfetos de cobre) (CETEM, 2017).

O IPEN-CNEN/SP possui muita experiência e tem realizado numerosas atividades na área dos MR. Trabalhou na preparação de materiais de referência isotópicos de urânio (OLIVEIRA JUNIOR, 2006) e com várias matrizes animais tais como: fígado bovino, mexilhão *Perna perna* e tecido de peixe, dando como resultado vários trabalhos publicados (MAIHARA et al., 2003; MOREIRA et al, 2009, 2010a, 2010b, 2010c) e teses de mestrado e doutorado (MOREIRA, 2010; SANTANA, 2013; ULRICH, 2011), além da disponibilização de tais materiais para o uso específico das áreas para as quais foram preparados.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA, também tem uma presença importante na área dos MRs para o setor agropecuário. Tem preparado MRs de *Brachiaria brizantha* cv Marandu, de suplemento mineral para bovinos, solo arenoso, fígado bovino e fosfato de rocha (BIANCHI et al., 2016; EMBRAPA, 2017a).

O Centro de Energia Nuclear na Agricultura, CENA, da Universidade de São Paulo tem desenvolvido um MR de cana de açúcar (VEGA MARTINEZ, 2016) e tem realizado trabalhos em outras matrizes como farinha de arroz (KATO et al., 2013), tomate (MARTINEZ et al., 2012), leite em pó (DOS SANTOS, 2014) e feijão (KATO, 2014).

O Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia tem um grupo de pesquisa trabalhando no desenvolvimento de MRs. Este grupo tem trabalhos publicados em matrizes de folhas de soja (DOS SANTOS et al, 2011), farinha de trigo (LIMA et al, 2010) e farinha de milho (DOS SANTOS et al, 2017).

Por último, existem dois trabalhos publicados sobre estudos de viabilidade da preparação e otimização de técnicas de medição de um material de referência para arsênio em tecido de peixe realizados pelo Instituto de Química da USP, em colaboração com o Centro de Ciências Naturais e Humanas da Universidade Federal do ABC (CARIONI et al., 2011, 2014).

Como pode ser observado, a disponibilidade de MR de produtos alimentícios é escassa tendo em conta a grande variedade de matrizes existentes. Por outro lado, em muitas ocasiões os MR preparados pelos grupos de trabalho, principalmente nas universidades e institutos de pesquisa, não tem uma distribuição ampla, e muitas vezes não podem ser adquiridos por laboratórios de campo ou da indústria. Esta falta de materiais de

referência afeta o campo de produção e consumo de alimentos, onde uma grande quantidade de medições químicas é realizada. Em particular, as análises de produtos cárneos são muito relevantes no Brasil, principal país exportador de carne bovina no mundo. Por outro lado, o consumo de carne bovina per capita no Brasil ocupa o segundo lugar na região sul-americana (FAO, 2017). Portanto, é necessário um aumento na quantidade de materiais de referência produzidos localmente com matriz de carne, para garantir a qualidade e inocuidade dos produtos que se consomem no mercado interno, para apoiar a indústria nacional e também para facilitar as operações comerciais na região. No Capítulo 3 trata-se mais extensamente a importância regional dos produtos de origem carne.

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi a preparação de um novo material de referência de rim bovino que fosse de utilidade para os laboratórios da região, principalmente do Brasil e da Argentina.

Dado que o uso pretendido do material de referência é o controle de qualidade de produtos cárneos, alguns elementos com relevância nutricional ou que poderiam constituir contaminantes alimentares potenciais foram escolhidos para serem determinados. Os elementos selecionados para o presente estudo foram As, Cd, Cl, Co, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Na, Pb, Se e Zn. Na seleção desses elementos, foram também levadas em consideração as regulamentações de rotulagem nutricional de alimentos de vários países da América do Sul, nos quais alguns elementos devem aparecer obrigatoriamente (por exemplo, Na e Fe) e outros são geralmente incorporados como informação adicional à população (Cl, Mg, Se e Zn).

Decidiu-se trabalhar com rim bovino devido a que muitos elementos se concentram neste órgão, permitindo obter um material de referência com teores mais altos de alguns dos compostos de interesse. No Capítulo 3 é apresentada a justificativa da escolha da matriz e dos analitos.

Para que um MR seja aceito internacionalmente como tal, deve estar preparado e certificado seguindo as recomendações dos Guias da série 30 da Organização Internacional para Padronização, ISO, que descrevem todas as etapas da preparação do material e dão diretrizes de qualidades para garantir a competência do produtor (ISO, 2006, 2015a, 2015b, 2015c, 2016). Por este motivo seguiram-se as diretrizes sugeridas nestes normas.

A capacitação para o preparo e certificação de um MR de rim bovino no Brasil, para garantir a qualidade das medições feitas nos alimentos de origem cárnea, tanto do ponto de vista do aspecto nutricional quanto da inocuidade, é um passo importante no desenvolvimento metrológico nacional.

Para um melhor entendimento este trabalho foi estruturado em sete capítulos.

O presente texto corresponde ao Capítulo 1.

O Capítulo 2 apresenta a organização internacional da metrologia e o papel que cumprem os MR dentro da pirâmide metrológica. Também se detalham algumas considerações importantes a serem levadas em conta na preparação de um MR.

O Capítulo 3 trata sobre a importância comercial e nutricional dos produtos cárneos na região sul-americana. Também é apresentada a justificativa na escolha da matriz do candidato a MR e dos analitos escolhidos para a certificação.

O Capítulo 4 trata brevemente dos fundamentos das técnicas analíticas aplicadas no trabalho, fazendo foco em Análise por Ativação Neutrônica Instrumental, principal técnica utilizada no Laboratório de Análise por Ativação, LAN, do IPEN. Também são apresentados os princípios básicos das técnicas estatísticas multivariadas utilizadas nas avaliações realizadas no processo de caracterização do material.

O Capítulo 5 apresenta a parte experimental deste trabalho. Contém a descrição detalhada da etapa de preparação do material de referência e da metodologia empregada na aplicação das técnicas analíticas utilizadas.

No Capítulo 6 são apresentados e discutidos os resultados obtidos nas etapas de preparação, caracterização e certificação do material, bem como o tratamento estatístico aplicado em cada caso.

Finalmente no Capítulo 7, são apresentadas as conclusões do trabalho, retomando os principais resultados e discutindo brevemente futuros desenvolvimento e melhorias.

2 PAPEL DOS MATERIAIS DE REFERÊNCIA NO SISTEMA METROLÓGICO

2.1 Organização internacional da metrologia

Para poder entender o papel dos materiais de referência na obtenção da comparabilidade das medições químicas é preciso conhecer como está organizado o sistema metrológico internacionalmente (BIPM, 2006).

Em 1875 teve lugar a Convenção do Metro e a criação do Bureau Internacional de Pesos e Medidas (BIPM). Em 1889 foi realizada a primeira Conferência Geral de Pesos e Medidas, na que se resolveu realizar réplicas do metro padrão para reparti-las entre os laboratórios dos países que assinaram a Convenção do Metro.

A partir da Convenção do Metro, a metrologia internacional se organizou segundo o esquema apresentado na Figura 2.1

Figura 2.1 – Organização internacional da metrologia.

Os comitês consultivos atuam em áreas específicas, relacionadas às magnitudes do Sistema de Unidades, SI, como a redefinição de unidades e a avaliação de resultados de intercomparações. Os comitês consultivos são listados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Comitês consultivos do CIPM

Comitê Consultivo de Quantidade de Matéria, CCQM.

Comitê Consultivo de Radiações Ionizantes, CCRI.

Comitê Consultivo de Eletricidade e Magnetismo, CCEM.

Comitê Consultivo de Fotometria e Radiometria, CCPR.

Comitê Consultivo de Comprimento, CCL.

Comitê Consultivo de Tempo e Frequência, CCTF.

Comitê Consultivo de Termometria, CCT.

Comitê Consultivo de Unidades, CCU.

Comitê Consultivo de Massa, CCM.

O Comitê Consultivo de Quantidade de Matéria (CCQM) foi um dos últimos a ser criado, e seu objetivo, formulado em 1995, é o de “estabelecer a rastreabilidade internacional, preferentemente ao SI, na área das medições em química e a melhora na exatidão das medições químicas”(KAARLS, 2007).

Antigamente, a equivalência dos padrões a nível global era determinada através da participação dos Institutos Nacionais de Metrologia (NMI) em acordos bilaterais ou multilaterais entre organizações regionais de metrologia (RMO). A partir de 1999, no entanto, foi assinado um Acordo de Reconhecimento Mútuo (MRA) de padrões nacionais de medição e de Capacidades de Calibração e Medição (CMC) emitidas pelos institutos nacionais de metrologia sob o controle do Comitê Internacional de Pesos e Medidas (CIPM), e coordenado pelo BIPM. Os principais objetivos do MRA são:

- estabelecer o grau de equivalência dos padrões nacionais de medição mantidos pelos NMI;
- prever o reconhecimento mútuo das capacidades de calibração e medição emitidas pelos NMI;
- proporcionar aos governos e outras partes uma base técnica segura para acordos mais amplos relacionados com o comércio e com regulamentações internacionais.

Para a demonstração da equivalência dos padrões nacionais mantidos pelos distintos laboratórios nacionais de metrologia é necessário realizar intercomparações. Na escala global estas são organizadas exclusivamente pelos comitês consultivos do CIPM, e na escala regional são organizadas pelos organismos regionais de metrologia, apresentados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Organismos regionais de metrologia

Cooperação Metrológica do Asia-Pacífico, APMP
Cooperação Metrológica entre países centro-europeus, COOMET.
Colaboração Européia em Padrões de Medida, EUROMET.
Comunidade Sul Africana de Cooperação para o Desenvolvimento da Rastreabilidade das Medições, SADCMET.
Sistema Interamericano de Metrologia, SIM.

Esta atividade está representada na Figura 2.2, onde os círculos azuis representam os laboratórios nacionais que contam com a capacidade metrológica necessária para participar diretamente das intercomparações organizadas pelo BIPM, e que a sua vez, atuam como laboratórios piloto nas intercomparações regionais, nas que participam os laboratórios da região, representados com círculos amarelos.

Figura 2.2 – Intercomparações chave para estabelecer a comparabilidade internacional.

Fonte: Adaptado do BIPM (2017)

Na página web do BIPM (www.bipm.org) podem ser consultados os apêndices do MRA que, entre outras coisas, especificam as Capacidades de Medição e Calibração e as incertezas nas que cada Instituto que participa no acordo é reconhecido. Também podem ser consultados os resultados das intercomparações que suportam essas capacidades. A consequência prática do MRA é que os institutos participantes reconhecem a validade dos certificados de calibração e medição emitidos por outros institutos participantes para as quantidades, intervalos e incertezas especificadas no apêndice MRA.

2.2. Rastreabilidade metrológica

Dentro de cada país, cada NMI tem a obrigação de disseminar os valores de referência das medições através de uma cadeia de comparações, partindo do Padrão Primário Nacional até chegar aos laboratórios de campo, passando pelos laboratórios de calibração e ensaio. Cada passo nesta cadeia consiste numa calibração em que um instrumento, ou material de referência, é comparado com um padrão mais elevado com

uma precisão conhecida. O Vocabulário Internacional de Metrologia, VIM, define calibração como a “operação que, sob condições especificadas estabelece, numa primeira etapa, uma relação entre os valores (e as incertezas associadas) obtidos a partir de padrões de medição e as indicações correspondentes (com suas incertezas associadas) e, em uma segunda etapa, usa esta informação para obter um resultado de medição a partir de uma indicação” (JCGM, 2012).

O resultado de cada calibração na cadeia é um valor para o desvio do instrumento, ou para o material de referência, com uma determinada incerteza de medição.

Na Figura 2.3 esta representada esta cadeia de comparações.

Figura 2.3 – Pirâmide de rastreabilidade

Cada resultado obtido através desta cadeia de medição pode ser rastreado de volta ao padrão nacional e pode ser comparado com outros valores de medição que fazem parte da mesma infraestrutura de medição nacional. Portanto se define a rastreabilidade metrológica como a “propriedade de um resultado pela qual este pode ser relacionado a uma referência por meio de uma cadeia ininterrupta e documentada de comparações, cada uma com sua contribuição à incerteza de medição”. A referência pode ser a definição de uma unidade de medida, um procedimento de medição ou um padrão de medição (por exemplo, um material de referência ou uma solução de calibração) (JCGM, 2012).

Este conceito funciona bem para medições físicas, como comprimento, massa ou temperatura. Nas medições químicas, o conceito de rastreabilidade ainda leva a confusões apesar de ter sido amplamente discutido nos últimos anos. Ainda é comum encontrar materiais de referência que carecem da informação da rastreabilidade metrológica dos valores de concentração e incerteza. Apesar de a rastreabilidade ser definida como uma propriedade do resultado de uma medição, é habitual que o termo seja usado para se referir a rastreabilidade de documentos ou amostras. Por outro lado também é comum que laboratórios declarem rastreabilidade a uma determinada Instituição (por exemplo, a um Instituto Nacional de Metrologia) ou a determinado material de referência, em lugar de declarar rastreabilidade ao SI (DE BIEVRE, 2011). Para evitar essas situações, é importante destacar a importância da rastreabilidade e lembrar sua definição sempre que possível.

Entre os diversos aspectos que afetam a confiabilidade de um resultado de medição, a obtenção de rastreabilidade metrológica é essencial, já que é a única forma de assegurar a comparabilidade dos resultados das medições. A comparabilidade é alcançada quando diferentes resultados são rastreáveis à mesma referência metrológica, mesmo se os calibradores ou sistemas de medição ou incertezas relativas de medição forem diferentes. A rastreabilidade é a prova da veracidade e da confiabilidade de um resultado analítico, mas só é válida quando associada com uma incerteza de medição (ZSCHUNKE, 2000a).

Um material de referência é um “material, suficientemente homogêneo e estável em relação a uma ou mais propriedades específicas, que é estabelecido como apto para o seu uso em um processo de medição”. Quando os valores das propriedades do MR são rastreáveis a um valor exato da unidade SI, têm valores de incerteza para um nível de confiança estabelecido e estão acompanhados por documentação emitida por uma entidade reconhecida, o MR é denominado material de referência certificado, MRC (JCGM, 2012).

Em qualquer processo de medição, um determinado material de referência pode ser utilizado como calibrador ou como material para controlar a veracidade da medição, mas não pode cumprir as duas funções ao mesmo tempo. Só no caso de que o material de referência for utilizado para a calibração, ou para corrigir a calibração, estabelece a rastreabilidade da medição. O material de referência deve ser o ponto final da cadeia de rastreabilidade, nos laboratórios usuários. Todo material de referência deve ser rastreável a uma referência estabelecida, independentemente do uso pretendido do material, mas é o usuário quem define qual é o nível de incerteza apropriado para cada

processo analítico em particular e, por tanto, qual é o material adequado para o seu processo de medição (ZSCHUNKE, 2000a).

2.3 Algumas considerações na preparação de materiais de referência

Existem muitos fatores a serem levados em consideração na concepção, desenvolvimento, preparação, caracterização e certificação de um MR. Cada um destes fatores terá grande impacto no MR produzido e determinará a sua aplicabilidade. De forma geral, pode-se dividir todo o processo de preparação dos MRs em três grandes etapas, a primeira etapa de coleta e preparação do material, a segunda, de caracterização química e física e a terceira, de certificação.

2.3.1 Coleta e preparação do material

A etapa de coleta e preparação do material refere-se a todos os passos físicos e químicos necessários para transformar o material de partida num MR. Começa com a escolha do tipo de material a ser utilizado. O material deve ser representativo ao uso para o qual será destinado. Deve conter a substâncias de interesse com a concentração adequada, na mesma forma química e ligadas à matriz da mesma forma. A matriz deve ser similar e conter as mesmas interferências (QUEVAUVILLER e MAIER, 1999). A melhor forma de conseguir a representatividade é escolher o mesmo tipo de material, com a mesma matriz que as amostras a serem analisada rotineiramente (WOLF e ANDREWS, 1995).

Os MRs são usados para garantir o bom funcionamento dos métodos analíticos e para calibrar os equipamentos necessários para realizar medições. Como já foi dito, ajudam a alcançar e demonstrar a comparabilidade entre métodos e laboratórios, e são uma forma de fazer uma ligação dos resultados das medições ao SI. Para fazer tudo isto, os MRs devem poder ser usados e circularem por um longo período de tempo, portanto, é preciso assegurar e determinar sua estabilidade. Por outro lado, como as medições químicas são em geral destrutivas, um MR deve ser produzido em quantidade adequada de forma tal que assegure sua utilidade. Todas as unidades de MRs preparados devem ser idênticas, assim é muito importante garantir a homogeneidade do material.

Todos os passos que fazem parte da preparação do material têm a finalidade de produzir materiais que sejam homogêneos e estáveis. Para conseguir este intuito é necessário realizar sucessivas etapas de moagem do material, para diminuir o tamanho das

partículas; peneiramento do material, para ir selecionando as partículas de tamanho adequado e reprocessar as partículas maiores, de forma tal a se obter um material de granulometria definida; secagem do material e esterilização, para assegurar a estabilidade química e microbiológica e possibilitar o processo de moagem e peneiramento; e homogeneização das diferentes porções tratadas. Todas estas etapas devem ser realizadas tomando os cuidados necessários para evitar as contaminações. Uma vez que o MR foi preparado é importante envasá-lo em condições adequadas e realizar algum processo de esterilização para garantir sua estabilidade (ISO, 2016; STOEPLER et al, 2001; QUEVAUVILLER e MAIER, 1999; ZSCHUNKE, 2000b).

Secagem do material

Para alcançar um MR com a estabilidade desejada, evitando mudanças biológicas, físicas e químicas, é indispensável a remoção da umidade do material. Os alimentos secos, com teor de umidade menor do que 5%, apresentam atividades de água menores que 0,6 o que resulta num baixo risco de crescimento bacteriano e de reações químicas (FELLOWS, 2017).

O método de preferência para realizar o dessecamento de materiais biológicos sem alterar suas propriedades é a liofilização. Na liofilização o material é congelado e introduzido em uma câmara de vácuo para realizar a separação da água por sublimação. Desta maneira a água passa do estado sólido, dentro do material, ao estado gasoso, no ambiente, sem passar pelo estado líquido. Como o processo é realizado a baixa temperatura a estrutura molecular da substância liofilizada é preservada, e consequentemente, suas propriedades nutricionais e organolépticas. Por outro lado, evita-se a volatilização de alguns componentes que pode acontecer no caso de se utilizar métodos de secagem com altas temperaturas.

Moagem e ajuste do tamanho de partícula

Os materiais sólidos podem estar compostos por diversas fases. A qualidade da dispersão destas fases entre si vai influir na homogeneidade do material. A homogeneidade vai depender principalmente do tamanho das partículas que constituem estas fases e da sua distribuição. Existem vários trabalhos que estudam a relação entre o tamanho de partícula e a homogeneidade dos MR (KOGLIN et al. 1997; KRAMER et al. 1995). Tem sido demonstrado que o tamanho de partícula do material é um dos fatores principais que afeta

a quantidade mínima de amostra para a qual os valores do material de referência continuam sendo representativos (FAJGELJ e ZEISLER, 1998).

O método clássico para obter um material com determinada granulometria é a passagem sequencial do material moído por peneiras com abertura de malha de tamanho decrescente.

Esterilização com radiação gama

As radiações ionizantes têm sido amplamente utilizadas para a esterilização e desinfecção de materiais em diversas áreas da indústria. Em particular, a técnica apresenta certas vantagens que fazem que seja de especial interesse na área de processamento de alimentos. A radiação consegue diminuir o conteúdo de micro-organismos relacionados com a degradação dos alimentos e os micro-organismos patógenos relacionados com doenças alimentares, sem introduzir nenhum tipo de contaminação adicional como ocorre quando são aplicados métodos de esterilização química. Por outro lado, à baixas doses, não se vêem afetadas as características organolépticas dos alimentos, como a textura ou a cor. Por último, a irradiação pode ser aplicada após o envase do material, o que elimina a possibilidade de contaminação posterior (FAN e SOMMERS, 2013; FARKAS, 1998). Estas características também fazem com que a irradiação seja o método de escolha na esterilização dos materiais de referência (IHNAT et al., 1987; KUČERA et al, 1995). Na irradiação de alimentos, as doses utilizadas para a irradiação dependem muito do tipo de alimento em particular e dos micro-organismos presentes. Existem muitos trabalhos que estudam a dose ideal para cada tipo de alimento (FARKAS, 1984, 1989, 1998, 2006; WHO, 1988, 1999). A escolha da dose é uma solução de compromisso entre o fato de que os micro-organismos devem ser eliminados (ou pelo menos inativados), mas sem alterar as características nutricionais e organolépticas dos alimentos, coisa que acontece a doses muito altas. Os materiais de referência podem ser irradiados com doses mais elevadas porque não existe este último problema, mas deve-se verificar que as propriedades certificadas não sejam afetadas pela radiação, como é o caso de alguns compostos orgânicos como as vitaminas, alguns carboidratos e os lípidos, principalmente os insaturados. As proteínas, porém, quase não são afetadas pela radiação (RAFFI e KISTER, 2008).

2.3.2 Caracterização química e física do material

A caracterização química e física do material também compreende diversos passos. Os principais são a avaliação da homogeneidade e da estabilidade do material, mas também existem outras propriedades relacionadas com estes aspectos e que são importantes determinar, como a distribuição do tamanho de partículas, a atividade microbiológica e a umidade residual do material.

A medição da atividade microbiológica é uma forma de verificar que o processo de esterilização foi exitoso.

A determinação do teor de umidade residual, além de estar relacionado com o crescimento microbiológico como já foi mencionado, está relacionado com outros aspectos relevantes. Devido ao caráter higroscópico dos MR biológicos liofilizados, e tendo em consideração que os valores de concentração atribuídos aos MR são geralmente expressados na base seca, a correta determinação do teor de umidade residual no material pode afetar os resultados e influir na incerteza da caracterização (ZEILLER, 2007).

Por último, a determinação da distribuição do tamanho de partículas no material é importante pela sua direta relação com a homogeneidade. Um material de referência que apresente um tamanho de partícula muito elevado não conseguirá atingir os requisitos necessários para seu uso nas técnicas analíticas atuais. Por outro lado, a presença de distribuições de tamanho de partícula muito afastadas da normalidade, como por exemplo, uma distribuição bimodal, invalida a certificação do material.

Avaliação da homogeneidade

A avaliação da homogeneidade do material é essencial para garantir o valor dos parâmetros certificados e suas incertezas. Em geral, se define uma homogeneidade intra-frasco e outra entre frascos. O objetivo do estudo da homogeneidade intra-frasco é verificar o processo de homogeneização e estimar a quantidade mínima de amostra a ser usada. O objetivo do estudo da homogeneidade entre frascos é verificar que a concentração dos parâmetros é estatisticamente equivalente para todos os frascos e, portanto, o MR é apropriado para ser utilizado como ferramenta para garantir a comparabilidade entre laboratórios (LINSINGER, 2001).

A homogeneidade entre frascos se verifica analisando a concentração dos analitos em alguns dos frascos preparados, escolhidos de forma aleatória durante o processo de envase.

A homogeneidade intra-frasco se verifica analisando a concentração dos analitos em diferentes sub amostras do mesmo frasco, em condições de repetibilidade.

As medições devem ser realizadas utilizando um método que permita analisar pouca quantidade das amostras, com boa precisão e baixa incerteza. Neste trabalho foi utilizada a Análise por Ativação Neutrônica, NAA, que é considerada uma técnica de referência para a avaliação do grau de homogeneidade de MRs (ROSSBACH e GROBECKER, 1999; STOEPLER et al., 2001) devido às suas características intrínsecas, como alta sensibilidade, precisão e exatidão (GREENBERG et al., 2011). Além disso, trata-se de uma técnica direta, que não requer nenhum pré-tratamento das amostras e, por esse motivo, possíveis contaminações e perdas do material de ensaio são minimizadas, não influenciando na variabilidade dos ensaios.

Os resultados de ambos testes devem ser analisados usando procedimentos estatísticos para assegurar que não existem diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes porções analisadas. Tipicamente é realizada uma análise de variância, ANOVA, tal como está descrito no ISO Guia 35 (ISO, 2006). A partir da ANOVA também pode se estimar a componente da incerteza final devida à homogeneidade (VAN DER VEEN et al., 2000, 2001a).

No presente trabalho foram utilizadas também técnicas multivariadas como Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamentos Hierárquica (HCA), que podem complementar a tradicional análise univariada (CASTRO et al, 2017). Os princípios básicos destas técnicas são descritos no Capítulo 4.

Apesar da sua utilidade, não há muitos precedentes na utilização dessas técnicas estatísticas na avaliação da homogeneidade de materiais de referência. Algumas exceções são os estudos realizados em farinha de milho e trigo (LIMA et al., 2010; DOS SANTOS et al., 2015) e em produtos farmacêuticos pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (CARVALHO ROCHA et al., 2011, 2013).

Outro dos fatores importantes que devem ser determinados na avaliação da homogeneidade é a mínima quantidade de amostras para a qual o MR continua sendo homogêneo, ou seja, que os valores de concentração e incerteza presentes no certificado continuam sendo válidos.

Em geral, os produtores de MR estabelecem uma massa mínima de 200 mg, estimativa realizada de um modo conservador e que resulta de utilidade para os métodos

analíticos clássicos que utilizam massas de amostra maiores que esse valor. A partir do desenvolvimento de técnicas analíticas que utilizam menor quantidade de amostra tornou-se cada vez mais importante poder estimar claramente qual é a massa mínima real.

Para se obter uma estimativa da quantidade mínima de amostra do MR preparado, neste trabalho realizaram-se ensaios para determinar a constante de Kurfurst, parâmetro utilizado por vários autores para esse fim (KURFURST et al., 1993; ROSSBACH e GROBECKER, 1999; SONNTAG e ROSSBACH, 1997).

Avaliação de estabilidade

Nos ensaios de estabilidade se simulam as condições ambientais às quais os MRs vão estar expostos durante seu transporte e armazenamento, para verificar se existe degradação significativa dos analitos ou da matriz. Em geral se baseiam na medição dos analitos em diferentes unidades do MR que foram expostas a diferentes temperaturas durante diferentes tempos.

Dividem-se em: ensaios de estabilidade de curto prazo e de longo prazo. Os ensaios de curto prazo servem para decidir se o material é suficientemente estável para se tornar um MR e para determinar as condições nas quais deverão ser transportados aos usuários (LAMBERTY et al., 1998; LINSINGER et al., 2001a). Normalmente são realizados durante um período curto de tempo (até oito semanas) e os MR são expostos as máximas temperaturas as quais se estima que pudessem estar expostos durante o transporte. Da avaliação dos resultados podem ser escolhidas as condições adequadas para realizar o transporte de forma tal que a instabilidade seja desprezível.

Os ensaios de longo prazo são utilizados para definir a vida útil do material. São realizados por um período de tempo maior, de até dois anos (PAUWELS et al, 1998) na temperatura de armazenamento do MR.

Nos dois ensaios deve ser analisada a existência de tendências temporais nas diferentes temperaturas de trabalho utilizando análise de regressão. Na ausência de tendências as medições podem ser analisadas por ANOVA (VAN DER VEEN et al., 2001b).

Para diminuir a variabilidade analítica introduzida por realizar as medições durante um longo período de tempo, neste trabalho decidiu-se fazer um modelo de estudo do tipo isócrono (LINSINGER et al, 2004; LAMBERTY et al, 1998) no qual todos os

frascos envolvidos no estudo são analisados ao mesmo tempo, em condições de repetibilidade ao finalizar o ensaio.

Da mesma forma que nos ensaios de homogeneidade foram utilizadas técnicas de análise multivariada para complementar o estudo. Só existe um antecedente na literatura sobre a utilização destas técnicas para avaliar a estabilidade de materiais de referência (SAREMBAUD et al., 2007).

2.3.3 Certificação do MR

No contexto deste trabalho se denomina como certificação a atribuição de valor às propriedades de interesse no MR com suas respectivas incertezas associadas.

Existem diferentes enfoques na certificação dos MRs, todos dirigidos a se obter a melhor estimativa possível do valor verdadeiro do analito de interesse. Estes enfoques podem ser divididos em dois grupos: o enfoque do laboratório único e o enfoque do ensaio interlaboratorial (QUEVAUVILLER e MAIER, 1999).

A abordagem do laboratório único baseia-se em utilizar os dados analíticos de um só laboratório para atribuir os valores às propriedades. Para poder fazer isto, as medições devem ser feitas utilizando um método definitivo, ou primário, com a confirmação dos valores por outro método independente. A rastreabilidade do MR está diretamente relacionada ao SI através da rastreabilidade do método utilizado. No caso de não existir ou não ser possível realizar um método primário, podem ser aplicados vários métodos de referência, realizados em forma independente (INHAT, 1998).

No ano 2007, o método de Análise por Ativação Neutrônica, NAA, utilizado neste trabalho, foi declarado como potencial método primário pelo Comitê Consultivo para a Quantidade de Matéria, CCQM, do Bureau Internacional de Pesos e Medidas, BIPM (CCQM, 2007), o que implica que se trata de um método adequado para ser usado na certificação de MR.

O enfoque do ensaio interlaboratorial é um enfoque estatístico, onde o valor atribuído às propriedades analisadas surge do tratamento dos dados dos participantes, utilizando ferramentas estatísticas adequadas. Os ensaios interlaboratoriais para certificação são organizados seguindo-se os mesmos princípios que outros ensaios interlaboratoriais, mas os participantes devem ser laboratórios especializados cuja

habilidade esteja garantida. Para garantir a rastreabilidade do MR certificado sob esse enfoque cada resultado envolvido no cálculo deve ser rastreável ao SI.

A incerteza associada aos valores certificados é calculada combinando as componentes de incerteza de cada etapa do processo de caracterização, o seja, uma componente devida à homogeneidade do MR, uma devida à estabilidade de longo prazo, outra à estabilidade de curto prazo e finalmente a componente relacionada ao processo de atribuição de valor (LINSINGER et al., 2001).

3 ALIMENTOS DE ORIGEM CÁRNEA.

3.1 Importância nutricional e comercial na região

Os alimentos de origem animal, particularmente os de origem cárnea, devem ser parte de uma dieta equilibrada, já que aportam valiosos nutrientes benéficos para a saúde. Estes alimentos têm alta densidade energética e são excelentes fontes de proteínas de alta qualidade, têm ferro e zinco facilmente disponíveis, vitaminas B6, B12, B2 e vitamina A (no fígado). Também aumentam a absorção de ferro e zinco provenientes de alimentos de origem vegetal. Existem evidências de fortes associações entre a ingestão de alimentos de origem animal e melhor desenvolvimento físico e cognitivo em crianças (FAO, 2013). Apesar destes benefícios, também existem riscos no consumo de carnes, especialmente nas carnes vermelhas, já que seu conteúdo de ácidos graxos, colesterol e outras substâncias podem contribuir no aparecimento de doenças cardiovasculares e alguns tipos de cânceres (WHO, 2003; MATOS e BRANDANI, 2002).

A média de consumo mundial de produtos cárneos é 43,2 kg por pessoa por ano. Obviamente o consumo é muito variável nos diferentes países, dependendo de uma grande variedade de fatores, como o grau de desenvolvimento, a facilidade de acesso aos produtos, além de fatores culturais, religiosos, etc. Na Tabela 3.1 e na Figura 3.1 é apresentado o consumo dos países da América do Sul, pesquisados durante o ano de 2013 (FAO, 2017).

Tabela 3.1 – Consumo de carne per capita na América do Sul

Consumo de carne (kg/pessoa/ano) Ano 2013				
País	TOTAL	Bovinos	Suínos	Outros
Argentina	107,2	55,48	10,5	41,2
Bolívia	66,4	19,78	8,9	37,7
Brasil	97,6	39,25	12,6	45,8
Chile	85,7	23,86	24,7	37,1
Colômbia	50,8	16,36	6,5	27,9
Equador	54,0	16,61	14,4	23,0
Guiana	43,8	3,22	3,4	37,2
Paraguai	53,6	19,81	26,2	7,6
Peru	22,5	4,69	3,8	14,0
Suriname	56,1	9,73	10,2	36,1
Uruguai	82,3	29,1	16,8	36,4
Venezuela	72,8	25,89	7,2	39,7

Figura 3.1 – Representação gráfica do consumo total de carne por pessoa por ano nos países da América do Sul. A linha vermelha representa a média de consumo mundial

Na Figura 3.1 pode-se ver que Brasil e Argentina têm o maior consumo de carne por pessoa da região, principalmente a de origem bovina, e que o consumo nestes dois países é mais do dobro da média mundial.

Para atender à demanda interna e de exportação, a produção de carne no Brasil tem aumentado sistematicamente nos últimos 20 anos. Na Figura 3.2 pode ser observada esta tendência.

Figura 3.2 – Evolução anual do abate de bovinos e suínos no Brasil entre 1997 e 2016

Fonte: IBGE (2017)

Do total da carne produzida, destina-se aproximadamente 80 % para consumo interno e o restante para exportação. (SECEX, 2017). A participação brasileira no comércio internacional também vem crescendo anualmente. Segundo o Ministério da Agricultura, até 2020, a expectativa é que a produção nacional de carnes suprirá 44,5% do mercado mundial (MAPA, 2017).

Na Argentina, atualmente 90 % da carne produzida é destinada ao consumo interno. A seguir se mostra uma tabela com os dados de abate, consumo e exportação na Argentina para o ano 2015 (INDEC, 2017).

Tabela 3.2 – Dados econômicos da pecuária Argentina no ano 2015

Ano 2015	
Número de cabeças abatidas	
Bovinos	12.156.600
Suínos	5.523.715
Ovinos	3.155.631
Toneladas exportadas	
Bovinos	198.723
Suínos	1.417
Ovinos	1.559
Toneladas para consumo interno	
Bovinos	2.528.000
Suínos	482.000
Ovinos	56.000

Dos dados mostrados, fica evidente que os alimentos de origem cárnea têm uma relevância muito importante nestes dois países, por um lado no desenvolvimento econômico das diferentes regiões produtoras e por outro se constituindo como uma das fontes de proteínas e nutrientes mais importantes para a população. Isso traz a necessidade de se realizarem diversas medições químicas, seja para atender às estritas normas de exportação ou as regulamentações locais para o controle de qualidade e segurança alimentar dos produtos.

3.2 Medições químicas necessárias para assegurar a inocuidade dos produtos cárneos e sua qualidade nutricional.

Tanto no comércio nacional quanto no internacional dos produtos cárneos, e no consumo destes produtos pela população, é de vital importância assegurar sua inocuidade.

Além dos estudos microbiológicos e de doenças características de cada tipo de animal, é preciso determinar uma grande quantidade de substâncias nos alimentos de origem cárnea, que podem ter consequências nocivas para a saúde humana. Estas substâncias podem estar presentes, acidental ou deliberadamente, na matéria prima (drogas veterinárias, promotores de crescimento, antibióticos, contaminantes ambientais, etc.) ou

aparecer no processamento posterior da mesma (N-nitrosaminas, aminas heterocíclicas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, etc.) (TOLDRA e REIG, 2012). Os contaminantes ambientais constituem um problema muito grande, que afeta toda a cadeia alimentar. Estes contaminantes podem estar presentes no solo, na água e nos alimentos que os animais consomem e, desta forma, ingressam na cadeia alimentar, e podem se acumular nos corpos tanto dos animais quanto dos humanos, causando efeitos de longo prazo. Existem muitos tipos de contaminantes ambientais que afetam os alimentos de origem cárnea. Os mais relevantes são as dioxinas, os pesticidas organofosforados e organoclorados, e os elementos químicos potencialmente tóxicos.

No caso dos elementos químicos potencialmente tóxicos, os de maior interesse são: o cádmio, por causa de seus efeitos nocivos sobre os rins e pulmões; o mercúrio orgânico, que tem efeitos nocivos sobre o cérebro, produz anemia e complicações gastrointestinais; o arsênio, que pode ser carcinogênico; e o chumbo, que afeta os rins, e os sistemas imune e reprodutivo. (TOLDRA e REIG, 2012). Devido à grande quantidade de efeitos destes metais para a saúde, organizações internacionais, tais como a Comissão da União Europeia e a Comissão do Codex Alimentarius, estabeleceram normas padronizadas com limites permitidos destes compostos nos alimentos, para melhorar a saúde da população mundial e facilitar o comércio internacional (FAO/WHO, 2016; EC, 2006). Na Tabela 3.3 são apresentados os limites estabelecidos pela Comunidade Europeia e o Codex Alimentarius para metais em produtos cárneos. Como pode ser observado, para carnes vermelhas só se especificam limites para Pb e Cd. Por outro lado, o Hg só está regulamentado para carne de peixe.

Tabela 3.3 – Limites estabelecidos pela Comunidade Europeia para os elementos Cd, Hg e Pb, expressos em mg kg^{-1} de carnes in natura

	Cd	Hg	Pb
Carne (sem osso) de bovinos, ovinos, suínos e aves	0,05	-	0,1
Fígado de bovinos, ovinos, suínos, aves e equinos	0,5	-	0,5
Rim de bovinos, ovinos, suínos, aves e equinos	1,0	-	0,5
Peixe	0,05 a 0,3 ^a	0,5 a 0,3 ^a	0,3

^a O limite depende da espécie de peixe

Além destas regulações internacionais, cada país possui sua própria legislação que regula os produtos para o mercado interno. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, e na Argentina, a Administração Nacional de Medicamentos, Alimentos e Tecnologia Médica, ANMAT, adotaram os limites estabelecidos no Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos (ANMAT, 2012; ANVISA, 2013). Este Regulamento contém os mesmo limites que a regulamentação europeia, mas incorpora o elemento As e concentrações limites para Pb em fígado e rins. Na Tabela 3.4 são apresentados estes limites.

Tabela 3.4 – Limites estabelecidos pela ANVISA para os elementos As, Cd e Pb, expressos em mg kg^{-1} de carne in natura

	As	Cd	Hg	Pb
Carne (sem osso) de bovinos, ovinos, suínos e aves	0,5	0,05	-	0,1
Fígado de bovinos, ovinos, suínos, aves e equinos	1,0	0,5	-	0,5
Rim de bovinos, ovinos, suínos, aves e equinos	1,0	1,0	-	0,5
Peixe	1,0	0,05 a 0,3 ^a	0,5 a 0,3 ^a	0,3

^a O limite depende da espécie de peixe

Apesar de que o As, Cd, Hg e Pb são os elementos para os quais os limites estão mais estendidos globalmente, existem alguns países que tem legislação para outros elementos. Como exemplo na Tabela 3.5 figuram os limites estabelecidos para Cu e Zn em diversos países (levantamento feito por NRIAGU et al., 2009).

Tabela 3.5 – Limites máximos estabelecidos em vários países para os elementos Cu e Zn, expressados em mg kg^{-1} de carne in natura

	Fígado bovino	Rim bovino	País
Cobre	100	100	Estados Unidos de América
	100	100	Austrália
	150	150	Canadá
	60	600	Republica Eslovaca
Zinco	500	500	Estados Unidos de América
	500	500	Austrália
	150	150	Canadá
	80	80	República Eslovaca
	60	60	Rússia

Em relação à qualidade nutricional dos alimentos de origem cárnea, há vários aspectos a serem levados em conta. O crescente interesse da população no conteúdo dos alimentos que consomem faz com que os produtores precisem fornecer a informação nutricional dos alimentos que produzem, já que isso implica numa vantagem comercial. Por outro lado, cada vez mais países começaram a implementar regulações para a rotulagem nutricional dos alimentos, pelo qual a rotulagem é um dos passos necessários para a exportação. No Brasil, existe uma grande quantidade de regulamentações a respeito (ANVISA, 2015). No ano de 2001, a rotulagem nutricional se tornou obrigatória para todos os alimentos pré-embalados. No ano de 2003, com o fim de facilitar o comércio regional, a regulamentação de rotulagem obrigatória se harmonizou no MERCOSUL (Argentina, Brasil, Uruguai e Paraguai) (MERCOSUR, 2003), ampliando-se no ano de 2012 para incluir informação nutricional complementar (MERCOSUR, 2012). Na Argentina a rotulagem é obrigatória desde o ano 2006 (ANMAT, 2006).

Para a rotulagem nutricional da carne é preciso determinar sua composição. O constituinte majoritário da carne de todas as espécies animais é a água, que varia entre 68 e 76%. O segundo componente majoritário é a proteína, com uma concentração que pode variar desde 13 a 23%, dependendo do corte e da espécie animal. O terceiro macronutriente é a gordura, que tem uma variação muito grande, dependendo do corte e da espécie animal. O valor médio para a gordura nos cortes normalmente vendidos para consumo é aproximadamente 10%. Além destes componentes majoritários, os alimentos cárneos também contêm colesterol, alguns minerais, e diferentes concentrações de várias vitaminas. Na Tabela 3.6 se mostra como exemplo, a composição nutricional da carne

bovina, suína e do rim bovino (HONIKEL, 2009; NOLLET e TOLDRÁ, 2011). Os parâmetros marcados na cor cinza têm caráter de obrigatórios nas regulações de rotulagem na maioria dos países.

Tabela 3.6 – Dados de composição nutricional aproximada da carne magra de diferentes origens e de rim bovino in natura.

Composição nutricional aproximada			
	Carne suína	Carne bovina	Rim bovino
Proteína, %	22	22	20
Gordura total, %	1,9	1,9	5
Colesterol, mg/100g	45	50	285
Tiamina (B1), mg/100g	0,9	0,06	0,3
Riboflavina (B2), mg/100g	0,23	0,26	0,4
Niacina, mg/100g	6,9	5	7
Piridoxina (B6), mg/100g	0,6	0,24	0,45
Ac. Pantotênico, mg/100g	0,7	0,31	3,4
Biotina, mg/100g	0,005	0,003	0,06
Cobalamina (B12), mg/100g	0,002	0,003	0,03
Vitamina D, mg/100g	0,0005	0,0005	0,001
Sódio (Na), mg/100g	69	66	180
Potássio (K), mg/100g	397	358	230
Fósforo (P), mg/100g	192	190	230
Magnésio (Mg), mg/100g	26	23	17
Ferro (Fe), mg/100g	1,4	2,4	6,5
Zinco (Zn), mg/100g	2,4	4,3	2
Selênio (Se), mg/100g	0,012	0,006	0,13

3.3 Escolha da matriz do candidato a MR e dos elementos a serem certificados

Por todo que foi exposto nos itens anteriores decidiu-se preparar um MR que fosse de utilidade para os laboratórios locais que tivessem que realizar determinações relacionadas com os produtos cárneos.

Internacionalmente existem diversos organismos que têm muita experiência em certificação de MRs em matrizes de alimentos e particularmente em matrizes de origem

cárnea. O Instituto para Materiais de Referência e Medições, IRMM, da Comunidade Européia tem vários MRCs para drogas veterinárias, desinfetantes e vitaminas em músculo, rim e fígado bovino e suíno; elementos traços em músculo bovino e rim suíno (IRMM, 2012a, 2012b) e nutrientes majoritários em músculo suíno (IRMM, 2009). O Conselho de Pesquisa Nacional do Canadá, NRC, produz um MRC para elementos majoritários, minoritários e traços em músculo bovino (NRC, 1993). Por último, o Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia dos Estados Unidos da América, NIST, produz um MRC de fígado bovino com 20 elementos certificados (NIST, 2009) e um MRC de um alimento de matriz cárnea para componentes majoritários, ácidos graxos e colesterol (NIST, 2008). Podem se encontrar diversos trabalhos publicados com a descrição da preparação e certificação destes MRC (IHNAT et al, 1987, 1994, 2000; O'KEEFFE et al, 1997; WAGSTAFFE et al, 1987, ZEISLER et al, 2009). Localmente o único material disponível é um MR de fígado bovino preparado pela EMBRAPA (BIANCHI et al., 2016). Este MR possui valores de referência atribuídos para 7 elementos (Ca, Fe, K, Mg, Na, P e Zn) e valores informativos para 13 elementos (As, Br, Cd, CO, Cs, Cu, Mn, Mo, Pb, Rb, Se, Sr e V).

Os MRs preparados com matriz de músculo em geral contém níveis menores de concentração que os preparados em fígado ou rim, devido a que estes órgãos concentram vários dos elementos (principalmente Cu, Fe, Se e Zn, mas também os metais potencialmente tóxicos como Cd ou Pb). Neste trabalho decidiu-se trabalhar com rim bovino devido a que não existe nenhum material disponível desta matriz. O único antecedente na literatura é um MR preparado na República Checa (KUČERA et al, 1995) mas esse material foi preparado para os laboratórios locais e não está disponível atualmente. Os materiais de referência disponíveis com matriz de rim foram preparados com rins de origem suína, e não bovina. Isso é devido a que, pelas suas características morfológicas, o rim suíno é muito mais simples de processar (WAGSTAFFE et al., 1987). Como pode ser observado na Figura 3.3 os rins de origem suína tem uma estrutura homogênea, ao contrário dos de origem bovina que apresentam uma estrutura cheia de protuberâncias e lóbulos. Cada uma destas pequenas estruturas está unida por tecido conectivo, que deve ser retirado para não comprometer a homogeneidade do MR final.

Figura 3.3 – Características morfológicas dos rins suínos e bovinos

Outro fator importante a ser considerado é que a concentração dos elementos no órgão está estreitamente relacionada com a alimentação do animal. O tipo de alimentação destinada ao gado suíno é diferente da destinada ao bovino, e portanto, os níveis de concentração nos MR preparados será diferente. Seguindo a mesma lógica, a alimentação também depende de fatores locais, o seja, não são iguais as rações utilizadas na Europa do que as utilizadas no Brasil ou Argentina, pelo que o MR produzido localmente seria mais representativo das necessidades da nossa região.

Por último, considerando que a EMBRAPA preparou recentemente um MR com matriz de fígado (BIANCHI et al, 2016), o MR de rim pode se constituir num material complementar que permita cobrir um intervalo mais amplo de concentrações. Tanto o fígado quanto o rim tem teores mais elevados dos constituintes minerais, mas tem alguns elementos que são acumulados preferentemente só em um destes órgãos. Por exemplo, o fígado apresenta teores muito mais elevados de Cu e Zn, no entanto os rins apresentam altos níveis de Se e Na (GARCÍA-LLATAS et al., 2011).

Na escolha dos analitos a serem certificados foram considerados vários fatores. Por um lado foram levadas em consideração as capacidades analíticas da técnica de NAA, técnica principal no Laboratório de Análise por Ativação Neutrônica do IPEN (LAN), que permite a determinação de alguns elementos e não de outros. Os fundamentos da técnica e analitos possíveis de serem determinados são detalhados no Capítulo 4. Também se consideraram as regulamentações que estabelecem os níveis permitidos de contaminantes em carne e as de rotulagem nutricional, apresentadas no item anterior. Os motivos da escolha e importância de cada um dos elementos escolhidos resumem-se a seguir.

Arsênio

O arsênio é um elemento natural na crosta terrestre e está amplamente distribuído no ar, na água e na terra. Na sua forma inorgânica é muito tóxico pelo que os seres humanos e animais têm desenvolvido a capacidade de transformar as espécies tóxicas inorgânicas em outras espécies não tóxicas orgânicas como, por exemplo, a arsenobetaina e arsenoaçúcares (HARRIS, 2014). A exposição prolongada ao arsênio inorgânico pode levar a uma intoxicação crônica. Os efeitos mais característicos são lesões cutâneas e câncer de pele. Esta exposição ocorre principalmente através do consumo de água contaminada, a ingestão de alimentos preparados com esta água ou a ingestão de animais que foram alimentados com água rica em arsênico, ou com grãos irrigados por ela.

As regulações MERCOSUL (e ANVISA) têm limites estabelecidos para este metal, que é de interesse regional. Argentina é um dos 12 países no mundo com maior concentração de As na água (SMEDLEY e KINNIBURGH, 2002). Na maior parte da água subterrânea na província de Buenos Aires, o arsênio excede o limite estabelecido pela Organização Mundial da Saúde, WHO, de 10 µg/l, pelo que não resulta apta para consumo. Concentrações mais elevadas, de mais de 50 µg/l, são achadas principalmente no norte desta província (BARDACH et al., 2015). Na Figura 3.4 são apresentadas algumas das zonas afetadas por este problema na Argentina. Estas zonas coincidem em sua maior parte com zonas de atividade agrícola e de pecuária, pelo que este elemento tem que ser considerado na hora de avaliar as carnes de consumo e exportação.

Figura 3.4 – Conteúdo de arsênio na água na Argentina, por departamento

Fonte: SWIECKY et al. (2006)

Cádmio

O cádmio é quimicamente semelhante ao zinco e acha-se naturalmente associado ao zinco e ao chumbo em minérios que contêm sulfetos. Altas concentrações em ar, água e solo podem ocorrer perto das fontes de emissão industrial, particularmente nas indústrias metalúrgicas. O cádmio e seus compostos têm sido usados como anticorrosivos, no galvanizado do aço, como pigmentos para plásticos, baterias elétricas e componentes

eletrônicos, entre outros usos (NORDEBERG et al, 2007). O cádmio presente no solo, mesmo em pequenas quantidades, é acumulado facilmente nas plantas, o que contrasta com outros elementos tóxicos como o chumbo. Os vegetais e os cereais são, portanto, geralmente conhecidos como as fontes mais importantes de cádmio na dieta. Nos animais, o cádmio se acumula em particular no rim e no fígado, portanto estes órgãos também constituem uma fonte de cádmio (WHO, 1999).

O cádmio é tóxico a todo o organismo. Alterações histológicas foram observadas nos rins, fígado, trato gastrointestinal, coração, ossos e vasos sanguíneos, porém o órgão crítico na intoxicação com cádmio é o rim. O cádmio provoca dano renal, caracterizado por uma disfunção na reabsorção nos tubos proximais e originando uma elevação na excreção na urina de proteínas de baixo peso molecular. A exposição em longo prazo, de origem alimentar e muitas vezes combinada com outras vias de exposição, também pode levar a perturbações do metabolismo do cálcio, osteoporose e osteomalácia, principalmente em mulheres pós-menopáusicas (NORDEBERG et al, 2007).

Como já foi dito, a Comunidade Européia estabelece limites máximos para o conteúdo de cádmio em alimentos, e estes limites foram adotados na maioria dos outros países.

Chumbo

O chumbo inorgânico é um dos agentes tóxicos mais estudados e seus efeitos tóxicos são amplamente conhecidos (WHO, 1996). Os principais alvos deste elemento são o sistema nervoso central e periférico, o sangue (incluindo a inibição da síntese do grupo hemo que pode afetar também a outras células), o rim, os sistemas cardiovascular, endócrino e imune, o trato gastrointestinal e a reprodução masculina. Além disso, o chumbo pode atravessar a placenta e causar efeitos no sistema nervoso do feto.

A exposição a este elemento pode acontecer no ambiente laboral, mas também está presente no meio ambiente em geral. Antigamente o chumbo era usado como aditivo em gasolinas e para tintas de uso industrial (como protetor de corrosão em construções de aço), de uso doméstico (para exterior e interior das casas) e inclusive até para brinquedos. Desde que estes usos foram proibidos, a contaminação no meio ambiente diminuiu, mas em muitos países continua sendo um problema. Atualmente o chumbo é utilizado principalmente na fabricação de baterias para automóveis e de uso industrial, e em menor

grau para pigmentos, recobrimento de cabos, munições, entre outros (SKERFVING e BERGDAHL, 2007).

Como consequência de todos estes usos, o chumbo está presente nos vegetais, principalmente como resultado da deposição do ar. Rapidamente o elemento é transferido desde as plantas aos animais constituindo-se, então, em um contaminante alimentar.

Da mesma forma que para o cádmio, a comunidade Européia estabelece limites máximos para o conteúdo de chumbo em alimentos, e estes limites foram adotados na maioria dos outros países.

Mercurio

Os efeitos tóxicos do mercúrio vão depender da forma química na qual ele se encontre. O mercúrio pode estar presente na sua forma inorgânica (no estado elementar ou oxidado) ou em forma orgânica, formando compostos metilalquilmercúricos e fenilmercúricos principalmente (BERLIN et al, 2007).

A absorção gastrointestinal das formas inorgânicas é muito baixa e, uma vez absorvidas, estas são acumuladas preferivelmente no rim. Ao contrário, as formas orgânicas, como o metilmercúrio, têm absorção gastrointestinal de 90 a 95% e têm especial afinidade pelo cérebro, pelo que é acumulado principalmente no sistema nervoso central. Todas as formas químicas são capazes de atravessar a placenta e ter efeitos nocivos no feto. Os efeitos neurotóxicos incluem: parestesia, sensação de entorpecimento e formigamento na boca e extremidades, particularmente os dedos das mãos e dos pés, descoordenação motora, sensação generalizada de fraqueza, cansaço e incapacidade de concentração, perda de visão e audição, entre outros (WHO, 1996).

O mercúrio está amplamente distribuído no meio ambiente devido a fenômenos naturais, como atividade vulcânica e desgaseificação da crosta terrestre, e as atividades humanas, como combustão de combustíveis fósseis e rejeitos industriais. Na natureza, a atividade microbiológica transforma o mercúrio inorgânico em metilmercúrio, a espécie com maior toxicidade (BERLIN et al., 2007). Portanto, o mercúrio inorgânico e o metilmercúrio estão presentes nos organismos vivos que estiveram expostos. A presença de mercúrio no ambiente marinho é muito mais crítica e representa uma ameaça maior do que no ambiente terrestre. Os peixes e alimentos de origem marinha concentram grandes quantidades de metilmercúrio. A contaminação por mercúrio do ambiente marinho é

rapidamente refletida pelo aumento da ingestão de metilmercúrio derivado dos tecidos de peixes predadores (WHO, 1996). Por este motivo, a legislação internacional estabelece limites principalmente para peixes, moluscos e crustáceos. Porém, devido à elevada toxicidade deste metal, é importante também sua determinação em outros tipos de alimentos. Por exemplo, as carnes e laticínios podem conter, além do mercúrio inorgânico, pequenas quantidades de metilmercúrio, por causa dos resíduos de alimentação a base de peixe ou de grãos tratados.

Cobalto

O cobalto é um elemento relativamente raro na crosta terrestre, mas que é essencial para os mamíferos por ser parte da cobalamina (Vitamina B12). Uma dieta deficiente em cobalto está estreitamente associada à deficiência na vitamina B12, e leva à interrupção do metabolismo normal e a sintomas como desorientação, perda de memória e em casos graves, a anemia megaloblástica. Em geral, uma dieta normal cobre amplamente as necessidades de cobalto, a deficiência só pode se tornar um problema em dietas vegetarianas estritas, já que as plantas não acumulam cobalto nem cobalamina, exceto por algumas leguminosas (HARRIS, 2014). Alimentos marinhos como camarão, vieiras, mariscos e ostras são boas fontes de cobalto inorgânico e cobalaminas. Também alguns vegetais de folhas, as carnes vermelhas, fígado e leite. Por este motivo é de interesse sua determinação nestas matrizes.

O cobalto em excesso tem efeitos tóxicos no organismo, sendo o sistema respiratório seu principal alvo. Intoxicações com cobalto são em geral de origem industrial e ocupacional, e não alimentar, já que o cobalto não é acumulado em grande quantidade pelos organismos vivos e se excreta rapidamente pela urina (LISON, 2007).

Cobre

O cobre é um elemento amplamente distribuído nos tecidos biológicos de plantas e animais, principalmente na forma de metaloproteínas com função enzimática. Estas enzimas estão envolvidas em muitos processos metabólicos, tais como a utilização do oxigênio na respiração celular, na utilização da energia a nível celular e na síntese de compostos essenciais como proteínas do tecido conectivo, vasos sanguíneos e compostos neuroativos.

O cobre está distribuído em todos os órgãos do corpo, mais tem maior concentração no fígado, rins e músculo cardíaco. As principais fontes de Cu são alimentos

de origem marinha, como ostras e mexilhões, a carne, principalmente fígado, rim e coração, e alguns cereais, nozes e vegetais de folhas verdes (WHO, 1996).

Uma deficiência de cobre é muito rara em adultos, mas pode ocorrer em crianças alimentadas exclusivamente com leite, devido a que o leite tem baixa concentração de Cu. A deficiência de Cu pode afetar todos os órgãos do corpo, mas os efeitos mais importantes aparecem no sistema cardiovascular, na formação de ossos e hiper-pigmentação da pele (HARRIS, 2014).

O corpo humano realiza controle homeostático muito eficiente dos níveis de Cu, excretando os excessos na biliar, através do fígado. Por este motivo, a intoxicação com cobre também não é frequente. É preciso o consumo de alimentos contaminados com níveis muito altos e o principal efeito é o desconforto gastrointestinal. Porém, os riscos são maiores para neonatos e crianças devido a que neles, o sistema de excreção biliar ainda é imaturo, causando dano hepático, hepatite e cirrose, e mais raramente hemólise (COLLINS, 2017).

Como foi apresentado na Tabela 3.5, existem países onde o conteúdo máximo de Cu em fígado e rim está regulamentado.

Ferro

O ferro é um dos principais elementos que compõem nosso planeta. Este metal de transição existe em vários estados de oxidação diferentes sendo Fe^{2+} e Fe^{3+} os mais comuns. A capacidade do ferro de mudar de estado de oxidação é o que determina sua importância biológica em diferentes funções catalíticas. É um nutriente essencial, que possibilita a ligação e transporte de oxigênio (formando parte da hemoglobina), o transporte de elétrons (por meio de proteínas que contém o grupo hemo, como os citocromos) e está envolvido no metabolismo oxidativo (WESSLING-RESNICK, 2017).

As principais fontes de ferro são os alimentos de origem animal, especialmente os que contém o Fe ligado ao grupo hemo como as carnes, especialmente as carnes vermelhas, devido à sua facilidade de absorção e alta biodisponibilidade. Outros tipos de carne como a das aves e alguns peixes e moluscos também podem se constituir em boas fontes deste elemento. Por último, ferro não ligado ao grupo hemo é encontrado principalmente em alimentos vegetais. Grãos inteiros, cevada e aveia, são boas fontes de ferro. Os vegetais de folhas verdes (espinafre, couve) possuem grandes quantidades de

ferro, mas em quantidade inferior às sementes e às nozes. A biodisponibilidade e absorção do ferro destas fontes é significativamente menor (HARRIS, 2014).

Por ser um elemento essencial e com papel crítico na saúde humana, a concentração de ferro deve aparecer obrigatoriamente na rotulagem nutricional dos alimentos. A deficiência de ferro se manifesta em forma de anemia, levando à redução da capacidade de trabalho, deficiência da função mental e imunidade reduzida.

A intoxicação alimentar com ferro não é frequente e aparece quase exclusivamente em pessoas com uma predisposição genética nas quais a absorção do elemento está aumentada. Nestes indivíduos, a acumulação de ferro causada pela ingestão crônica acontece principalmente no fígado, pâncreas e coração, podendo desenvolver cirrose, diabetes e disfunção cardíaca (PONKA et al., 2007).

Magnésio

O magnésio é o quarto mineral mais abundante do corpo, acumulando-se principalmente nos ossos e músculos. A principal função no organismo é a de ser um cofator para mais de 300 enzimas que utilizam ATP e que são de extrema importância na bioquímica celular. O Mg tem um papel essencial no controle da pressão sanguínea, modulação do açúcar no sangue, bem como nas funções nervosas e musculares (MAFRA e COZZOLINO, 2016).

As fontes alimentares mais importantes de magnésio são vegetais de folhas verdes, leguminosas, grãos inteiros, nozes e produtos marinhos, seguidos pelas carnes e leite. Os alimentos refinados ou processados tendem a ter menor teor de magnésio. A água dura é particularmente rica em magnésio, constituindo uma boa fonte do mineral. Uma deficiência grave de Mg em lactantes ou adultos bem alimentados é rara, porém em países desenvolvidos a ingestão de Mg está normalmente abaixo dos níveis recomendados devido ao alto consumo de alimentos processados. Se ocorrer deficiência importante, os sintomas podem incluir hipocalcemia, aumento da excitabilidade muscular, arritmias cardíacas, tétano, entre outros (HARRIS, 2014).

Pela sua importância metabólica, as regulamentações da rotulagem nutricional sugerem que este elemento deveria aparecer listado na rotulagem dos alimentos e, apesar de não ser obrigatório, normalmente é colocado.

Uma ingestão elevada de magnésio de fontes alimentares normalmente não causa efeitos adversos, porém se as fontes são farmacológicas ou na forma de sais de Mg, podem aparecer efeitos tóxicos como náuseas, vômitos e hipotensão.

Manganês

O manganês é um elemento abundante no meio ambiente, encontrado no ar, no solo e na água devido à erosão natural, à emissão de fontes industriais e automotivas, e pela combustão de alguns aditivos de gasolinas que contém o elemento. No entanto, a principal via de exposição humana ao Mn é a ingestão de alimentos. Grãos integrais, legumes, arroz e nozes possuem os mais altos níveis de Mn, que também pode ser encontrado em chocolate, chá, vegetais de folhas verdes e frutas (VIEIRA PERES e ASCHNER, 2017).

O Mn é considerado um elemento essencial devido à sua participação em vários processos fisiológicos. O elemento é importante no desenvolvimento de ossos e tecido conectivo e funciona como catalisador no metabolismo dos carboidratos, aminoácidos e lipídios. A deficiência do Mn por longos períodos de tempo resulta em alteração da absorção e metabolismo da glicose, na alteração do metabolismo do colesterol, falhas do sistema reprodutivo, e no esqueleto e nos ossos (HARRIS, 2014).

A exposição prolongada a altas concentrações de manganês, associadas principalmente à inalação em ambientes ocupacionais, pode resultar em efeitos neurológicos e neurocomportamentais, resultando em distúrbios similares ao mal de Parkinson (SARIC e LUCCHINI, 2007).

Selênio

O selênio é um elemento traço essencial e sua importância para os seres humanos e os animais reside no seu papel como cofactor em selenoproteínas e enzimas que protegem o organismo de agentes oxidantes, como a enzima glutathione peroxidase. O Se, como selenocisteína destrói peróxidos e radicais livres. A função do selênio é inseparável da vitamina E, embora o selênio não possa substituir a vitamina, nem a vitamina possa substituir o selênio na ação preventiva (HARRIS, 2014).

A castanha do Brasil é o alimento mais rico em selênio conhecido até hoje, seguida por outros alimentos como, frutos do mar, cogumelos, cereais, leveduras, fígado e rins entre outros (DONADIO et al, 2016). A biodisponibilidade do elemento em carnes é alta porque está presente como selenometionina e selenocisteína. A concentração do Se em

rim é a mais elevada em carnes vermelhas, podendo ser até 10 vezes maior que em outros cortes (ALEGRIA et al., 2009).

Como o conteúdo de Se é muito variável de uma região a outra, a concentração achada em plantas da mesma espécie também é muito variável. Por este motivo, os animais e seres humanos podem sofrer deficiência de selênio ou estar expostos a níveis tóxicos do elemento, dependendo de sua localização geográfica. A deficiência de selênio leva a risco de desenvolver câncer, degeneração muscular, infertilidade, insuficiência cardiovascular e do sistema imunológico (HARRIS, 2014). Por outro lado, intoxicação crônica causada por exposição ao longo prazo pode levar a cardiomiopatia, cirrose hepática, deformação das articulações, perda de cabelo, entre outros (HÖGBERG e ALEXANDER, 2007).

O Se é habitualmente informado na rotulagem nutricional dos alimentos pelo que sua determinação é importante.

Sódio, cloro e potássio

Estes três elementos caracterizam a fisiologia eletrolítica dos sistemas vivos. Eles controlam o equilíbrio de fluidos e o potencial da membrana das células. Os gradientes de sódio, através das membranas, fornecem a energia que impulsiona os aminoácidos e os açúcares dentro das células e também estimulam os impulsos nervosos que ativam as contrações musculares. Os íons de sódio estão localizados quase exclusivamente fora das células, enquanto os íons de potássio acumulam-se dentro delas. O cloreto é o contra ânion para ambos. Devido ao seu antagonismo, a compartimentalização deve ser mantida para que os dois desempenhem suas funções basicamente opostas (HARRIS, 2014)

Sua ampla distribuição em plantas e animais garante a presença desses nutrientes em quase todas as fontes alimentares. O Na é consumido principalmente como cloreto de sódio (sal de cozinha). A contribuição dos alimentos na ingestão de sódio depende de cada país. Nos estados Unidos da América quase 80% do sal na dieta provém de alimentos processados; apenas 12% provém do sal natural nos alimentos e os 8% restantes representam o sal adicionado durante o preparo de uma refeição. Em países como Brasil, no entanto, o consumo de sal é devido principalmente a este último fator, a adição de sal no preparo das refeições caseiras. (TRAMONTE et al., 2016)

O excesso de sódio na dieta pode aumentar a pressão arterial e levar a complicações mais graves, como insuficiência cardíaca, renal e problemas neurológicos. A

hipertensão é considerada um grande problema de saúde em escala global. Ter alta quantidade de sódio e baixa ingestão de potássio pode agravar ainda mais a condição. Uma das estratégias chave para controlar a hipertensão, portanto, é limitar a ingestão de sódio (HARRIS, 2014).

Por este motivo, as regulamentações de rotulagem nutricional dos alimentos em todos os países nas que são aplicadas, exigem que o conteúdo de Na seja informado de forma obrigatória. O Cl e o K podem figurar, e normalmente figuram, como informação adicional.

Zinco

O zinco é um elemento essencial a todos os organismos vivos. Nos seres humanos, está envolvido no funcionamento de grande número de enzimas e na estabilização da estrutura molecular dos constituintes e membranas subcelulares. O zinco participa na síntese e degradação de carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Também desempenha papel essencial na transcrição e tradução polinucleotídica e, portanto, nos processos de expressão genética (WHO, 1996).

O zinco está amplamente distribuído nos alimentos. Alimentos ricos em zinco incluem as carnes vermelhas, alguns frutos do mar e os grãos integrais. Como o zinco é encontrado no gérmen e no farelo dos grãos, 80% do mineral é perdido durante a moagem (SILVA et al., 2016). Apesar de conter Zn, os grãos também são ricos em ácidos fítics (hexa e penta-fosfatos) que suprimem a absorção do elemento. Ao contrário, nas carnes, a cisteína e a metionina liberada após a digestão ajudam na absorção do zinco (HARRIS, 2014). Pela sua maior biodisponibilidade a absorção do Zn na carne pode chegar a 40%. Quase metade da quantidade de zinco recomendada para mulheres adultas pode ser alcançada com a ingestão de apenas 90 g de carne magra (LUPTON e CROSS, 1994).

Existe grande variedade de doenças relacionadas à deficiência de zinco e a seu excesso. Os seres humanos expostos a graves deficiências de zinco podem desenvolver retardo de crescimento, atraso na maturação sexual e esquelética, falhas no sistema imunológico, distúrbios cerebrais e cognitivos, entre outros (HARRIS, 2014).

A exposição em longo prazo a altas quantidades de zinco resulta na interferência no metabolismo de outros oligoelementos. Em particular, o metabolismo do cobre é especialmente sensível ao excesso de zinco (WHO, 1996).

Pela sua grande importância, o Zn geralmente é incorporado na rotulagem nutricional dos alimentos. Por outro lado, da mesma forma que para o Cu, alguns países têm limites máximos permitidos para o elemento em carnes. Por este motivo, a determinação do Zn é importante.

4 FUNDAMENTOS TEÓRICOS DOS MÉTODOS UTILIZADOS

No presente capítulo são apresentados brevemente os fundamentos teóricos nos quais estão baseadas algumas das técnicas utilizadas na caracterização do candidato a material de referência. Em primeiro lugar se descrevem brevemente as três técnicas analíticas utilizadas. Apesar de ter utilizado uma grande variedade de técnicas e testes estatísticos no decorrer do presente trabalho, decidiu-se explicar muito brevemente só os fundamentos das técnicas multivariadas, devido a que estas técnicas estão menos difundidas para este tipo de aplicação e, portanto, são menos conhecidas que as técnicas clássicas como ANOVA. As técnicas robustas utilizadas na avaliação da comparação interlaboratorial são descritas no Capítulo 6. Resultados e Discussão.

4.1 Técnicas analíticas

4.1.1 Análise por Ativação Neutrônica, NAA.

A Análise por Ativação Neutrônica, NAA, é uma técnica analítica utilizada principalmente para a determinação de elementos traço com alta sensibilidade e boa precisão e exatidão, sendo útil para análises multielementares quali e quantitativas em amostras dos mais variados campos de aplicação (GREENBERG et al., 1984).

O princípio básico das técnicas de análise por ativação é que uma partícula (nêutron, próton, partícula α , etc.) ao incidir sobre uma amostra induz reações nucleares nos núcleos dos analitos a determinar, cujos produtos (geralmente radiativos) emitem radiações características da identidade e quantidade dos elementos a serem determinados. Estas radiações podem ser detectadas por diferentes métodos dependendo de sua natureza. No método de NAA as partículas incidentes são nêutrons que provocam a formação de isótopos radioativos na amostra. Podem acontecer diferentes reações, dependendo do núcleo alvo e da energia do nêutron incidente. Os produtos gerados podem decair por diferentes mecanismos, possibilitando a detecção da radioatividade emitida durante o processo por espectrometria de raios gama. A partir do modo de decaimento, da energia e

da meia vida, é possível a identificação e quantificação dos átomos originais na amostra. (FILBY, 1995) Este processo é representado esquematicamente na Figura 4.1.

Figura 4.1 – Esquema que representa a sequência de eventos de uma reação (n,γ)

Fonte: Adaptado de HAMIDATOU et al. (2013)

Os reatores nucleares são as fontes de nêutrons mais comuns e práticas em NAA. Num reator nuclear são produzidos nêutrons com um amplo espectro de energias, mas os nêutrons de baixa energia, denominados nêutrons térmicos, formam a parte mais importante do espectro do reator (ZEISLER et al., 2011). Com este tipo de nêutrons as reações mais prováveis de ocorrer são as (n, γ) que proporcionam maior sensibilidade analítica comparadas com outros tipos de reações.

Existem diversas variantes da técnica, a mais utilizada é Análise por Ativação Neutrônica Instrumental, INAA. Nesta modalidade o método requer pouca preparação de amostras e nenhum tratamento químico antes da análise, minimizando a chance de contaminação e perdas da amostra. Portanto, as contribuições de brancos e o efeito matriz são desprezíveis (FILBY, 1995).

No método comparativo, a amostra é irradiada juntamente com padrões elementares de composição similar, nas mesmas condições. Após um tempo de decaimento

apropriado as amostras e padrões são medidas no mesmo detector, permitindo o cálculo da concentração dos elementos na amostra a partir da comparação das áreas dos picos das amostras com a área dos picos dos padrões de concentração conhecida, utilizando-se a Equação 4.1.

$$C_a = \frac{m_p \times A_a \times e^{0,693 \frac{(t_{da} - t_{dp})}{t_{1/2}}}}{M_a \times A_p} \quad (4.1)$$

onde os índices a e p representam amostra e padrão respectivamente e;

A = taxa de contagem do radionuclídeo considerado;

M_a = massa total de amostra;

$t_{1/2}$ = tempo de vida meia do radionuclídeo;

m_p = massa do elemento no padrão;

C_a = concentração do elemento na amostra;

t_d = tempo de decaimento.

Resumindo, pode se afirmar, que a INAA resulta em um método multielementar altamente seletivo e sensível. Como a geração do sinal analítico ocorre através de uma reação nuclear, as determinações são praticamente independentes da forma química dos elementos e do seu ambiente químico. As determinações são, até certo ponto, independentes da matriz da amostra, e na maioria dos casos podem ser realizadas sem brancos analíticos. Por último, como a manipulação da amostra antes da análise é mínima, a probabilidade de contaminação também é muito baixa (ZEISLER et al., 2011).

Todas as vantagens mencionadas tornam a INAA um dos métodos de escolha para a certificação de MRs, sendo particularmente útil na etapa de avaliação da homogeneidade das amostras (STOEPLER, et al., 2001) e na atribuição de valores às propriedades.

INAA permite determinar de 20 a 40 elementos numa mesma amostra, com sensibilidade no nível dos mg/kg e menores, em alguns casos. Porém, quando são

utilizados nêutrons térmicos alguns elementos de interesse biológico não podem ser determinados, como é o caso dos elementos N, C, O e P. Por outro lado a técnica também não é apropriada para Sn e Pb, dois elementos importantes para muitas aplicações (ZEISLER et al., 2011).

Dentre os elementos para os quais a técnica é pouco sensível estão o Ca e o K. Nos alimentos de origem cárnea a concentração de Ca é muito baixa, motivo pelo qual este elemento não foi determinado neste trabalho. Já o K, presente em concentração muito maior por se tratar de um macro componente, foi determinado sem inconvenientes, mas com incerteza um pouco maior que para os outros elementos determinados por esta técnica (Cl, Co, Fe, Mg, Mn, Na, Se e Zn).

4.1.2. Espectrometria de Absorção Atômica de Vapor Frio, CV AAS.

A Espectrometria de Absorção Atômica, AAS, baseia-se na absorção de uma radiação eletromagnética específica por átomos de um elemento em seu estado fundamental. Quanto maior o número de átomos no caminho percorrido pela radiação, maior será a absorção ou a atenuação do sinal que atinge o detector do espectrômetro, de forma a ser possível a quantificação do elemento em questão.

A determinação das espécies atômicas só pode ser realizada em meio gasoso, onde os átomos individuais encontram-se bem separados uns dos outros e não existem estados de energia vibracionais e rotacionais pelo que os espectros de absorção estão constituídos por um número limitado de linhas espectrais originadas nas transições eletrônicas. Por conseguinte, o primeiro passo na AAS é a atomização, processo em que uma amostra é volatilizada e decomposta de modo a produzir átomos livres em fase gasosa (SKOOG et al., 2014).

No tipo de equipamento de absorção atômica mais difundido, a Espectrometria de Absorção Atômica por Chama, F AAS, o atomizador é uma chama, geralmente de ar e acetileno, na qual a amostra é introduzida por meio de um nebulizador. A F AAS é muito efetiva, rápida e prática, mas os limites de detecção obtidos são maiores quando comparados com outros métodos espectroscópicos como ICP ou ET AAS. Quando a atomização é realizada em um tubo de grafite pirolítico, a técnica é denominada Espectrometria de Absorção Atômica por Atomização Eletrotérmica, ET AAS. Neste caso, a sensibilidade da técnica é maior, mas a análise se torna mais cara e demorada.

No caso particular do mercúrio, devido à sua alta pressão de vapor a temperatura ambiente, é possível obter a atomização sem a necessidade de aquecer a amostra. Neste caso, a técnica é denominada Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Vapor Frio, CV AAS, que pode ser utilizada em sistema de injeção em fluxo, e foi a técnica escolhida neste trabalho para a determinação deste elemento.

Na realização desta técnica as amostras são tratadas com agentes oxidantes, como HNO_3 , H_2SO_4 , H_2O_2 , etc., para transformar o Hg presente em sua forma oxidada Hg^{2+} . Posteriormente o Hg^{2+} é reduzido a sua forma metálica Hg^0 com SnCl_2 . O Hg elementar é conduzido a um tubo de absorção de caminho óptico longo por meio de um gás inerte que passa através da mistura de reação. Este tubo está no caminho da luz de uma lâmpada de cátodo oco de Hg que emite radiação de 253,7 nm. A absorbância medida neste comprimento de onda é diretamente proporcional à concentração de mercúrio no tubo, que por sua vez é proporcional à concentração de mercúrio na amostra. O instrumento tem que ser calibrado com soluções de Hg de concentração conhecida, tratadas da mesma forma que a solução da amostra para obter a curva de calibração e, por conseguinte, poder calcular a concentração na amostra.

4.1.3 Espectrometria de Massa com Fonte de Plasma Acoplada Indutivamente, ICP-MS.

A espectrometria de massa é uma ferramenta analítica poderosa e versátil que permite a identificação e quantificação dos componentes de uma amostra e, dependendo do caso, pode fornecer informações como a massa molecular e estrutura química. Existem dois tipos de espectrometria de massa: a espectrometria de massa atômica ou elementar, e a espectrometria de massa molecular. A espectrometria de massa atômica permite determinar quase todos os elementos na tabela periódica, com limites de detecção que são frequentemente várias ordens de magnitude menores que os obtidos com métodos ópticos. A espectrometria de massa molecular é capaz de fornecer informação sobre estruturas de moléculas inorgânicas, orgânicas e biológicas e sobre a composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas (SKOOG et al., 2014).

No espectrômetro de massa, as moléculas na amostra são convertidas em íons e os íons formados são separados com base na sua relação massa-carga (m/z). Os íons são direcionados para um transdutor que converte o número de íons (abundância) em um sinal

elétrico. Frequentemente, os íons produzidos tem uma carga só, pelo que a relação m/z transforma-se em m , e o espectro resultante relaciona o número de íons em função da massa. Os espectros obtidos são muito mais simples que os obtidos na espectroscopia óptica convencional, e são mais facilmente interpretáveis.

Portanto, o primeiro passo na técnica é atomizar a amostra e converter uma fração significativa desses átomos em um fluxo de íons (geralmente íons com uma carga positiva).

A introdução da amostra é realizada através de um nebulizador convencional ou ultrassônico.

A fonte de íons é a principal diferença entre a espectrometria de massa molecular e atômica. Para a espectrometria de massa atômica, a fonte iônica deve ser muito energética para converter a amostra numa fase gasosa constituída por átomos e íons simples. Com esse intuito, são utilizadas fontes de plasma. Por definição, um plasma é uma mistura gasosa condutora contendo uma concentração significativa de íons e elétrons. No plasma de argônio utilizado para a espectroscopia atômica, os íons de argônio e os elétrons são as principais espécies condutoras. Uma vez que os íons de argônio são formados em um plasma, eles são capazes de absorver energia suficiente de uma fonte externa para manter a temperatura em um nível no qual a ionização adicional sustenta o plasma indefinidamente, alcançando temperaturas de até 10000 K. Três fontes de energia têm sido utilizadas na espectroscopia de plasma de argônio. Uma é uma fonte de arco de corrente contínua, capaz de manter uma corrente de vários amperes entre eletrodos imersos no plasma de argônio. O segundo e o terceiro são geradores de radio frequência e frequência de micro-ondas através dos quais o argônio flui. Dos três, o gerador de radio frequência, ou fonte de plasma acoplada indutivamente (ICP), oferece a maior vantagem em termos de sensibilidade e ausência de interferência. No ICP-MS, o ICP serve como atomizador e ionizador. O feixe de íons produzidos é introduzido no espectrômetro de massa através de uma interface que geralmente consiste de dois cones metálicos, chamados de amostrador (sampler) e skimmer. O feixe introduzido tem aproximadamente a mesma composição iônica que a região de plasma a partir da qual os íons são extraídos.

Os espectros obtidos consistem geralmente em uma série simples de picos dos isótopos de cada elemento presente, juntamente com alguns picos de fundo. Para realizar a quantificação dos elementos são realizadas curvas de calibração utilizando padrões

externos. Para compensar possíveis instabilidades ou efeitos matriz, podem ser adicionados um ou mais padrões internos de massas próximas aos analitos de interesse.

4.2 Técnicas estatísticas multivariadas

As técnicas multivariadas levam em conta a correlação entre muitas variáveis ao mesmo tempo e, por esta razão, elas podem proporcionar muito mais informações do que as técnicas univariadas. Elas são muito úteis para mostrar, por exemplo, estruturas de dados subjacentes não visíveis por outros meios (WOLD, 1987). Por outro lado, elas também possibilitam a representação gráfica de uma maior quantidade de informações o que permite a visualização mais simples do conjunto de dados, facilitando sua avaliação (JOLLIFFE, 2002).

4.2.1 Análise de Componentes Principais, PCA

A análise de componentes principais é uma técnica para reduzir a quantidade de dados quando existe certa correlação entre eles. A ideia por trás do PCA é encontrar os componentes principais $Z_1, Z_2, \dots, Z_n$ tal que cada um deles seja uma combinação linear das variáveis originais $X_1, X_2, \dots, X_n$, que descrevem cada espécime, ou amostra neste caso.

$$Z_1 = a_{11}X_1 + a_{12}X_2 + a_{13}X_3 + \dots + a_{1n}X_n \quad (4.1)$$

$$Z_2 = a_{21}X_1 + a_{22}X_2 + a_{23}X_3 + \dots + a_{2n}X_n \quad (4.2)$$

etc.,

Os coeficientes, a_{11} , a_{12} , etc. são escolhidos de forma tal que as novas variáveis, ao contrário das variáveis originais, não estejam correlacionadas entre si. Criar um novo conjunto de variáveis dessa maneira a priori pareceria não ter sentido, pois obtemos novas variáveis em lugar das n originais e, portanto, não há redução na quantidade de dados. No entanto, os componentes principais também são escolhidos de forma tal que o primeiro componente principal (PC1), Z_1 , explica a maior parte da variação do conjunto de dados, o segundo (PC2), Z_2 , explica a próxima maior variação e assim por diante. Assim, nos casos nos que existe uma correlação significativa, o número de PCs úteis é muito inferior ao número de variáveis originais e, por tanto, permitem uma melhor interpretação

(MILLER e MILLER, 2010). A PCA consiste basicamente em um método matemático para reduzir a quantidade de dados e não assume que os dados tenham nenhuma distribuição em particular.

Pelas características do modelo, quando as variáveis estão expressas em unidades muito diferentes ou com um intervalo de ordens de grandeza muito elevado, podem aparecer distorções. Por este motivo, é habitual normalizar os dados, subtraindo de cada valor a média e dividindo pelo desvio padrão de cada variável. Com esta transformação linear, a média dos dados passa a ser 0 e o desvio padrão, 1, mas a forma original da sua distribuição não é modificada.

Um ponto importante a ser considerado é quantas componentes principais devemos tomar para descrever adequadamente a variabilidade do conjunto de dados sem perder informação. Existem várias regras, geralmente empíricas, para fazer esta escolha. A escolhida neste trabalho tem em consideração a porcentagem acumulada da variância total que é explicado por cada um dos PC, tal como descrito por Jolliffe (2002). Neste enfoque, tem que se definir a porcentagem acumulada da variância que se deseja explicar, e escolher o mínimo número de PC necessários para alcançar esta variância. Geralmente, é escolhido um valor de entre 70% e 90%, para obter resultados representativos.

4.2.2 Análise de Agrupamentos Hierárquica, HCA

A análise de agrupamentos, também chamada pelo seu nome em inglês, análise de *clusters*, é um método para separar objetos em grupos de forma tal que objetos similares estejam no mesmo grupo. Os grupos não são conhecidos antes da aplicação da análise matemática e não é feita nenhuma suposição prévia sobre a distribuição das variáveis. A análise de cluster busca objetos que estão próximos entre si no espaço das variáveis. A distância, d , entre dois pontos no espaço n -dimensional com coordenadas $(x_1, x_2, \dots, x_n)$ e $(y_1, y_2, \dots, y_n)$ é usualmente medida como a distância euclidiana (MILLER e MILLER, 2010). A distância euclidiana é a distância geométrica entre dois objetos e está definida como,

$$d = \sqrt{(x_1 - y_1)^2 + (x_2 - y_2)^2 + \dots + (x_n - y_n)^2} \quad (4.3)$$

Com as distâncias euclidianas, quanto menor a distância, mais semelhantes são os casos ou objetos. Neste trabalho, estas distâncias são representadas no eixo vertical dos gráficos obtidos quando aplicado este método, denominados dendogramas.

Depois de ter escolhido a medida da distância ou similaridade, é necessário decidir qual algoritmo aplicar para fazer os agrupamentos. Existem vários procedimentos para efetuar este processo. Cada um deles difere dos outros na forma na qual definem a distância de um grupo recém-formado a um determinado objeto ou aos outros grupos já criados. Existem várias maneiras de se calcular a distância entre dois clusters que contêm mais de um membro. Conceitualmente, a abordagem mais simples é considerar a distância entre dois grupos como a distância entre vizinhos mais próximos. Isso é chamado de método de ligação simples (single linkage method). Todos os métodos baseados em ligações (ou encadeamentos) seguem um princípio semelhante: existe uma cadeia de semelhança que leva a que um determinado objeto seja adicionado, ou não, a um determinado grupo. As regras que regem essa cadeia diferem de um método para outro. Uma abordagem diferente é o método de Ward, utilizado neste trabalho.

O objetivo no método de Ward é unir objetos em grupos de modo que a variância dentro do grupo resultante seja minimizada. Para fazer isso, cada objeto começa constituindo seu próprio grupo. Os grupos são então mesclados de forma a reduzir a variabilidade dentro do grupo. Basicamente, isso significa que, em cada etapa, a similaridade média do grupo é determinada (FIELD, 2000).

O método se denomina hierárquico porque, uma vez que um objeto foi atribuído a um determinado grupo, o processo não pode ser revertido.

5 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Preparação do material

5.1.1 Aquisição do material

A escolha, busca e aquisição da matéria prima para a realização de um material de referência é de fundamental importância porque desse fato dependerá em grande parte o bom desempenho do material de referência preparado.

Um fato importante era que os rins proviessem de um mesmo produtor de bovinos, para garantir que a alimentação dos animais fosse similar, eliminando desta forma uma fonte de heterogeneidade na concentração dos analitos de interesse. Com esse intuito, contatou-se a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA. A EMBRAPA é uma instituição estatal federal pública vinculada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, cujos objetivos são produzir conhecimento científico e desenvolver técnicas de produção para a agricultura e pecuária do Brasil (EMBRAPA, 2017b). Por esse motivo, existiam vários projetos de pesquisa sendo desenvolvidos dentro da EMBRAPA envolvendo animais de origem bovina, criados em condições de estrito controle sanitário e de alimentação. Para a realização de um desses projetos foram sacrificados 44 animais e seus 88 rins foram doados pela EMBRAPA para o desenvolvimento do presente trabalho.

Os animais foram produzidos na Fazenda Canchim localizada em São Carlos, estado de São Paulo. Eram oriundos de cruzamentos de touros de raça Canchim, Bonsmara ou Brangus com vacas de raça Nelore, 50% Angus + 50% Nelore ou 50% Senepol + 50% Nelore. Os animais foram mantidos durante todo o período das águas em pastagem adubada de capim-mombaça, com suplementação de apenas mistura mineral. A suplementação mineral é necessária para complementar a alimentação dos animais, agregando minerais deficitários na região, tais como fósforo, cobalto e selênio.

Após o período de avaliação em pastejo, os animais foram confinados por um período de aproximadamente três meses antes de serem abatidos. Durante a fase de confinamento, os animais receberam uma dieta com 13,1% de proteína bruta e 71,0% de nutrientes digestíveis totais, constituída de 60,0% de silagem de milho, 22,8% de milho em

grão moído, 8,0% de farelo de soja, 7,0% de farelo de trigo, 0,5% de uréia, 0,7% de calcário calcítico, 1% de mistura mineral e 0,03% de monensina sódica, na base seca.

Os rins de cada animal foram colocados em uma sacola plástica, selada hermeticamente e congelados até seu processamento. O peso total dos rins foi de aproximadamente 35 kg.

5.1.2 Pré-tratamento do material

Os rins foram lavados com água MilliQ para eliminar qualquer contaminação superficial. Removeu-se a gordura e tecidos conectivos que pudessem comprometer a homogeneidade física do material. Posteriormente cortaram-se em pedaços pequenos para sua posterior moagem. Todos os utensílios utilizados tais como facas, invólucros, moinhos, etc. foram de cerâmica ou plástico, para evitar a contaminação própria de constituintes do aço, tais como Ni, Co, V, Fe e Mo. Além disso, todo o material foi descontaminado com lavagem com ácido nítrico de pureza elevada e água ultra pura.

O peso do material obtido após o tratamento foi aproximadamente 24 kg.

Figura 5.1 – Diferentes estágios no pre-tratamento do material de referência

5.1.3 Liofilização do material processado

No presente trabalho o material foi liofilizado em um liofilizador comercial marca LioBras modelo LP 1040, na empresa LioFoods. O liofilizador conta com uma unidade condensadora construída em aço inoxidável AISI304, com acabamento sanitário espelhado. Sua capacidade é de até 40 kg de gelo, contendo 10 bandejas de 55 x 55 cm, com 3 m² de área total. A temperatura do condensador é de -40°C e tem uma bomba de vácuo de duas etapas que alcança os 700 µbar.

O material foi liofilizado por 24 horas, obtendo-se uma massa final de aproximadamente 4,3 kg.

5.1.4 Moagem do material liofilizado

O material foi moído num moinho tipo planetário marca RETSCH, modelo PM 400, no Instituto de Radioproteção e Dosimetria, IRD – CNEN/RJ. As condições da moagem são descritas a seguir:

- Massa moída em 10 minutos: aproximadamente 100 g.
- Tempo de moagem: 10 minutos
- Rotação da moagem: 240 rpm
- Tipo de rotação: reversa a cada 1 minuto
- Cápsula de moagem: Carbetto de tungstênio
- Esferas de moagem: Óxido de Zircônio
- Carga por cápsula: aproximadamente 25 g com 3 esferas de óxido de zircônio

5.1.5 Peneiramento do material moído

O peneiramento do material moído foi realizado em duas etapas. Logo depois de um peneiramento preliminar com uma peneira de uso doméstico para eliminar os pedaços maiores e restos de fibras, realizou-se a primeira etapa de peneiramento sequencial manual utilizando peneiras confeccionadas em poliéster (Tenyl Tecidos Técnicos Ltda.) com abertura de malha decrescente de 500 μm , 354 μm e 250 μm .

Na segunda etapa a fração menor que 250 μm foi peneirada utilizando uma peneira vibratória marca Fritsch, modelo Analysette 3, e peneiras de abertura de malha de 160 μm , 140 μm , 125 μm e 100 μm . Separou-se a fração de granulometria menor que 100 μm para ser usada como material candidato a MR e continuar o processo de preparação.

Figura 5.2 – Peneira vibratória utilizada no peneiramento do candidato a material de referência

5.1.6 Homogeneização do candidato a MR

O candidato a MR foi homogeneizado por 72 h em homogeneizador em Y, marca Marconi, modelo MA 201/10 MO/E. O homogeneizador tem uma cuba de rotação constante a 30 rotações por minuto. A cuba está confeccionada em aço inoxidável revestido com politetrafluoroetileno e tem 10 l de capacidade.

Figura 5.3 – Homogeneizador em Y utilizado na homogeneização do candidato a material de referência

5.1.7 Envase do candidato a MR

O candidato a MR foi envasado imediatamente após o término da homogeneização em frascos âmbar previamente lavados e descontaminados como está descrito a seguir:

- Imersão em solução de Extran 2% (v/v) por 24 h.
- Enxague em água deionizada.
- Imersão em solução de HNO_3 10% (v/v) por 24 h.
- Enxague em água deionizada e água ultra pura (Milli-Q).
- Imersão em água ultra pura (Milli-Q) por 24 h.
- Secagem a temperatura ambiente em capela de fluxo laminar.

Após o envase, 175 frascos do candidato a MR foram obtidos, contendo uma massa média de 12,6 g cada frasco.

Figura 5.4 – Lote do candidato a material de referência após o envase

5.1.8 Armazenamento do candidato a MR

Durante todo o processo de preparação, caracterização e certificação, o lote de candidato a MR foi armazenado em freezer vertical marca Brastemp Flex a -22°C .

5.1.9 Esterilização com radiação gama

Um fator importante para assegurar a estabilidade do material é sua esterilização, para evitar a ação dos micro-organismos e consequente degradação da

matriz. A esterilização foi realizada com dose de radiação gama de 10 kGy, utilizando-se a fonte de ^{60}Co do Irradiador Multipropósito do Centro de Tecnologia das Radiações, CTR, do IPEN - CNEN/SP.

Uma dose de radiação gama de 10 kGy em geral garante a inativação de bactérias e fungos (FARKAS, 1998; MOLINS et al., 2001) e pode ser aplicada no material preparado já que não se pretende certificar nenhum composto orgânico, que poderia ser afetado pela alta dose.

5.2 Caracterização química e física do material

5.2.1 Medição da atividade microbiológica

Foi realizada a determinação da presença na amostra de bactérias aeróbias mesófilas e de fungos mesófilos totais, pelo método de contagem em placa. O método baseia-se na dissolução da amostra num caldo de cultivo adequado e nas sucessivas diluições desta dissolução da amostra inicial. Cada diluição é transferida assepticamente a placas de Petri contendo um meio de cultivo adequado para cada caso (Tryptic Soy Agar, para as bactérias, e Sabouraud Dextrosa Agar, para os fungos). As placas são incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por um período de 48 h. Logo após a incubação as colônias formadas nas placas são contadas, expressando-se os resultados em Unidades Formadoras de Colônias por ml.

As determinações foram realizadas com um frasco de amostra antes de ser irradiado (frasco nº 16) e com dois frascos após a irradiação. Os frascos escolhidos foram o nº 70 e o nº 147 que tinham uma posição oposta em relação à fonte de ^{60}Co utilizada na esterilização por radiação.

5.2.2 Determinação do teor de umidade

Depois do processo de homogeneização e antes do envase, o teor de umidade foi avaliado em 5 porções de aproximadamente 700 mg do material, utilizando balança determinadora de umidade Ohaus MB45. A balança realiza a secagem do material com um programa de aquecimento linear até 85°C , terminando o aquecimento quando a variação de massa for inferior a 1 mg durante 90 s. Como o valor obtido foi considerado satisfatório continuou-se com o processo de envase.

A determinação do teor de umidade residual do candidato a material de referência foi realizada nos frascos nº 26, 94 e 160, escolhidos do início, meio e fim do processo de envase de forma aleatória estratificada. O método utilizado para a determinação foi o método de secagem em estufa, marca Visomes Plus, a 85 °C até peso constante. Cada determinação foi realizada em triplicata utilizando uma balança analítica Shimadzu AUW220D.

5.2.3 Determinação da distribuição do tamanho de partículas

A distribuição do tamanho de partículas no candidato a material de referência foi determinada pelo método de granulometria por difração laser utilizando-se o analisador de tamanho de partícula CILAS 1064L do Centro de Ciências e Tecnologia de Materiais, CCTM, IPEN-CNEN/SP.

A determinação foi realizada em alíquotas dos frascos nº 6, 87 e 167 utilizando isopropanol p.a. (Casa Americana) como agente dispersante e ultrassonicação para favorecer a dispersão.

Os frascos foram escolhidos do início, meio e fim do processo de envase, para descartar qualquer diferença na composição granulométrica devida a uma possível estratificação do material sólido durante o processo.

Como comparação, também foram analisadas, nas mesmas condições, alíquotas dos materiais de referência certificados do NIST, SRM 1577c *Bovine liver* e do IRMM, ERM-BB 186 *Pig Kidney*.

5.2.4 Determinação de elementos por INAA

A técnica de Análise por Ativação Neutrônica Instrumental, método comparativo, foi utilizada para a determinação no candidato a material de referência dos elementos As, Cl, Co, Fe, K, Mg, Mn, Na, Se e Zn.

O procedimento experimental para a determinação dos elementos por INAA em todos os ensaios realizados consistiu na irradiação de cada uma das amostras, juntamente com padrões sintéticos de cada um dos elementos a analisar. A irradiação foi realizada sob um fluxo de nêutrons térmicos de $1,0$ a $4,6 \times 10^{12} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ no reator nuclear de pesquisa IEA-R1 do IPEN - CNEN/SP.

Como controle da qualidade e verificação da metodologia, foram analisados os materiais de referência certificados, MRC, SRM *Bovine liver* 1577b e SRM *Bovine liver* 1577c (NIST, 1991, 2009).

5.2.4.1 Preparo de amostras e padrões

Para a irradiação no reator, pesou-se em balança analítica Shimadzu Libror AEL 40 SM a quantidade necessária de amostra ou do MRC a ensaiar. As alíquotas foram pesadas em invólucros de polietileno previamente descontaminados com HNO₃ 10% e água ultrapura Milli-Q (Millipore Corporation, USA).

Para os ensaios de homogeneidade entre-frascos e estabilidade de curto e longo prazo foram pesadas alíquotas de aproximadamente 150 mg do material. Para o ensaio de homogeneidade intra-frasco foram pesadas alíquotas de 20, 50, 100, 150 e 250 mg.

Para o ensaio de micro-homogeneidade foram pesadas alíquotas de 1 e 2 mg.

Os padrões foram preparados a partir de soluções padrão certificadas do elemento de interesse, pipetadas em tiras de papel de filtro Whatman nº40. Todo o material volumétrico utilizado foi calibrado gravimetricamente antes de ser utilizado. Após secagem das tiras em capela de fluxo laminar, estas foram colocadas em invólucros de polietileno de forma tal a se obter geometria similar à das amostras.

Na Tabela 5.1 são apresentadas as características dos padrões preparados. Nos casos em que não existiam incompatibilidades químicas ou de propriedades nucleares, foram preparados padrões multielementares.

Tabela 5.1 – Padrões de calibração utilizados para INAA^a

Padrão	Elemento	Origem	Concentração solução padrão certificada, $\mu\text{g ml}^{-1}$	Massa resultante no padrão pipetado, μg
As	As	LGC Standards	1000 ± 3	$2,5 \pm 0,1$
Cl	Cl	SPEX Certiprep	10000 ± 100	249 ± 7
Mg	Mg	SPEX Certiprep	9997 ± 50	997 ± 11
Mn	Mn	SPEX Certiprep	1004 ± 2	$5,0 \pm 0,1$
NK	Na	SPEX Certiprep	9994 ± 50	499 ± 7
	K	SPEX Certiprep	10018 ± 50	1499 ± 12
F	Co	LGC Standards	997 ± 3	$2,5 \pm 0,1$
	Fe	SPEX Certiprep	10008 ± 30	499 ± 7
	Se	LGC Standards	1005 ± 6	$2,5 \pm 0,1$
	Zn	LGC Standards	1006 ± 2	$25,0 \pm 0,7$

^a incertezas expressadas como incertezas expandidas, com $k=2$ para um nível de confiança de aproximadamente 95%

5.2.4.2 Irradiação de amostras e medição

Nos ensaios de avaliação da homogeneidade entre frascos, intra-frasco e avaliação de estabilidade foram utilizadas as condições descritas a seguir.

Para analisar os elementos de meia vida de duração intermédia e longa (As, Co, Fe, K, Na, Se e Zn) os invólucros de polietileno contendo amostras, MRCs e padrões sintéticos foram irradiados pelo período de 6 h sob um fluxo de nêutrons térmicos de aproximadamente $4,6 \times 10^{12} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Para a detecção dos elementos de meia vida de duração intermédia (Na, K e As) realizou-se a medição da radiação gama induzida nas amostras por 1 hora, após aproximadamente 6 dias de decaimento.

Para a detecção dos elementos de meia vida de duração longa (Co, Fe, Se e Zn) realizou-se a medição da radiação gama induzida nas amostras por 6 h, após aproximadamente 21 dias de decaimento.

Para analisar os elementos de meia vida curta (Cl, Mg e Mn) os invólucros de polietileno contendo amostras, MRCs e padrões sintéticos foram irradiados por um período de 20 s. Imediatamente após a irradiação, realizou-se a medição da radiação gama induzida

nas amostras por 5 min, para detecção de Mg e Cl. Para a detecção do Mn realizou-se a medição da radiação gama induzida nas amostras por 5 min, após aproximadamente 40 min de decaimento.

Nos ensaios de avaliação de homogeneidade entre frascos e intra-frasco os ensaios para os elementos de meia vida longa (irradiação por 6 h) e os de meia vida curta (irradiação por 20 s) foram realizados em diferentes alíquotas das amostras.

Nos ensaios de estabilidade de curto e longo prazo as mesmas alíquotas de amostras irradiadas por 20 s no reator foram utilizadas para analisar os elementos de meias vidas mais longas. Após um período de tempo suficiente para a atividade das amostras decair, estas foram enviadas novamente ao reator para serem irradiadas durante o período de 6 h necessário para a determinação dos outros elementos.

No caso do ensaio de micro-homogeneidade, as condições de irradiação e medição tiveram que ser otimizadas para poder analisar as pequenas quantidades de amostra requeridas. Essas condições dependeram da concentração do elemento de interesse na amostra e de quanto o elemento é ativado sob o fluxo de nêutrons. A Tabela 5.2 resume as condições que foram consideradas melhores para a análise para cada um dos elementos determinados. O tempo de decaimento é o tempo entre o final do período de irradiação e o início da medição.

Tabela 5.2 – Condições utilizadas no estudo de micro-homogeneidade

Radionuclídeo	Tempo de irradiação	Tempo de decaimento	Tempo de medição
³⁸ Cl	60 s	0 e 1800 s	300, 1800 e 3600 s
⁶⁰ Co	16 h	7 a 17 d	50000 s
⁵⁹ Fe	16 h	7 a 17 d	50000 s
⁴² K	8 h	2 d	1800 s
²⁷ Mg	90 s	-	300 s
⁵⁶ Mn	60 s	1800 s	1800 e 3600 s
²⁴ Na	8 h	2 d	1800 s
⁷⁵ Se	16 h	7 to 17 d	50000 s
⁶⁵ Zn	16 h	7 to 17 d	50000 s

A medição das atividades gama dos radionuclídeos formados em todos os ensaios foi realizada usando um detector semiconductor de germânio hiperpuro marca Canberra, modelo GC2018 acoplado a um analisador de espectros digital DSA 1000 também de marca Canberra e a um computador.

Antes de se iniciar as medições das atividades gama dos radionuclídeos formados nas amostras e padrões, verificou-se o funcionamento do sistema de detecção por meio da medição de uma fonte de $^{57}\text{Co} + ^{60}\text{Co}$. Os espectros gama obtidos foram coletados e processados usando o programa Genie 2000 versão 3.1 de Canberra.

Na Tabela 5.3 são apresentados os dados nucleares dos radionuclídeos utilizados neste trabalho.

Tabela 5.3 – Dados nucleares dos radionuclídeos utilizados neste trabalho (IAEA, 2017)

Elemento	Radionuclídeo	Meia vida	Energia, keV
As	^{76}As	26,24 h	559,10
Cl	^{38}Cl	37,24 min	1642,7
Co	^{60}Co	1925,28 d	1173,24
Fe	^{59}Fe	44,495 d	1099,25
K	^{42}K	12,360 h	1524,58
Mg	^{27}Mg	9,458 min	843,76
Mn	^{56}Mn	154,734 min	846,8
Na	^{24}Na	14,997 h	1368,6
Se	^{75}Se	119,78 d	136,00
Zn	^{65}Zn	243,93 d	1115,6

5.2.5 Determinação de elementos por ICP-MS

A técnica de Espectrometria de Massas com Fonte de Plasma Acoplada Indutivamente, foi utilizada para a determinação no candidato a material de referência dos elementos As, cuja concentração estava abaixo do limite de detecção de INAA como é apresentado no capítulo de resultados, Cd, Cu e Pb. Foi utilizado o espectrômetro marca Agilent 7900 (Hachioji, TY, Japan) do Centro de Ciências Naturais e Humanas da Universidade Federal do ABC.

Como controle da qualidade e verificação da metodologia foram analisados os materiais de referência certificados, MRC, ERM BB 186 *Pig Kidney*, NRC DORM-4 *Fish Protein*, SRM 1577b *Bovine liver*, SRM 1577c *Bovine liver* e SRM 1566b *Oyster Tissue* (IRMM, 2012b; NRC, 2012; NIST 1991, 2009, 2015).

5.2.5.1 Preparo de amostras e padrões

Aproximadamente 200 mg de amostra ou do MRC a ensaiar foram pesados na balança analítica Ohaus Adventurer AR2140 em tubos de Teflon® marca MARSXpress, previamente descontaminados com HNO₃ 20% (v/v). As alíquotas foram submetidas à digestão ácida em meio oxidante no forno micro-ondas MARS 6 (CEM Corporation). Junto com cada lote de sub-amostras digeridas foram preparados e processados dois brancos de reagentes. Esses brancos continham os mesmos reagentes que os frascos contendo as amostras e foram processados simultaneamente.

Antes de realizar a digestão no forno, os tubos contendo as amostras, MRC e brancos e o HNO₃ 20% (Êxodo) foram deixados em repouso durante 12 h fazendo uma pré-digestão. Na Tabela 5.4 são apresentadas as condições utilizadas na digestão no forno de micro-ondas.

Tabela 5.4 – Condições utilizadas na digestão por micro-ondas

Ácido	10 ml de HNO ₃ p.a. 20%
Potência	103 – 1800 W
Rampa de aquecimento	20 a 25 minutos
Patamar	15 minutos
Temperatura máxima	200°C

Logo depois da digestão a solução das amostras foi esfriada a temperatura ambiente e diluída com água ultrapura Milli-Q (Millipore Corporation, USA) até alcançar uma concentração de HNO₃ de 4%.

Para a determinação analítica dos elementos de interesse, foi preparada uma curva de calibração de 8 pontos. Para a construção da curva foram utilizadas soluções padrão certificadas de cada um dos analitos (Perkin Elmer Pure Plus para As e Pb, SPEX Certiprep para Cd e Cu). A partir destas soluções padrão (Estoque 1), foi preparada uma solução multielementar (Estoque 2). Diluindo em forma apropriada esta solução intermediária foram preparados os 8 pontos da curva, com concentração aproximada de 1, 2, 5 10, 20, 50, 100 e 200 ng/ml. Todas as diluições foram feitas com HNO₃ 4% como diluente e água ultrapura Milli-Q (Millipore Corporation, USA) e o material volumétrico utilizado foi calibrado gravimetricamente antes de ser utilizado.

Na Tabela 5.5 são apresentadas as características das soluções utilizadas e os valores dos pontos da curva para cada elemento analisado.

Tabela 5.5 – Padrões de calibração utilizados para ICP-MS^a

Elemento	Concentração Estoque 1 µg ml ⁻¹	Concentração Estoque 2 µg ml ⁻¹	C1 ng ml ⁻¹	C2 ng ml ⁻¹	C3 ng ml ⁻¹
As	1000 ± 3	10,23 ± 0,15	1,04 ± 0,02	2,05 ± 0,04	5,11 ± 0,09
Cd	1000 ± 3	10,23 ± 0,15	1,04 ± 0,02	2,05 ± 0,04	5,11 ± 0,09
Cu	1001 ± 5	10,24 ± 0,15	1,04 ± 0,02	2,05 ± 0,04	5,11 ± 0,09
Pb	999 ± 3	10,22 ± 0,15	1,03 ± 0,02	2,05 ± 0,04	5,10 ± 0,09
Elemento	C4 ng ml ⁻¹	C5 ng ml ⁻¹	C6 ng ml ⁻¹	C7 ng ml ⁻¹	C8 ng ml ⁻¹
As	10,3 ± 0,2	20,6 ± 0,4	51,8 ± 1,2	102,5 ± 2,0	204,5 ± 3,1
Cd	10,3 ± 0,2	20,6 ± 0,4	51,8 ± 1,2	102,5 ± 2,0	204,5 ± 3,1
Cu	10,3 ± 0,2	20,6 ± 0,4	51,8 ± 1,2	102,6 ± 2,0	204,7 ± 3,3
Pb	10,3 ± 0,2	20,6 ± 0,4	51,7 ± 1,2	102,4 ± 2,0	204,3 ± 3,2

^a incertezas expressadas como incertezas expandidas, com k=2 para um nível de confiança de aproximadamente 95%

5.2.5.2 Condições de operação do ICP-MS

As condições utilizadas para a operação do ICP-MS são apresentadas na Tabela 5.6.

Tabela 5.6 – Condições de operação utilizadas na determinação de elementos por ICP-MS.

Isótopos utilizados na medição	^{75}As , ^{111}Cd , ^{63}Cu e ^{208}Pb
Padrões internos	^{193}Ir e ^{89}Y
Potência de radiofrequência	1550 W
Bomba de Nebulização	0.30 rps
Vazão de Argônio	15 l min ⁻¹
Vazão de gás de Nebulização	0.9 l min ⁻¹
Vazão de He	12.0 ml min ⁻¹
Célula de colisão	Helio (pureza > 99.999%)
Nebulizador	MiraMist TM
Interface	Cones de níquel
Cone de amostragem	1,00 mm
Skimmer	0,45mm

5.2.6 Determinação de mercúrio por CV AAS

A determinação de Hg foi realizada no LAN, utilizando-se Espectrometria de Absorção Atômica com geração de vapor frio, num espectrômetro Perkin Elmer FIMS (Flow Injection Mercury System) que faz a determinação por injeção em fluxo.

Como controle da qualidade e verificação da metodologia foram analisados os materiais de referência certificados, MRC, ERM BB 186 *Pig Kidney* e SRM 1566b *Oyster Tissue* (IRMM, 2012b; NIST, 2015).

5.2.6.1 Preparo de amostras, padrões e soluções complementares.

Aproximadamente 200 mg de amostra ou do MRC a ensaiar foram pesados na balança analítica Ohaus Adventurer AR2140 em tubos de Teflon® marca MARSXpress, previamente descontaminados com HNO₃ 20%. As alíquotas foram submetidas à digestão ácida em meio oxidante no forno micro-ondas MARS 6 (CEM Corporation). Junto com cada lote de sub-amostras digeridas foram preparados e processados dois brancos de reagentes. Esses brancos continham os mesmos reagentes que os frascos contendo as amostras e foram processados simultaneamente.

Antes de realizar a digestão no forno os tubos contendo as amostras, MRC e brancos e HNO_3 p.a. (Êxodo) concentrado foram deixados em repouso durante 12 h fazendo uma pré-digestão. Na Tabela 5.7 são apresentadas as condições utilizadas na digestão no forno micro-ondas.

Tabela 5.7 – Condições utilizadas na digestão por micro-ondas

Ácido	10 ml de HNO_3 p.a. concentrado
Potência	103 – 1800 W
Rampa de aquecimento	20 a 25 minutos
Patamar	15 minutos
Temperatura máxima	200°C

Logo depois da digestão, a solução das amostras foi esfriada a temperatura ambiente e diluída com água ultrapura Milli-Q (Millipore Corporation, USA) até alcançar uma concentração de HNO_3 de 8%.

Para a determinação analítica dos elementos de interesse foi preparada uma curva de calibração de 5 pontos. Para a construção da curva foi utilizada uma solução padrão certificadas marca LGC Standards de concentração $(1004 \pm 6) \mu\text{g ml}^{-1}$. A partir desta solução padrão foi preparada uma solução intermediária de concentração $(10042 \pm 98) \text{ ng ml}^{-1}$ e a partir de esta, uma terceira solução de concentração $(103 \pm 2) \text{ ng ml}^{-1}$. Diluindo de forma apropriada esta última solução, foram preparados os 5 pontos da curva, apresentados na Tabela 5.8.

Tabela 5.8 – Curva de calibração utilizada na determinação de Hg com CV AAS^a

Ponto da curva de calibração	Concentração de Hg ng ml^{-1}
Hg1	$0,222 \pm 0,007$
Hg2	$0,438 \pm 0,012$
Hg3	$0,651 \pm 0,018$
Hg4	$1,085 \pm 0,030$
Hg5	$1,512 \pm 0,041$

^a incertezas expressadas como incertezas expandidas, com $k=2$ para um nível de confiança de aproximadamente 95%

Como o espectrômetro FIMS opera por injeção em fluxo as soluções medidas devem ser injetadas em fluxo carregador. Este carregador é uma solução de HCl p.a. 3% (v/v) (Alphatec). Também é necessário agregar um agente redutor para que o mercúrio se encontre em estado metálico e possa desta forma ser arrastado pelo gás do sistema de injeção. O agente redutor utilizado foi uma solução de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,1% (m/v) (Merck) em HCl p.a. 3% (v/v) (Alphatec).

5.2.6.2 Condições de operação do CV AAS

As condições de operação do espectrômetro FIMS são apresentadas na Tabela 5.9. O ajuste da curva de calibração e o cálculo das concentrações foi realizado com o programa Winlab 32 for AA, versão 6.5.0.0266. O sinal analítico foi determinado considerando a altura do pico de absorção.

Tabela 5.9 – Condições de operação utilizadas na determinação de Hg por CV AAS

Volume de injeção	500 μl
Fluxo de carregador	11 ml min^{-1}
Fluxo de redutor	6 ml min^{-1}
Fluxo de argônio (gás de arraste)	50 ml min^{-1}

5.2.7 Avaliação da homogeneidade

Para o estudo de homogeneidade entre frascos foram escolhidos 10 frascos de forma aleatória estratificada. Os frascos escolhidos foram os frascos nº 1, 37, 55, 62, 76, 106, 117, 123, 156 e 171. Cinco sub-amostras de aproximadamente 150 mg de cada frasco foram analisadas por INAA para a determinação dos elementos As, Cl, Co, Fe, K, Mg, Mn, Na, Se e Zn.

Os ensaios realizados por ICP-MS e CV AAS foram realizados em 8 destes 10 frascos. Os frascos escolhidos foram os frascos nº 1, 37, 76, 106, 117, 123, 156 e 171. Quatro sub-amostras de aproximadamente 200 mg de cada frasco foram analisadas por

ICP-MS para a determinação dos elementos As, Cd, Cu e Pb. Quatro sub-amostras de aproximadamente 200 mg de cada frasco foram analisadas por CV AAS para a determinação do Hg. A redução no número de amostras nestas duas técnicas foi realizada para que todo o lote de amostras do estudo pudesse entrar na mesma digestão no forno de micro-ondas e, desta forma, diminuir um fator adicional de variabilidade.

O estudo da homogeneidade intra-frasco foi realizado utilizando o frasco nº66, também escolhido de forma aleatória. Foram analisadas cinco sub-amostras de cada uma das seguintes massas: 250, 150, 100, 50 e 20 mg por INAA.

Para o ensaio de micro-homogeneidade, foi utilizado o frasco nº52. Foram analisadas por INAA dez sub-amostras de aproximadamente 1mg para avaliar a micro-homogeneidade nos elementos Cl, K, Mn e Na e dez sub-amostras de aproximadamente 2 mg para avaliar os elementos Co, Fe, Mg, Se e Zn.

Não foram realizados os estudos de homogeneidade intra-frasco e microhomogeneidade para os elementos analisados por outras técnicas devido a que, por não tratar-se de técnicas diretas, a repetibilidade para as massas menores não seria o suficientemente pequena como para poder discriminar diferenças devidas à heterogeneidade no material.

Em todos os casos, as sub-amostras foram analisadas de forma aleatória para poder identificar possíveis tendências em função da ordem de medição e do preenchimento dos frascos.

O tratamento estatístico dos resultados foi realizado utilizando diversos programas. As análises de ANOVA e ANOVA da regressão foram realizadas com as funções estatísticas do Excel. Os diversos testes de estatística clássica (testes de normalidade, de Levene para homogeneidade de variâncias, Kruskal – Wallis, etc.) foram realizados com o programa PAST 3.17 (HAMMER et al., 2001). As análises multivariadas, PCA e HCA, foram realizados utilizando o programa Statistica 7.0 (STATSOFT, 2005).

5.2.8 Avaliação da estabilidade

Para diminuir a variabilidade analítica introduzida por realizar as medições durante um longo período de tempo, neste trabalho decidiu-se fazer um modelo de estudo do tipo isócrono (LINSINGER et al, 2004; LAMBERTY et al, 1998) no qual todos os

frascos envolvidos no estudo são analisados ao mesmo tempo, em condições de repetibilidade ao finalizar o ensaio.

Para o estudo de estabilidade a curto prazo foram escolhidos 9 frascos de forma aleatória. Os frascos nº31, 49, 74 e 142 foram armazenados a $20 \pm 3^\circ\text{C}$ (ambiente climatizado) por diferentes períodos de tempo (2, 4, 6 e 8 semanas). Os frascos nº33, 60, 136 e 150 foram armazenados a $50 \pm 2^\circ\text{C}$ (estufa Fanem Orion 515C) também pelo período de 2, 4, 6 e 8 semanas. O frasco nº144 foi armazenado a $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ (Freezer vertical Brastemp Flex) para ser usado como frasco controle.

Na Figura 5.5 é apresentado o planejamento do estudo de estabilidade de curto prazo. Os espaços sombreados representam o tempo de armazenamento de um determinado frasco a cada temperatura até o final do estudo, quando todas as medições foram realizadas.

Figura 5.5 – Estudo isócrono de estabilidade de curto prazo

Para os estudo de estabilidade a longo prazo foram escolhidos 9 frascos de forma aleatória. Os frascos nº10, 25, 28, 83, 105, 116, 135 e 153 foram expostos a ambiente climatizado a $20 \pm 3^\circ\text{C}$ por diferentes períodos de tempo (3, 6, 9 e 12 meses). O frasco nº30 foi armazenado a $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ (Freezer vertical Brastemp Flex) para ser usado como frasco de controle.

Da mesma forma que para o caso da estabilidade a curto prazo, na Figura 5.6 se apresenta o planejamento do estudo de estabilidade de longo prazo.

Figura 5.6 – Estudo isócrono de estabilidade de longo prazo

		Tempo (meses)			
		12	9	6	3
Temperatura	20°C	10			
		153			
			83		
		105		28	
				135	
					25
					116
-20°C		30			

Medição das amostras

O fato de se utilizar dois frascos para cada tempo é uma forma de minimizar a influência de heterogeneidades entre-frascos, no caso de existir (LINSINGER et al, 2004). Como o estudo de estabilidade foi planejado antes de estar pronta a avaliação da homogeneidade entre frascos foi escolhido este esquema para poder realizar uma avaliação mais adequada no caso da existir alguma heterogeneidade.

Em ambos estudos, 3 sub amostras de cada um dos frascos foram analisadas por INAA para a determinação dos elementos As, Cl, Co, Fe, K, Mg, Mn, Na, Se e Zn, por ICP-MS para a determinação de As, Cd, Cu e Pb e por CV AAS para a determinação de Hg.

Todas as sub-amostras foram analisadas de forma aleatória.

O tratamento estatístico dos resultados foi realizado com os mesmos programas descritos na avaliação da homogeneidade.

5.3 Certificação do candidato a MR

Para a atribuição de valor às propriedades de interesse no candidato a MR, foi organizado um ensaio interlaboratorial com laboratórios especializados do Brasil e do exterior. Para a organização deste ensaio foram seguidas as diretrizes aceitas internacionalmente, descritas na ISO 17043 (ISO, 2010) e no protocolo da União Internacional de Química Pura e Aplicada, IUPAC (THOMPSON et al, 2006). Para a análise estatística dos resultados do ensaio interlaboratorial, foram utilizados métodos estatísticos robustos tais como os descritos na norma ISO 13528 (ISO, 2015d).

O Programa de comparação interlaboratorial também ofereceu uma ferramenta para que os laboratórios participantes pudessem avaliar seu desempenho analítico nos elementos de interesse.

Os elementos de interesse para a caracterização foram As, Cd, Cl, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Na, Pb, Se e Zn, mas os participantes foram convidados a realizar qualquer outra determinação que fosse de seu interesse.

Junto com as amostras do candidato a material de referência de rim bovino foi enviado o material de referência certificado **IPEN 001-Trace element in fish tissue** como controle de qualidade, o que forneceu uma ferramenta adicional para avaliar os resultados produzidos pelos laboratórios participantes. A descrição e valores de concentração deste MRC são apresentados no Anexo A.

Em uma primeira etapa, foram preparadas as cartas convite (em português, espanhol e inglês) e foram enviadas aos possíveis participantes. Também foram preparados as instruções para medição nas três línguas para ser enviados junto com as amostras, as etiquetas e o material de embalagem e as planilhas para que os laboratórios informassem os resultados das análises. Trinta e três laboratórios confirmaram sua participação, sendo 26 do Brasil e 7 do exterior. A lista de participantes se encontra no Apêndice A.

Os frascos do candidato a MR e do MRC enviado como amostra de controle foram etiquetados e acondicionados em caixas adequadas, contendo as instruções de medição. As caixas foram enviadas pelo correio aos laboratórios participantes.

A versão em português da Carta convite e as Instruções de medição enviadas aos participantes são apresentadas no Apêndice B.

Solicitou-se que os participantes fizessem três determinações independentes dos elementos em cada frasco, utilizando métodos a sua escolha e que enviassem os

resultados expressados em mg kg^{-1} , em massa seca, juntamente com descrição do método utilizado.

Como a determinação do teor de umidade é um parâmetro definido pelo método de medição, é importante a aplicação da mesma metodologia para que seja possível comparar os resultados obtidos nos diferentes laboratórios. Por este motivo foi recomendado um protocolo para a determinação da umidade. O protocolo recomendado foi secar uma alíquota independente de cada frasco (diferente da utilizada para análise) de 1g em estufa a $85^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ até massa constante.

A comparação e avaliação dos resultados permitiram escolher o melhor valor para os analitos que se pretendia certificar e sua correspondente incerteza. Esta avaliação é apresentada no Capítulo 6. Resultados e Discussão.

Ao finalizar a avaliação foi enviado aos participantes um relatório contendo um resumo das etapas de preparação e caracterização do material e da avaliação dos resultados para que os participantes tivessem um retorno da sua participação.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Determinação da atividade microbiológica

Foi realizada a determinação da presença na amostra de bactérias aeróbias mesófilas e de fungos mesófilos totais, pelo método de contagem em placa. Estes grupos compreendem uma grande variedade de micro-organismos que são os responsáveis pela degradação nos alimentos.

As determinações foram realizadas num frasco de amostra antes de ser irradiado (frasco nº16) para se conhecer a carga inicial de bactérias e fungos na amostra e em dois frascos irradiados em posições opostas em relação à fonte de ^{60}Co utilizada na esterilização, para verificar a efetividade do processo. Na Tabela 6.1 são apresentados os resultados obtidos.

Tabela 6.1 – Atividade microbiológica por grama de amostra seca, expressada em unidades formadoras de colônias (UFC).

nº frasco	Bactérias mesófilas totais (UFC/g)	Fungos mesófilos totais (UFC/g)
16	$1,4 \times 10^3$	< 10
70	< 10	< 10
147	< 10	< 10

Para avaliar a carga inicial de bactérias obtidas na amostra o valor foi comparado com os valores estabelecidos pela ANVISA no seu regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos (ANVISA, 2001). Neste regulamento, só figuram limites para os micro-organismos patógenos, como Coliformes e Salmonella, já que este visa proteger a saúde da população e não a degradação do alimento. Porém, o valor indicado para carnes cruas preparadas, bovinas, suínas e de outros mamíferos, refrigeradas ou congeladas, é de 10^4 UFC/g que é maior que o valor obtido na amostra analisada para a carga total. Um fato a considerar é que o valor de $1,4 \times 10^3$ UFC/g obtido na amostra seca é equivalente a 350 UFC por g de rim in natura, considerando um teor de umidade de 75%

no rim fresco. Ester valor é muito baixo, sendo o esperado considerando que os rins vêm de animais criados sob controle sanitário e que os rins foram congelados imediatamente depois do abate.

Nas duas amostras irradiadas não foi observado nenhum crescimento de bactérias nem de fungos, demonstrando que a dose de 10 kGy escolhida foi suficiente para esterilizar as amostras, independentemente de sua posição em relação à fonte de ^{60}Co . Este resultado era o esperado já que a dose utilizada é uma dose alta e a carga inicial de bactérias na amostra é baixa.

6.2 Determinação do teor de umidade residual

Antes do envase, o teor de umidade foi avaliado em 5 porções de aproximadamente 700 mg do material, utilizando-se balança determinadora de umidade OHAUS MB45, com programa de aquecimento linear até 85°C. O valor obtido, de aproximadamente 5 % de umidade, foi considerado satisfatório e, portanto, continuou-se com o processo de envase.

Como os MR biológicos são higroscópicos e, portanto, têm a tendência de adquirir umidade durante o manuseio, a determinação do teor de umidade residual do candidato a material de referência foi realizada em 3 frascos escolhidos dos diferentes estágios de envase (início, meio e fim). Cada determinação foi realizada em triplicata. Na Tabela 6.2 são apresentados os resultados obtidos nas amostras analisadas.

Tabela 6.2 – Dados de umidade obtidos nas amostras analisadas

n° frasco	Umidade ^a , %	n° de determinações, n
26	5,14 ± 0,07	3
94	5,07 ± 0,02	3
160	5,25 ± 0,04	3
Valor médio	5,15 ± 0,05	9

^a média e intervalo de confiança de 95% calculado utilizando o desvio padrão das n determinações

Os resultados obtidos para o teor de umidade foram considerados satisfatórios para garantir a estabilidade do material. Não foram observadas tendências em função da ordem de preenchimento dos frascos no processo de envase.

6.3 Determinação da distribuição do tamanho de partículas

A técnica de determinação da distribuição de tamanho de partícula por difractometria laser baseia-se no fenômeno de que as partículas dispersam a luz incidente em todas as direcções, com um padrão de intensidade que é dependente do tamanho da partícula. Quando não são conhecidas as propriedades ópticas da amostra analisada é preciso aplicar aproximações para obter os resultados. Neste trabalho foi aplicada a aproximação de Fraunhofer, que é adequada para amostras com diâmetro de partícula maior que 50 μm (ISO, 1999). Na Figura 6.1 pode ser observada a distribuição granulométrica sobreposta dos três frascos analisados.

Figura 6.1 – Distribuição granulométrica para os três frascos do candidato a MR analisados.

Como pode ser observado, existe grande semelhança entre as distribuições granulométricas para os três frascos analisados o que demonstra que não houve estratificação do pó durante o processo de envase e que os diferentes frascos são homogêneos do ponto de vista da granulometria. O valor médio obtido para o diâmetro a 90% foi de 78 μm , o que significa que 90% das partículas dentro do material estão abaixo dessa granulometria. O diâmetro médio obtido foi de 33,5 μm .

Como comparação, junto com o candidato a MR foram analisados dois materiais de referência certificados de matriz similar. Na Figura 6.2 são apresentados os resultados obtidos para estes materiais junto com o MR candidato de rim bovino.

Figura 6.2 – Comparação da distribuição granulométrica do candidato a MR de rim bovino e outros MRC de matriz similar.

O candidato a MR de rim bovino apresentou distribuição similar ao MRC ERM BB *Pig Kidney*. Isto é devido provavelmente a que ambos os materiais foram moídos utilizando um processo equivalente, enquanto que o material do NIST SRM 1577c *Bovine liver*, foi preparado utilizando um moinho tipo “*Jet-mill*” que permite obter materiais de granulometria muito menor.

Por último, foi realizado ajuste da curva normal na distribuição granulométrica utilizando-se o programa Microcal Origin® 6.0 (Microcal Software Inc.). O resultado obtido é apresentado na Figura 6.3.

Figura 6.3 – Ajuste de curva gaussiana a distribuição granulométrica do candidato a MR de rim bovino.

Do resultado obtido pode se considerar que a distribuição granulométrica é aproximadamente normal ($R^2 = 0,85$). O desvio da normalidade observado pode ser devido ao uso da aproximação de Fraunhofer no cálculo que, para granulometrias menores que 50 μm , pode dar lugar a esse tipo de distorções (ISO, 1999).

Da avaliação do conjunto de resultados obtidos pode-se afirmar que a distribuição granulométrica do candidato a MR do rim bovino é adequada para se tornar um material de referência certificado.

6.4 Caracterização de alguns dos parâmetros de validação das metodologias utilizadas.

Neste trabalho foram caracterizados alguns dos parâmetros mais relevantes da validação das metodologias utilizadas. Em particular, foram determinados os limites de detecção e quantificação que são muito dependentes da matriz que está sendo analisada, a veracidade, através da medição de matérias de referência certificados, e a incerteza de medição que, ainda que não seja uma característica do desempenho do método, é uma característica importante dos resultados obtidos utilizando dito método.

Uma validação completa do método de análise por ativação do LAN pode ser consultada na dissertação de mestrado de PETRONI (2015).

6.4.1 Determinação dos limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (L_D) está definido como a menor concentração de um determinado analito que pode ser detectada por um determinado método com um determinado nível de confiança. O limite de quantificação (L_Q) indica o valor a partir do qual é possível fazer uma afirmação quantitativa do resultado de uma medição, com uma determinada incerteza. (MAGNUSSON e ÖRNEMARK, 2014)

Existem diversas maneiras para se estimar os limites de detecção e de quantificação de um método analítico. No caso das determinações realizadas com o método de Análise por Ativação Neutrônica, foi utilizado para o cálculo o método proposto por Currie (CURRIE, 1999) de acordo com as equações 6.1 a 6.3.

$$L_D = 3,29 \sigma_0 \quad (6.1)$$

$$L_Q = 10 \sigma_0 \quad (6.2)$$

$$\sigma_0 = \frac{\sqrt{RT}}{t_v} \quad (6.3)$$

onde,

RT é o numero de contagens da radiação de fundo sob o pico do analito;

t_v é o tempo total de medição da amostra (massa de amostra: 150 mg).

Os resultados obtidos para os limites de detecção e quantificação obtidos para os elementos analisados por INAA são apresentados na Tabela 6.3

Tabela 6.3 – Limites de detecção e de quantificação dos elementos analisados por INAA

Elemento	$L_D, \text{mg kg}^{-1}$	$L_Q, \text{mg kg}^{-1}$	Elemento	$L_D, \text{mg kg}^{-1}$	$L_Q, \text{mg kg}^{-1}$
As	0,34	1,04	Mg	145	440
Cl	68	207	Mn	0,36	1,1
Co	0,009	0,028	Na	10,1	30,6
Fe	5,5	16,6	Se	0,24	0,72
K	2100	6400	Zn	0,26	0,78

Em todas as amostras analisadas no candidato a MR de rim bovino, o analito As encontrou-se abaixo do limite de detecção da técnica INAA. Por este motivo decidiu-se fazer a determinação deste analito pela técnica de ICP-MS.

Para os elementos restantes, os limites de detecção e quantificação foram considerados adequados para a determinação destes elementos na matriz de rim bovino, uma vez que os valores de concentração obtidos neste material foram maiores que o limite de quantificação para todos os elementos.

Para o caso dos analitos que foram determinados por CV AAS e ICP-MS o limite de detecção foi calculado utilizando as Equações 6.4 e 6.5 (SKOOG et al, 2014).

$$LD = 3 \frac{\sigma_B}{a} \quad (6.4)$$

$$LQ = 10 \frac{\sigma_B}{a} \quad (6.5)$$

onde,

σ_B é desvio padrão de 10 determinações do branco analítico;

a é o coeficiente angular (inclinação) da curva analítica de calibração.

Na Tabela 6.4 são apresentados os resultados obtidos para os limites de detecção e quantificação nos elementos analisados por CV AAS e ICP-MS.

Tabela 6.4 – Limites de detecção e de quantificação dos elementos analisados por CV AAS e ICP-MS

Elemento	LD, $\mu\text{g kg}^{-1}$	LQ, $\mu\text{g kg}^{-1}$
As	3,5	12
Cd	2,5	8
Cu	58	193
Hg	1,4	4,8
Pb	4,8	16

Os limites de detecção e quantificação também foram considerados adequados para a determinação destes elementos no candidato a material de referência de rim bovino devido a que, para todos os casos, os valores de concentração obtidos foram mais elevados que o limite de quantificação.

6.4.2. Análises de materiais de referência certificados.

Com o intuito de se obter uma estimativa quantitativa da veracidade dos valores de concentração obtidos com as diferentes técnicas analíticas utilizadas neste trabalho foram utilizados os MRC, ERM BB 186 *Pig Kidney*, NRC DORM-4 *Fish Protein*, SRM 1577b *Bovine liver*, SRM 1577c *Bovine liver* e SRM 1566b *Oyster Tissue* (IRMM, 2012b; NRC, 2012; NIST 1991, 2009, 2015). Estes MRC foram medidos, junto com as amostras do candidato a MR de rim bovino, durante os ensaios de avaliação de homogeneidade e estabilidade do material.

Para avaliar se a diferença absoluta obtida entre um resultado e o valor certificado (Δx) é aceitável, em primeiro lugar tem que se calcular esta diferença,

$$\Delta x = |x_i - x_{ref}| \quad (6.6)$$

onde:

x_i = Valor obtido experimentalmente

x_{ref} = Valor certificado do MRC,

A incerteza de Δx , u_Δ , pode ser estimada como,

$$u_\Delta = \sqrt{u_i^2 + u_{ref}^2} \quad (6.7)$$

onde,

u_i = Incerteza padrão da medição.

u_{ref} = Incerteza padrão do valor certificado.

A incerteza expandida da diferença, U_Δ , correspondente a um nível de confiança de 95% é obtida multiplicando u_Δ pelo fator de abrangência $k=2$

$$U_\Delta = 2 * u_\Delta \quad (6.8)$$

Segundo as recomendações da Comissão Européia de materiais de referência (LINSINGER, 2010) não existem diferenças significativas entre o resultado obtido pela aplicação de um determinado método de medição e o valor certificado para o MRC quando,

$$\Delta x \leq U_\Delta \quad (6.9)$$

Quando expressa por extenso, esta relação resulta no parâmetro En (ISO, 2015d) tal como se apresenta na Equação 6.10.

$$En = \frac{(x_i - x_{ref})}{\sqrt{(U_i^2 + U_{ref}^2)}} \quad (6.10)$$

No presente trabalho o valor obtido experimentalmente, x_i , foi calculado como valor médio correspondente às n determinações realizadas para cada MRC. A incerteza expandida da medição, U_i , foi calculada multiplicando a incerteza padrão, calculada usando o desvio padrão da média, por um fator de abrangência, k , escolhido com base no valor da distribuição t de Student bicaudal para $(n - 1)$ graus de liberdade e 95% confiança,

Os resultados obtidos para os MRCs são considerados satisfatórios quando $|En| < 1$. Ao contrário, os resultados são considerados não satisfatórios quando $|En| \geq 1$.

As Tabelas 6.5 a 6.7 apresentam os valores obtidos e os valores certificados dos analitos de interesse nos MRC analisados por cada uma das técnicas utilizadas, junto com suas respectivas incertezas expandidas. Também são apresentados os valores de En obtidos em cada caso. Para uma melhor visualização dos resultados, estes são apresentados graficamente na Figura 6.4.

Tabela 6.5 – Valores certificados, valores medidos e valores de En calculados para os MRCs analisados por INAA.

Elemento	SRM 1577b	Valor obtido	E _n	SRM 1577c	Valor obtido	E _n
As, mg kg ⁻¹	0,05 ^a	< 0,34	-	0,0196 ± 0,0014	< 0,34	-
Cl, %	0,278 ± 0,007	na	-	0,287 ± 0,013 ^b	0,285 ± 0,024	-0,07
Co, mg kg ⁻¹	0,25 ^a	0,241 ± 0,008	-	0,300 ± 0,018	0,309 ± 0,008	0,5
Fe, mg kg ⁻¹	184 ± 15	194,3 ± 6,3	0,6	197,94 ± 0,95	195,6 ± 5,6	-0,4
K, %	0,994 ± 0,002	1,03 ± 0,12	0,3	1,023 ± 0,064	1,11 ± 0,11	0,7
Mg, mg kg ⁻¹	601 ± 28	na	-	620 ± 42	621 ± 50	0,01
Mn, mg kg ⁻¹	10,5 ± 1,7	na	-	10,46 ± 0,47	10,3 ± 1,2	-0,1
Na, %	0,242 ± 0,006	0,246 ± 0,011	0,3	0,2033 ± 0,0064	0,195 ± 0,008	-0,8
Se, mg kg ⁻¹	0,73 ± 0,06	0,79 ± 0,11	0,5	2,031 ± 0,045	2,13 ± 0,11	0,8
Zn, mg kg ⁻¹	127 ± 16	124,7 ± 2,9	-0,1	181,1 ± 1,0	177,3 ± 5,1	-0,7

^avalor informativo, ^bvalor de referência, na=não analisado; n (número de determinações realizadas) = 10.

Tabela 6.6 – Valores certificados, valores medidos e valores de E_n calculados para os MRCs analisados por ICP-MS.

Elemento	SRM 1577b	Valor obtido	E_n	SRM 1577c	Valor obtido	E_n
As, mg kg ⁻¹	0,05 ^a	0,07 ± 0,02	-	0,0196 ± 0,0014	0,022 ± 0,008	0,3
Cd, mg kg ⁻¹	0,50 ± 0,03	0,42 ± 0,07	-0,98	0,097 ± 0,001	na	-
Cu, mg kg ⁻¹	160 ± 8	153 ± 21	-0,3	275,0 ± 4,6	257 ± 28	-0,6
Elemento	ERM BB186	Valor obtido	E_n	DORM-4	Valor obtido	E_n
As, mg kg ⁻¹	0,008 ^a	na	-	6,80 ± 0,64	7,75 ± 1,07	0,8
Cd, mg kg ⁻¹	1,09 ± 0,05	0,90 ± 0,16	-1,2	0,306 ± 0,015	0,185 ± 0,030	-3,6
Cu, mg kg ⁻¹	36,5 ± 1,8	31,6 ± 5,4	-0,9	15,9 ± 0,9	15,2 ± 2,0	-0,3
Elemento	SRM 1566b	Valor obtido	E_n			
As, mg kg ⁻¹	7,65 ± 0,65	8,8 ± 1,1	0,9			
Cd, mg kg ⁻¹	2,48 ± 0,08	2,3 ± 0,3	-0,5			
Cu, mg kg ⁻¹	71,6 ± 1,6	62,2 ± 8,0	-1,2			

^a valor informativo; na = não analisado; n (número de determinações realizadas) = 3.

Tabela 6.7 – Valores certificados, valores medidos e valores de E_n calculados para o Hg nos MRCs analisados por CV AAS.

MRC	Valor certificado, µg kg ⁻¹	Valor obtido, µg kg ⁻¹	E_n
ERM BB 186	23 ± 11 ^a	20 ± 6	-0,3
SRM 1577c	5,36 ± 0,17	7,4 ± 3,4	0,6
SRM 1566b	37,1 ± 1,3	35,4 ± 8,7	-0,2
DORM-4	410 ± 55	412 ± 68	0,02

^a valor informativo; n (número de determinações realizadas) = 3.

Figura 6.4 – Valores de $|En|$ obtidos para os MRC analisados por NAA, ICP-MS e CV AAS.

Como pode ser observado, os valores de En foram satisfatórios em todos os casos para os métodos de INAA e CV AAS, indicando que são adequados para a caracterização do material de referência.

Não foram apresentados os resultados obtidos para o elemento Pb uma vez que os valores obtidos para este elemento em todos os MRC analisados apresentaram um desvio muito alto e foram considerados não aceitáveis. Este fato é discutido mais extensamente no estudo de homogeneidade deste elemento.

No caso do Cd foram obtidos valores maiores que um para a maioria dos MRC analisados, indicando a presença de um desvio sistemático (“*bias*”) significativo na metodologia aplicada. Apesar de não ser o caso ideal, o método ainda pode ser utilizado para a avaliação da homogeneidade e estabilidade do material se o desvio for constante durante todo o período no qual as determinações foram realizadas. No caso de um desvio constante, ele não afetará nem a variabilidade relativa obtida para os frascos no estudo de homogeneidade, nem a inclinação das curvas de tendência em função do tempo nos estudos de estabilidade (LINSINGER et al., 2001b). Como a técnica de ICP-MS é uma técnica muito rápida, todas as determinações realizadas para o Cd no presente trabalho foram feitas num período muito curto de tempo e utilizando a mesma curva de calibração, por conseguinte, se considerou-se o desvio constante para todas as medições realizadas. No caso dos estudos de estabilidade de curto e longo prazo, isto foi possível devido a que foram realizados de acordo com um planejamento isócrono, onde todas as amostras são analisadas ao mesmo tempo no final do ensaio.

6.4.3 Incertezas de medição.

O Vocabulário Internacional de Metrologia, VIM, define a incerteza como o “parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas” (JCGM, 2012), em outras palavras, a incerteza é um parâmetro que caracteriza o intervalo de valores dentro do qual pode se encontrar o valor verdadeiro de uma medição, com um determinado nível de confiança. Atualmente sua determinação é um requisito indispensável, e em muitos casos obrigatório, de toda medição analítica já que permite avaliar a sua qualidade e realizar uma correta interpretação dos resultados.

As orientações aceitas internacionalmente para a avaliação da incerteza estão descritos no Guia para a Expressão de Incerteza de Medição, GUM, (JCGM, 2008). Estas orientações, adaptadas especificamente para aplicações na química analítica, podem ser achadas no Guia EURACHEM/CITAC para quantificação de incertezas de medição nas medições analíticas (ELLISON e WILLIAMS, 2012).

O processo para avaliação da incerteza de uma medição pode ser resumido em quatro passos básicos: especificação do mensurando, identificação das fontes de incerteza, quantificação das contribuições das fontes e por último, o cálculo da incerteza padrão combinada, combinando as diferentes contribuições estimadas na forma de incerteza expandida. A especificação do mensurando deve estar acompanhada pelo modelo matemático utilizado para sua quantificação. A identificação das fontes de incerteza deve ser o mais abrangente possível, embora depois algumas delas que possam ser consideradas desprezíveis. Existem vários enfoques possíveis para realizar a quantificação da contribuição das fontes de incerteza individuais na incerteza final (ELLISON e WILLIAMS, 2012; EUROLAB, 2006, 2007). O primeiro enfoque é o enfoque do “modelo” ou “bottom-up” onde o modelo matemático é totalmente conhecido e cada quantidade envolvida no cálculo tem uma incerteza associada que é estimada individualmente. Este enfoque é também chamado de enfoque do GUM, nome que leva a engano, já que o enfoque descrito a seguir também segue as orientações indicadas neste guia. O segundo enfoque é o enfoque “empírico” ou “top-bottom”. Neste enfoque não são quantificadas as fontes individuais de incerteza senão que está baseado na avaliação de desempenho do método. Esta avaliação deve estar projetada e realizada de forma tal para abarcar os efeitos de todas as fontes de incerteza relevantes. Os dados utilizados nesta abordagem são tipicamente dados de precisão obtidos nos estudos de validação do método, dados de controle de qualidade e testes de proficiência.

A seguir é apresentada a estimativa da incerteza de medição realizada no presente trabalho. Os resultados foram separados em dois grupos, baseado no enfoque escolhido para quantificação das contribuições das diferentes fontes de incerteza.

6.4.3.1 Avaliação das incertezas de medição associadas aos resultados obtidos por INAA

Neste caso, o mensurando é a concentração de cada um dos elementos analisados por INAA, método comparativo, no candidato a material de referência de rim bovino e a relação matemática para o cálculo desta concentração é a Equação 4.1 já apresentada no item 4.1.1

$$C_a = \frac{m_p \times A_a \times e^{\lambda(t_{da} - t_{dp})}}{M_a \times A_p} \quad (4.1)$$

onde λ é a constante de decaimento anteriormente expressada como $\ln 2 / t_{1/2}$, os índices a e p representam amostra e padrão respectivamente e;

A = taxa de contagem do radionuclídeo considerado;

M_a = massa total de amostra;

$t_{1/2}$ = tempo de vida meia do radionuclídeo;

m_p = massa do elemento no padrão;

C_a = concentração do elemento na amostra;

t_d = tempo de decaimento.

As fontes de incerteza associadas à INAA têm sido extensamente estudadas e descritas por vários autores (KUČERA et al., 2004; GREENBERG, 2008; GREENBERG et al., 2011). As consideradas neste trabalho são as descritas para o LAN por Moreira et al. (2006) e que se apresentam na Figura 6.5.

Figura 6.5 – Diagrama de causa e efeito para a determinação da concentração dos elementos analisados por INAA

Fonte: Moreira et al. (2006)

Como no caso de INAA as fontes de incertezas estão muito bem definidas e estudadas optou-se por avaliar as fontes individuais de incerteza utilizando o enfoque mais tradicional. As fontes associadas a diferenças na geometria e a auto atenuação de raios gama foram consideradas desprezíveis em base a estudos anteriores. Das fontes restantes a que apresentou uma maior contribuição no cálculo de incerteza foi a relacionada com a estatística de contagem da atividade da amostra. A incerteza padrão foi calculada combinando as diferentes fontes e foi aplicado um fator de abrangência $k=2$ para se obter um nível de confiança de 95% no resultado.

Na Tabela 6.8 são apresentados dados típicos de concentração e incerteza expandida obtidos no candidato a material de referência de rim.

Tabela 6.8 – Dados de concentração e incerteza expandida, em mg kg⁻¹, obtidos por INAA para uma amostra do candidato a material de referência de rim bovino (base úmida)

Elemento	Concentração ^a , mg kg ⁻¹	U, %
Cl	9304 ± 226	4,8
Co	1,655 ± 0,030	3,6
Fe	248,6 ± 5,5	4,4
K	11403 ± 796	14
Mg	997,3 ± 21,7	6,8
Mn	4,47 ± 0,24	10,8
Na	8143 ± 64	1,6
Se	7,04 ± 0,15	4,2
Zn	89,7 ± 3,2	3,6

^a incertezas expandidas (k = 2) para um nível de confiança de 95%

Os valores obtidos para incerteza expandida na maioria dos elementos se encontram abaixo de 10% e são considerados adequados para o uso pretendido do material de referência de rim.

6.4.3.2 Avaliação das incertezas de medição associadas aos resultados obtidos por ICP-MS e CV AAS

Neste caso, o mensurando é a concentração de cada um dos elementos analisados pelas duas técnicas no candidato a material de referência de rim bovino e a relação matemática para o cálculo desta concentração está descrita pela Equação 6.11.

$$C_a = \frac{A - b}{a} \times \frac{V}{M} \times f_{REC} \quad (6.11)$$

onde

C_a é a concentração do elemento na amostra;

A é o sinal produzido pelo analito a determinar. No caso do ICP-MS são as contagens por segundo, CPS, e no caso de CV AAS a absorbância da amostra;

b é o coeficiente linear da curva analítica;

a é o coeficiente angular da curva analítica;

V é o volume da amostra digerida;

M é a massa da amostra;

f_{REC} é o fator de recuperação.

As fontes de incerteza identificadas estão representadas no diagrama de causa e efeito mostrado na Figura 6.6.

Figura 6.6 – Diagrama de causa e efeito para a determinação da concentração dos elementos analisados por ICP-MS e CV AAS

Como pode ser observado na figura, a quantidade de fatores a levar em consideração e avaliar são muitos e, em muitos casos, estão correlacionados, motivo pelo qual decidiu-se fazer uma abordagem empírica em lugar de determinar as fontes de incerteza individuais. No enfoque empírico a estimativa das incertezas está baseada no princípio básico:

$$\text{exatidão} = \text{veracidade} + \text{precisão}.$$

A incerteza é então estimada utilizando a Equação 6.12

$$u = \sqrt{s^2 + b^2} \quad (6.12)$$

Onde

s é o desvio padrão que caracteriza a precisão do método utilizado;

b é um termo relacionado com efeitos sistemáticos (tendência ou “*bias*”) na medição.

Como desvio padrão s, foi utilizado o desvio de reprodutibilidade intermédia estimado a partir de uma grande quantidade de resultados obtidos para o material analisado. Para estimar o termo b foram utilizadas as diferenças obtidas na análise dos materiais de referência certificados mencionados no item 6.4.2.

Na Tabela 6.9 são apresentados dados típicos de concentração e incerteza expandida obtidos no candidato a material de referência de rim.

Tabela 6.9 – Dados de concentração e incerteza expandida, em mg kg⁻¹, obtidos por ICP-MS e CV AAS para uma amostra do candidato a material de referência de rim bovino (base úmida).

Elemento	Concentração ^a , mg kg ⁻¹	U, %
As	0,189 ± 0,029	15
Cd	0,109 ± 0,044	40
Cu	18,5 ± 1,7	9
Hg	0,035 ± 0,014	40

^a incertezas expandidas (k = 2) para um nível de confiança de 95%

Como pode ser observado os valores obtidos para o Cd e o Hg são elevados. Este fato se deve a que a dispersão obtida tanto nas determinações das amostras quanto dos materiais de referência resultou elevada (aproximadamente 20%). No caso do Hg isso é aceitável tendo em conta que o elemento se encontra em uma concentração muito baixa. No caso do Cd a concentração é um pouco maior e a variabilidade pode ser devida à presença de alguma contaminação introduzida no tratamento das amostras, como será discutido mais adiante na avaliação da homogeneidade do elemento.

6.5 Avaliação da homogeneidade

6.5.1 Avaliação da homogeneidade dos elementos analisados por INAA

6.5.1.1 Homogeneidade entre frascos

Para o estudo de homogeneidade entre frascos por INAA foram escolhidos 10 frascos de forma aleatória estratificada. Cinco sub-amostras de aproximadamente 150 mg de cada frasco foram analisadas por INAA para a determinação dos elementos As, Cl, Co, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Na, Se e Zn. As sub-amostras foram analisadas de forma aleatória.

Na Tabela 6.10 são apresentados os valores médios e incertezas expandidas obtidos nos frascos analisados no estudo de homogeneidade entre frascos. A incerteza padrão foi calculada usando o desvio padrão da média e o fator de abrangência, k , usado para expandir a incerteza, foi escolhido com base no valor da distribuição t de Student bicaudal para $(n - 1)$ graus de liberdade e 95% confiança.

Tabela 6.10 – Concentrações obtidas por INAA para cada um dos frascos analisados do candidato a material de referência no estudo de homogeneidade entre frascos (base úmida)^a

Frasco	Cl, %	Co, mg kg ⁻¹	Fe, mg kg ⁻¹	K, %	Mg, mg kg ⁻¹
1	0,907±0,046	1,76 ± 0,13	252±17	1,17±0,12	720±131
37	0,942±0,079	1,706±0,095	243±14	1,28±0,19	712±91
55	0,945±0,046	1,661±0,085	247±15	1,13±0,13	730±68
62	0,958±0,082	1,703±0,060	252±11	1,23±0,15	652±82
76	0,904±0,101	1,652±0,081	246±8	1,17±0,12	665±121
106	0,888±0,093	1,653±0,074	247±24	1,21±0,03	689±75
117	0,889±0,074	1,618±0,082	250±21	1,31±0,14	721±120
123	0,903±0,128	1,686±0,098	245±13	1,18±0,14	716±71
156	0,878±0,058	1,659±0,079	248±13	1,15±0,10	665±58
171	0,957±0,135	1,644±0,036	252±13	1,16±0,09	690±118

Tabela 6.10 – Continuação

Frasco	Mn, mg kg ⁻¹	Na, %	Se, mg kg ⁻¹	Zn, mg kg ⁻¹
1	5,28±0,72	0,854±0,059	6,81±0,46	90,5±4,2
37	5,18±0,90	0,823±0,033	6,70±0,31	88,3±5,0
55	4,86±0,72	0,805±0,033	6,63±0,30	89,6±2,7
62	4,84±0,81	0,816±0,020	6,83±0,19	90,8±2,7
76	4,84±0,66	0,834±0,020	6,77±0,16	89,6±1,8
106	5,24±0,65	0,825±0,042	6,70±0,39	89,6±5,5
117	5,09±0,83	0,825±0,067	6,69±0,40	88,7±6,1
123	4,70±0,76	0,814±0,028	6,74±0,33	90,8±5,0
156	4,61±0,42	0,814±0,024	6,84±0,27	90,4±4,6
171	4,92±0,99	0,818±0,044	6,75±0,16	90,1±1,5

^a Valor médio e incerteza expandida com um nível de confiança de 95% para n = 5

Para cada elemento analisado, em primeiro lugar aplicaram-se os testes de Grubbs, para detectar a presença de dados anômalos, o teste de Shapiro-Wilks para verificar a distribuição normal dos resultados e o teste de Levene para verificar a homogeneidade das variâncias, requisitos que devem ser cumpridos para poder aplicar ANOVA. Só se obteve três resultados anômalos, dois deles na amostra 1 (para Na e Co) e outro na amostra 37 (para K). Estes resultados não foram separados do conjunto de dados na hora de fazer a análise estatística devido a que sua presença não afetava a normalidade da distribuição e para não influir na detecção de possíveis inhomogeneidades nas análises multivariadas. Os resultados apresentaram distribuição normal para todos os analitos determinados e as variâncias também resultaram homogêneas. Na Tabela 6.11 apresenta-se um resumo dos resultados dos testes realizados.

Tabela 6.11 – Resultados dos testes estatísticos realizados para avaliar os requisitos de ANOVA na avaliação da homogeneidade entre frascos por INAA

Elemento	Grubbs (n° dados anômalos)	Shapiro-Wilks (valor p)	Levene (valor p)	<i>n</i>
Cl	-	0,71	0,11	50
Co	1	0,15	0,50	50
Fe	-	0,98	0,30	50
K	1	0,10	0,34	50
Mg	-	0,71	0,71	50
Mn	-	0,92	0,91	50
Na	1	0,10	0,07	50
Se	-	0,82	0,26	50
Zn	-	0,60	0,21	50

Como pode ser observado na tabela os valores obtidos para o valor p resultaram sempre maiores que 0,05 indicando a aceitação da hipótese H_0 dos testes aplicados com 95% de confiança. No teste de Shapiro-Wilks, H_0 é que os resultados seguem uma distribuição normal, e no teste de Levene, H_0 é que as variâncias dos dados são homogêneas.

Posteriormente, estudou-se a possível existência de tendências em função da ordem de medição e do número de frasco (ordem de preenchimento dos frascos do material). Para realizar esta avaliação os resultados foram colocados em função da variável de interesse e realizaram-se ajustes de regressão linear tal como estão descrito no guia ISO 35 (ISO, 2006). Depois, se realizou uma ANOVA dos parâmetros de regressão, o que permite saber se existe inclinação significativa, e portanto tendência, em algum dos casos. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela.6.12.

Tabela 6.12 – Estatísticas de ANOVA da regressão linear para o estudo de tendências na avaliação dos resultados da homogeneidade entre frascos por INAA

Elemento	Ordem de medição		Ordem de frasco		F_c
	F	Valor p	F	Valor p	
Cl	0,19	0,67	0,41	0,52	4,042
Co	0,39	0,53	8,38	0,01	4,042
Fe	10,78	0,002	0,01	0,93	4,042
K	10,96	0,002	1,19	0,28	4,042
Mg	1,82	0,18	0,80	0,38	4,042
Mn	1,15	0,29	0,58	0,45	4,042
Na	1,45	0,23	3,69	0,06	4,042
Se	0,07	0,79	0,01	0,94	4,042
Zn	0,53	0,47	0,10	0,76	4,042

F_c é o valor crítico da distribuição F para nível de significância $\alpha = 0,05$; $v_1 = 1$; $v_2 = 48$

No estudo de tendências em função da ordem de medição, os resultados foram satisfatórios exceto para K e para Fe, onde foi observada certa tendência que resultou significativa. Nesses casos, as normas aconselham corrigir os dados (ISO, 2006) tendo em consideração a tendência. Todas as análises descritas (tendências em função do nº de frasco, ANOVA para detectar homogeneidade e análise multivariada) foram realizadas para os dados corrigidos e sem corrigir para estes dois elementos e os resultados obtidos nos dois casos foram praticamente idênticos, mostrando que apesar de que a tendência observada foi estatisticamente significativa, na prática não afetou os resultados, pelo qual se optou por apresentar os dados sem a correção. A correção foi realizada através de uma transformação matemática baseada no coeficiente linear b da curva de tendência (intercepção da reta com o eixo vertical) e os resíduos de cada um dos dados medidos (distância de cada ponto à reta).

No estudo de tendências em função do número de frasco, os resultados obtidos foram satisfatórios, não se detectando nenhum tipo de tendência, para todos os casos exceto para o Co. Este fato será considerado na hora de decidir a possibilidade de certificar esse elemento.

Como ilustração, na Figura 6.7 são apresentados os dados obtidos para o Mn em função da ordem de medição e do número do frasco, junto com as respectivas curvas de regressão. Os dados dos elementos restantes são apresentados no Apêndice C.

Figura 6.7 – Representação gráfica dos resultados para o analito Mn no estudo de tendências em função da ordem de medição (a) e do número de frasco (b) com ajuste de curva linear

Na etapa seguinte, aplicaram-se os testes de ANOVA aos dados disponíveis para avaliar a homogeneidade entre os frascos. Em todos os casos os resultados obtidos foram satisfatórios, já que não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos resultados de cada frasco. Na Tabela 6.13 são apresentadas as estatísticas de ANOVA para cada elemento, onde pode se observar que os valores de F

obtidos são menores que o valor de F crítico, e que os valores p são maiores que 0,05 para todos os casos.

Tabela 6.13 – Estatísticas de ANOVA para resultados obtidos por INAA no estudo de homogeneidade entre frascos

Elemento	MS_{entre}	MS_{dentro}	F	Valor p
Cl	464813	709284	0,65	0,74
Co	0,008	0,005	1,72	0,11
Fe	52	153	0,34	0,96
K	1050074	1696216	1,6	0,14
Mg	3852	6053	0,64	0,76
Mn	0,266	0,380	0,70	0,70
Na	91937	101238	0,91	0,53
Se	0,023	0,063	0,37	0,94
Zn	3,6	11,4	0,31	0,96

MS = média quadrática; $F_c = 2,12$ é o valor crítico da distribuição F para nível de significância $\alpha = 0,05$; $v_1 = 9$; $v_2 = 40$

Para confirmar e complementar a análise univariada realizada através de ANOVA, aplicaram-se as técnicas de análise de componentes principais (PCA) e análise de agrupamento hierárquico (HCA), técnicas multivariadas que permitem a representação gráfica de todas as variáveis estudadas, neste caso à concentração dos elementos, ao mesmo tempo. Desta maneira o conjunto de dados pode ser mais facilmente avaliado quanto à presença de agrupamentos ou associações entre eles.

Os dados foram separados em dois grupos devido à que, pelas diferenças nas condições de irradiação utilizadas para medir os elementos em cada um deles, as determinações foram realizadas em diferentes alíquotas de amostra. O primeiro grupo está formado pelos elementos Co, Fe, K, Na, Se e Zn que foram medidos com tempos de irradiação longos no reator, e o segundo grupo formado por Cl, Mg e Mn, medidos utilizando tempos de irradiação curtos. Na Figura 6.8 são apresentados para cada grupo os gráficos das duas componentes principais, que explicam aproximadamente 80% da

variabilidade total. Os resultados de todas as sub-amostras analisadas estão apresentados na Figura 6.8, e cada frasco analisado está representado com uma cor diferente. Antes da aplicação dos testes estatísticos, os dados foram normalizados subtraindo o valor médio e dividindo pelo desvio padrão.

Figura 6.8 – Representação gráfica das duas componentes principais para o estudo de homogeneidade entre frascos por INAA

Os resultados obtidos são satisfatórios já que não se observa nenhum tipo de agrupamento ou tendência nos dados, o que confirma a homogeneidade para todos os casos (CASTRO et al., 2017).

Realizou-se a análise de agrupamento hierárquico (HCA) usando o método de Ward e distâncias Euclidianas. Como pode ser observado na Figura 6.9 os resultados das diferentes sub-amostras analisadas estão separadas em dois grandes grupos a uma distância aproximada de 20 a 40 unidades, mostrando alta similaridade entre elas. Por outro lado, todas as sub-amostras analisadas estão distribuídas em todos os subgrupos obtidos, indicando a distribuição homogênea. Estes resultados confirmam os já obtidos na PCA e ANOVA.

Figura 6.9 – Dendograma para os resultados do HCA usando método de agrupamento de Ward e distâncias Euclidianas para o estudo de homogeneidade entre frascos por INAA

Da avaliação do conjunto de resultados obtidos para os elementos analisados por INAA pode-se concluir que, para todos estes elementos, a homogeneidade entre

frascos é adequada, possibilitando sua certificação no candidato a material de referência de rim bovino.

6.5.1.2 Homogeneidade intra-frasco

O estudo da homogeneidade intra-frasco foi realizado utilizando o frasco nº 66, escolhido de forma aleatória. Foram analisadas por INAA cinco sub-amostras de cada uma das seguintes massas: 250, 150, 100, 50 e 20 mg. Na Tabela 6.14 são apresentadas as concentrações médias obtidas para cada uma das massas analisadas.

Tabela 6.14 – Concentrações médias e incertezas expandidas^a obtidas por INAA para cada uma das massas do candidato a material de referência analisadas no estudo de homogeneidade intra- frasco (base úmida)

Elemento	20 mg	50 mg	100 mg	150 mg	250 mg
Cl, %	0,942±0,073	0,999±0,160	0,897±0,082	0,895±0,122	0,820±0,062
Co, mg kg⁻¹	1,98±0,32	1,83±0,08	1,73±0,12	1,69±0,10	1,63±0,13
Fe, mg kg⁻¹	259±11	256±16	247±15	250±17	242±19
K, %	1,24 ± 0,13	1,34 ± 0,33	1,16 ± 0,10	1,26 ± 0,24	1,31 ± 0,24
Mg, mg kg⁻¹	828 ± 130	814±82	751±80	692±119	655±92
Mn, mg kg⁻¹	4,87±0,61	5,78±1,26	4,96±1,00	4,96±1,23	4,70±0,35
Na, %	0,824±0,036	0,813±0,059	0,817±0,028	0,852±0,048	0,806±0,027
Se, mg kg⁻¹	7,09±0,77	6,93±0,30	7,03±0,49	6,94±0,48	6,59±0,52
Zn, mg kg⁻¹	95,2±4,8	94,7±4,0	92,2±4,3	91,9±7,7	88,9±6,9

^a Valor médio e incerteza com um nível de confiança de 95% para n = 5

Da mesma forma que no estudo de homogeneidade entre frascos, primeiramente foram aplicados os testes de Grubbs, para detectar a presença de dados anômalos, o teste de Shapiro-Wilks para verificar a distribuição normal dos resultados e o teste de Levene para verificar a homogeneidade das variâncias. Os resultados obtidos para um nível de confiança de 95% podem ser observados na Tabela 6.15.

Tabela 6.15 Resultados dos testes estatísticos realizados para avaliar os requisitos de ANOVA na avaliação da homogeneidade intra-frasco por INAA

Elemento	Grubbs (n° dados anômalos)	Shapiro-Wilks (valor p)	Levene (valor p)	n
Cl	-	0,08	0,52	25
Co	1	0,86	0,09	25
Fe	-	0,25	0,82	25
K	-	0,11	0,03	25
Mg	-	0,59	0,29	25
Mn	-	0,15	0,05	25
Na	-	0,50	0,18	25
Se	-	0,69	0,59	25
Zn	-	0,80	0,62	25

Só se obteve um resultado anômalo para o Co em uma das alíquotas de 20 mg. Todos os resultados apresentaram distribuição normal e as variâncias também resultaram homogêneas em todos os casos, exceto para o K. Neste caso na análise de ANOVA descrito a seguir em lugar do teste F tradicional foi utilizado o teste de Welch, que é o teste adequado nos casos de variâncias não equivalentes (FIELD, 2009).

Para cada elemento aplicou-se um teste de ANOVA para determinar se existiam diferenças significativas entre as amostras com diferentes massas.

Para K, Mn, Na, Se e Zn não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos de amostras analisadas.

No caso do Cl, Co e Mg foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as amostras com diferentes massas, então foi preciso investigar qual das massas analisadas estava causando as diferenças. Para isto, aplicou-se um PCA obtendo os resultados apresentados na Figura 6.10. Para cada grupo foram representadas as duas componentes principais, que explicam aproximadamente 75% da variabilidade total. Os resultados de todas as sub-amostras analisadas estão apresentados na figura, para uma melhor interpretação cada massa analisada está representada com uma cor diferente. Antes da aplicação dos testes estatísticos os dados foram normalizados utilizando o valor médio e o desvio padrão.

Figura 6.10 – Representação gráfica das duas componentes principais no estudo da quantidade mínima de amostra.

No caso dos radionuclídeos de meia vida curta, pode-se observar um agrupamento nas sub-amostras com massa de 250 mg, devido provavelmente a auto-absorção de raios gama e a elevação dos tempos mortos, uma limitante da técnica analítica. Para Cl e Mg, ANOVA foi aplicado de novo, sem ter em conta os dados das sub-amostras de massa maior. Os resultados obtidos mostraram que não existiam diferenças significativas, confirmando que as porções de massa menor eram estatisticamente equivalentes.

No caso dos radionuclídeos de meia vida longa, observou-se maior dispersão nos resultados das sub-amostras de 20 mg. No caso particular do Co, obtêm-se resultados estatisticamente equivalentes aplicando ANOVA quando as sub-amostras de 20 mg e 50 mg são omitidas da análise.

Tendo todos esses fatos em consideração, as quantidades mínimas de amostra para cada um dos elementos envolvidos no estudo podem ser estimadas tal como se apresentam na Tabela 6.16.

Tabela 6.16 – Resultados do estudo da quantidade mínima de amostra no estudo de homogeneidade intra-frasco

Elemento	valor p ($\alpha = 0,05$)	Dados usados em ANOVA	Mínima quantidade de amostra (mg)
Cl	0,27	Sub-amostras de 20, 50, 100 e 150 mg.	20
Co	0,30	Sub-amostras de 100, 150 e 250 mg.	100
Fe	0,23	Sub-amostras de 20, 50, 100, 150 e 250 mg	50
Mg	0,10	Sub-amostras de 20, 50, 100 e 150 mg	20
Mn	0,24	Sub-amostras de 20, 50, 100, 150 e 250 mg	20
K	0,40	Sub-amostras de 20, 50, 100, 150 e 250 mg	20
Na	0,76	Sub-amostras de 20, 50, 100, 150 e 250 mg	20
Se	0,42	Sub-amostras de 20, 50, 100, 150 e 250 mg	50
Zn	0,23	Sub-amostras de 20, 50, 100, 150 e 250 mg	50

Tendo em consideração que as massas mínimas estimadas desta maneira poderiam ser uma super-estimativa da quantidade mínima real em alguns dos casos, decidiu-se realizar um estudo de micro-homogeneidade tal como descrito a seguir.

6.5.1.3 Micro-homogeneidade

Para se obter uma estimativa mais realística da quantidade mínima de amostra para a qual o MR continua sendo homogêneo, foram realizados ensaios para determinar o fator de homogeneidade relativa, ou constante de Kurfurst, (H_E), um parâmetro usado para esse propósito por vários autores (KÜRFURST et al., 1993; ROSSBACH e

GROBECKER, 1999; SONNTAG e ROSSBACH, 1997). Para quantificar a homogeneidade de um elemento em uma dada matriz, Kürfurst (KÜRFURST et al., 1993) definiu um fator de homogeneidade relativa (H_E) baseado em uma modificação da constante de amostragem de Ingamells (INGAMELLS e SWITZER, 1973). O fator H_E é considerado um estimador apropriado da homogeneidade quando pequenas quantidades de massa de amostra são analisadas (até 2 mg). Uma vez que o valor H_E é calculado, é possível calcular a quantidade mínima de amostra para atingir certo valor de precisão com determinado nível de confiança (PAUWELS e VANDECASTEELE, 1993).

As medições devem ser realizadas utilizando um método que permita analisar uma pequena quantidade de amostra, com boa precisão e baixa incerteza. Por este motivo, este ensaio só foi realizado para os elementos determinados por INAA que, como já foi mencionado, é uma das técnicas de referência devido às suas características intrínsecas, como alta sensibilidade, precisão e exatidão e a que não requer o pré-tratamento das amostras, minimizando perdas e contaminações.

Foram analisadas por INAA dez sub-amostras de aproximadamente 1 mg para avaliar a micro-homogeneidade nos elementos Cl, K, Mn e Na e dez sub-amostras de aproximadamente 2 mg para avaliar os elementos Co, Fe, Mg, Se e Zn. A diferença na quantidade de amostra está relacionada com a necessidade de obter picos analíticos quantificáveis, com uma incerteza (estatística de contagem) razoável. A altura do pico depende da concentração do analito, da abundância do isótopo que sofre a reação nuclear que origina o isótopo que é determinado e da magnitude da secção de choque do elemento, o que determina quão favorável é o elemento para a ativação neutrônica. Em particular, a técnica é menos sensível para os elementos Fe e Mg (ZEISLER et al., 2011), motivo pelo qual a massa necessária para a determinação destes elementos resultou maior. No caso do K, a pouca sensibilidade da técnica foi compensada pelo fato da alta concentração do elemento, e por se tratar de um elemento de meia vida mais curta, foi medido logo depois de ser irradiado.

Na Tabela 6.17 são apresentados os valores médios obtidos para a concentração de cada elemento nas sub-amostras analisadas, bem como o desvio padrão relativo, RSD, e o número de determinações realizadas, n. Em alguns casos, como para o Cl e o Mn, foi possível medir algumas subamostra mais de uma vez, e por esse motivo $n > 10$. O valor de massa mostrado na tabela é a média das 10 sub-amostras analisadas.

Tabela 6.17 – Valores de concentração, desvio padrão relativo e número de determinações no estudo de micro-homogeneidade

Elemento	Massa média (mg)	Concentração média ($\mu\text{g g}^{-1}$)	RSD (%)	<i>n</i>
Cl	0,96	9739	7,8	25
Co	1,78	2.03	11,3	10
Fe	1,78	298	8,0	10
K	0,96	12352	4,5	10
Mg	1,78	783	9,6	9
Mn	0,96	6,71	9,8	15
Na	0,96	8358	3,2	10
Se	1,78	6,07	9,2	10
Zn	1,78	88,9	4,9	10

Para quantificar a homogeneidade de cada elemento no candidato a material de referência, o fator de homogeneidade relativa (H_E) foi calculado segundo a Equação 6.13.

$$H_E = RSE\sqrt{m} \quad (6.13)$$

onde:

m é a massa utilizada,

RSE é o desvio padrão relativo experimental calculado com a Equação 6.14.

$$RSE^2 = RSD^2 - \sum (\text{outra incertezas relativas})^2 \quad (6.14)$$

Quando um método direto como INAA é usado, o número de incertezas que influenciam a medição é minimizado e tem sido bem estudadas (MOREIRA et al, 2006; GREENBERG et al., 2011). Neste trabalho, a incerteza analítica foi calculada combinando as fontes de incertezas devidas à estatística de contagem, a pesagem das amostras e as incertezas dos padrões de calibração.

A Tabela 6.18 mostra os resultados obtidos para as incertezas analíticas, RSD, RSE e fatores de homogeneidade relativa (H_E).

Tabela 6.18 – Incertezas combinadas (u_A), RSE, RSD e fatores de homogeneidade relativos (H_E) calculados para cada elemento analisado

Elemento	u_A (%)	RSD (%)	RSE (%)	H_E (% m^{1/2})
Cl	4,0	7,8	6,7	6,5
Co	4,4	11,3	10,5	14,0
Fe	10,8	8,0	-	10,6
K	3,4	4,5	2,9	2,9
Mg	11,8	9,6	-	12,8
Mn	8,5	9,8	4,8	4,7
Na	0,9	3,2	3,1	3,0
Se	6,2	9,2	6,9	9,1
Zn	2,9	4,9	3,9	5,3

Como pode ser visto na Tabela 6.18, a incerteza estimada para o Fe e o Mg foi maior do que o valor do RSD, dando um valor negativo para RSE. Esse fato ocorre porque, para esses elementos, o pico analisado foi muito pequeno e, portanto, as estatísticas de contagem foram elevadas. Com o intuito de se obter um valor indicativo para esses elementos, o H_E foi estimado levando em consideração o RSD geral, mas deve se levar em consideração que o resultado obtido é uma superestimativa do valor real, já que está incluindo a variabilidade analítica.

Quando um valor de $H_E \leq 10$ é obtido, o material é considerado muito homogêneo (ROSSBACH e GROBECKER, 1999). Uma vez que o valor H_E foi calculado, foi possível calcular a quantidade mínima de amostra para atingir certo valor de precisão com determinado nível de confiança (PAUWELS e VANDECASTEELE, 1993) usando a Equação 6.15.

$$M_{x\%} = m \left(\frac{k_2 H_E}{x_{\%}} \right)^2 \quad (6.15)$$

onde

$x\%$ = nível de precisão a ser alcançado,

k_2 = fator para o limite de tolerância bilateral da distribuição normal,

m = massa utilizada no estudo de micro-homogeneidade.

Para os macro-componentes como Cl, K e Na, a massa mínima foi estimada considerando uma precisão alvo de 5%. Para o resto dos elementos, a precisão alvo foi estabelecida em 10% devido ao baixo nível de concentração destes elementos. Os resultados são apresentados na Tabela 6.19.

Tabela 6.19 – Massa mínima requerida para alcançar uma precisão de 5% e 10% com um nível de confiança de 95%.

Elemento	k_2^a	$M_{5\%}$ (mg)	$M_{10\%}$ (mg)
Cl	2,60	11,3	-
K	3,38	3,7	-
Na	3,38	4,0	-
Co	3,38	-	39,6
Fe	3,38	-	22,9
Mg	3,53	-	36,0
Mn	2,95	-	1,9
Se	3,38	-	17,0
Zn	3,38	-	5,6

^a k_2 fator para o limite de tolerância bilateral da distribuição normal, a $p = 0.95$

A partir dos resultados apresentados pode-se dizer que, para os analitos Cl, K, Mn, Na, Se e Zn, o material apresentou uma homogeneidade muito alta, com massas mínimas de amostra variando entre 2 mg para o Mn e 17 mg para o Se. Para os analitos Co, Fe e Mg, a homogeneidade foi moderada. Como já foi discutido, para o Fe e o Mg, o valor de H_E obtido é uma superestimação do real e, portanto, a massa mínima de amostras também resulta numa superestimativa. Para estes dois elementos a variabilidade deveu-se mais a uma limitação da capacidade analítica da técnica do que a heterogeneidade no material. Os níveis mais altos foram obtidos para o Co. No entanto, a massa mínima de amostra obtida para este elemento foi de 40 mg, um valor que é adequado para a maioria das técnicas analíticas.

De maneira geral, pode-se afirmar que os resultados obtidos para os fatores de homogeneidade relativa e massa mínima de amostra são adequados, mostrando que, para a maioria dos elementos estudados, o material de referência será útil para técnicas microanalíticas. Futuros trabalhos neste material de referência devem melhorar a análise de

Fe e Mg, talvez determinando melhores condições de irradiação e medição para que sejam obtidos resultados mais precisos para esses elementos.

6.5.2 Avaliação da homogeneidade dos elementos analisados por ICP-MS

Para a avaliação da homogeneidade entre frascos, quatro sub-amostras de aproximadamente 200 mg de 8 dos 10 frascos escolhidos para o estudo, foram analisadas por ICP-MS para a determinação dos elementos As, Cd, Cu e Pb.

Não são apresentados os resultados obtidos para o elemento Pb pois estes apresentaram variabilidade muito alta. Os valores obtidos para os MRC analisados como controle de qualidade para este elemento também não foram aceitáveis. Um possível motivo para explicar este fato é que a concentração de Pb no material é muito baixa e, por outro lado, existiu algum problema de contaminação no manuseio das amostras evidenciado no fato que vários dos brancos processados com as amostras apresentaram teores de Pb muito altos. Por todos estes motivos decidiu-se que a concentração de Pb não poderia ser certificada no material e foi excluído da análise.

No caso do Cd, a variabilidade também foi maior do que o esperado, devida também provavelmente a alguma contaminação. Neste caso decidiu-se descartar uma série de sub-amostras (a primeira alíquota de cada frasco) porque os níveis de concentração mais altos obtidos para estas alíquotas foram relacionados com uma possível contaminação nos tubos de micro-ondas utilizados na sua digestão.

Na Tabela 6.20 são apresentados os valores médios e incertezas expandidas obtidos por ICP-MS para os elementos As, Cd e Cu nos frascos analisados. A incerteza padrão foi calculada usando o desvio padrão da média e o fator de abrangência, k , usado para expandir a incerteza, foi escolhido com base no valor da distribuição t de Student bicaudal para $(n - 1)$ graus de liberdade e 95% confiança.

Tabela 6.20 – Concentrações médias e incertezas expandidas^a obtida por ICP-MS para cada um dos frascos analisados do candidato a material de referência no estudo de homogeneidade entre frascos (base úmida)

Frasco	As, $\mu\text{g kg}^{-1}$	Cd, $\mu\text{g kg}^{-1}$	Cu, mg kg^{-1}
1	205 $\pm$ 15	96 $\pm$ 35	17,47 $\pm$ 0,89
37	201 $\pm$ 21	140 $\pm$ 58	17,38 $\pm$ 0,68
76	204 $\pm$ 27	91 $\pm$ 32	17,22 $\pm$ 0,52
106	218 $\pm$ 23	92 $\pm$ 33	17,61 $\pm$ 0,69
117	210 $\pm$ 32	89 $\pm$ 28	16,99 $\pm$ 0,54
123	216 $\pm$ 23	99 $\pm$ 18	17,04 $\pm$ 1,07
156	223 $\pm$ 31	97 $\pm$ 36	17,26 $\pm$ 0,74
171	215 $\pm$ 15	82 $\pm$ 20	17,13 $\pm$ 0,41

^a Valor médio e incerteza com um nível de confiança de 95% para n = 5 para As e Cu e n=3 para Cd

Da mesma forma que no estudo realizado por INAA, para cada elemento analisado, em primeiro lugar aplicaram-se os testes de Grubbs, para detectar a presença de dados anômalos, o teste de Shapiro-Wilks para verificar a distribuição normal dos resultados e o teste de Levene para verificar a homogeneidade das variâncias. Só se obteve um resultado anômalo para o Cd na amostra 37. Os resultados apresentaram distribuição normal para todos os analitos determinados e as variâncias também resultaram homogêneas. Na Tabela 6.21 apresenta-se um resumo dos resultados dos testes realizados obtidos para um nível de confiança de 95%.

Tabela 6.21 – Resultados dos testes estatísticos realizados para avaliar os requisitos de ANOVA na avaliação da homogeneidade entre frascos por ICP-MS

Elemento	Grubbs (nº dados anômalos)	Shapiro-Wilks (valor <i>p</i>)	Levene (valor <i>p</i>)	<i>n</i>
As	-	0,70	0,21	32
Cd	1	0,59	0,14	24
Cu	-	0,30	0,70	32

Posteriormente estudou-se a possível existência de tendências em função da ordem de medição e do número de frasco (ordem de preenchimento dos frascos do material). Para realizar esta avaliação construíram-se gráficos dos resultados em função da variável de interesse e realizaram-se ajustes de regressão linear tal como já foi descrito anteriormente. Também realizou-se uma ANOVA dos parâmetros da regressão, o que permite saber se existe uma inclinação significativa, e portanto uma tendência, em algum dos casos. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 6.22.

Tabela 6.22 – Estatísticas de ANOVA da regressão linear para o estudo de tendências na avaliação dos resultados da homogeneidade entre frascos por ICP-MS

Elemento	Ordem de medição		Ordem de frasco		F_c
	F	Valor p	F	Valor p	
As	1,27	0,27	3,81	0,06	4,17
Cd	4,15	0,054	0,65	0,43	4,30
Cu	1,19	0,28	1,77	0,19	4,17

F_c é o valor crítico da distribuição F para nível de significância $\alpha = 0,05$; $v_1 = 1$; $v_2 = 30$ para As e Cu; $v_2 = 22$ para Cd.

Como pode ser observado na tabela os valores obtidos para o valor p resultaram sempre maiores que 0,05 indicando a aceitação da hipótese H_0 do teste de análise da regressão com 95% de confiança, o que neste caso significa que não existe inclinação significativa.

Na Figura 6.11 são apresentados os dados obtidos para o Cu em função da ordem de medição e do número do frasco, junto com as respectivas curvas de regressão. Os dados dos elementos restantes são apresentados no Apêndice C.

Figura 6.11 – Representação gráfica dos resultados para o analito Cu no estudo de tendências em função da ordem de medição (a) e do número de frasco (b) com ajuste de curva linear.

Na etapa seguinte aplicaram-se os testes de ANOVA aos dados para avaliar a homogeneidade entre os frascos. Em todos os casos os resultados obtidos foram satisfatórios, já que não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos resultados de cada frasco.

Na Tabela 6.23 são apresentadas as estatísticas de ANOVA para cada elemento medido por ICP-MS, onde pode-se observar que o valor de F obtido é menor que F crítico para todos os casos.

Tabela 6.23 – Estatísticas de ANOVA para resultados obtidos por ICP-MS no estudo de homogeneidade entre frascos.

Elemento	MS _{entre}	MS _{dentro}	F	F _c ^a	Valor p	u _{bb}
As	239	228	1,05	2,42	0,43	0,8 %
Cd	334	234	1,43	2,71	0,26	6,2%
Cu	182956	204815	0,89	2,42	0,53	0,7%

F_c é o valor crítico da distribuição F para nível de significância $\alpha = 0,05$; $\nu_1 = 7$; $\nu_2 = 24$ para As e Cu; $\nu_2 = 16$ para Cd.

Da mesma forma que no estudo realizado com INAA aplicaram-se as técnicas estatísticas multivariadas de análise de componentes principais (PCA) e análise de agrupamento hierárquico (HCA) para complementar o estudo.

Na Figura 6.12 estão representadas graficamente as duas componentes principais, que explicam aproximadamente 77% da variabilidade total. Os resultados de todas as sub-amostras analisadas estão apresentados no diagrama, cada frasco analisado esta representado com uma cor diferente. Antes da aplicação dos testes estatísticos os dados foram normalizados utilizando o valor médio e o desvio padrão.

Figura 6.12 – Representação gráfica das duas componentes principais para o estudo de homogeneidade entre frascos por ICP-MS.

Os resultados obtidos são satisfatórios para todos os casos, já que não se observa nenhum tipo de agrupamento ou tendência nos dados, o que confirma a homogeneidade.

Realizou-se a análise de agrupamento hierárquico (HCA) usando o método de Ward e distâncias Euclidianas. Como pode ser observado na Figura 6.13, os resultados das diferentes sub-amostras analisadas estão separadas em três grupos a uma distância aproximada de 40 a 50 unidades, mostrando considerável similaridade entre elas. Por outro lado, exceto as correspondentes ao frasco nº37, todas as sub-amostras analisadas estão distribuídas em todos os subgrupos obtidos, indicando uma distribuição homogênea. No caso da amostra nº37 três das quatro alíquotas estão agrupadas num mesmo grupo, mas este fato isolado não pareceria estar indicando nenhuma tendência.

Figura 6.13 – Dendograma para os resultados do HCA usando método de agrupamento de Ward e distâncias Euclidianas para o estudo de homogeneidade entre frascos por ICP-MS.

Da avaliação do conjunto de resultados obtidos para os elementos analisados por ICP-MS pode-se concluir que, para os elementos As e Cu, a homogeneidade entre frascos é adequada, possibilitando sua certificação no candidato a material de referência de rim bovino. No caso do Cd, apesar de ter se obtido resultados aceitáveis, se considera que a

homogeneidade deve ser melhor investigada, devido a que varios resultados foram descartados da análise. Apesar de que o mais provável é que as discrepâncias observadas fossem devidas a problemas na aplicação da técnica analítica e não á falta de homogeneidade no material, os teores de Cd no candidato a material de referência não poderão ser certificados, senão que serão expressados com caráter de valor informativo.

6.5.3 Avaliação da homogeneidade do elemento Hg analisado por CV AAS

Quatro sub-amostras de aproximadamente 200 mg de 8 dos 10 frascos escolhidos para o estudo, foram analisadas por CV AAS para a determinação do elemento Hg para a avaliação da homogeneidade entre frascos..

Na Tabela 6.24 são apresentados os valores médios e incertezas expandidas obtidos para o elemento Hg nos frascos analisados. A incerteza padrão foi calculada usando o desvio padrão da média e o fator de abrangência, k , usado para expandir a incerteza, foi escolhido com base no valor da distribuição t de Student bicaudal para $(n - 1)$ graus de liberdade e 95% confiança.

Tabela 6.24 – Concentrações médias e incertezas expandidas ^a obtidas por CV AAS para cada um dos frascos analisados do candidato a material de referência no estudo de homogeneidade entre frascos (base úmida)

Frasco	Hg, $\mu\text{g kg}^{-1}$	Frasco	Hg, $\mu\text{g kg}^{-1}$
1	29 ± 10	117	32 ± 13
37	35 ± 12	123	38 ± 13
76	34 ± 12	156	20 ± 4
106	30 ± 16	171	32 ± 19

^a Valor médio e incerteza com um nível de confiança de 95% para $n = 5$

Da mesma forma que nos estudos anteriores, para cada elemento analisado, em primeiro lugar aplicaram-se os testes de Grubbs, para detectar a presença de dados anômalos, o teste de Shapiro-Wilks para verificar a distribuição normal dos resultados e o teste de Levene para verificar a homogeneidade das variâncias. Na Tabela 6.25 são apresentados os resultados dos testes realizados para um nível de confiança de 95%.

Tabela 6.25 – Resultados dos testes estatísticos realizados para avaliar os requisitos de ANOVA na avaliação da homogeneidade entre frascos por CV AAS

Elemento	Grubbs (n° dados anômalos)	Shapiro-Wilks (valor p)	Levene (valor p)	n
Hg	-	0,04	0,26	32

Não foram obtidos resultados anômalos para o Hg e as variâncias dos resultados resultaram homogêneas. O teste de Shapiro-Wilks detectou um desvio da normalidade, motivo pelo qual será utilizado no estudo da homogeneidade entre frascos do Hg, além do teste de ANOVA tradicional, o teste de Kruskal-Wallis, que é um teste não paramétrico que também é utilizado para determinar se existem diferenças significativas entre as médias de grupos de dados, mas não assume a normalidade da distribuição (FIELD, 2009).

Posteriormente estudou-se a possível existência de tendências em função da ordem de medição e do número de frasco (ordem de preenchimento dos frascos do material). Para realizar esta avaliação foram construídos os gráficos dos resultados em função da variável de interesse e realizaram-se ajustes de regressão linear tal como já foi descrito nos itens anteriores. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 6.26.

Tabela 6.26 – Estatísticas de ANOVA da regressão linear para o estudo de tendências na avaliação dos resultados da homogeneidade entre frascos por CV AAS

Elemento	Ordem de medição		Ordem de frasco		F_c
	F	Valor p	F	Valor p	
Hg	0,001	0,97	0,37	0,54	4,17

F_c é o valor crítico da distribuição F para nível de significância $\alpha = 0,05$; $v_1 = 1$; $v_2 = 30$

Como pode ser observado na tabela, os valores obtidos para o valor p resultaram sempre maiores que 0,05, o que sugere que não existem tendências em função das variáveis analisadas. Na Figura 6.14 são apresentados os dados obtidos para o Hg em função da ordem de medição e do número do frasco, junto com as respectivas curvas de regressão.

Figura 6.14 – Representação gráfica dos resultados para o analito Hg no estudo de tendências em função da ordem de medição (a) e do número de frasco (b) com ajuste de curva linear.

Na etapa seguinte, aplicaram-se os testes de ANOVA e de Kruskal-Wallis aos dados para avaliar a homogeneidade entre os frascos. Em todos os casos os resultados obtidos foram satisfatórios, já que não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos resultados de cada frasco.

Na Tabela 6.27 são apresentadas as estatísticas de ANOVA e do teste de Kruskal-Wallis para o elemento Hg, onde pode se observar que o valor p obtido é maior que 0,05 nos dois casos.

Tabela 6.27 – Estatísticas de ANOVA e teste de Kruskal-Wallis para os resultados obtidos para o elemento Hg por CV AAS

Elemento	ANOVA	Kruskal-Wallis
MS_{entre}	110,6	-
MS_{dentro}	112,8	-
F	0,98	-
F_c	2,42	-
Valor p	0,47	0,28

F_c é o valor crítico da distribuição F para nível de significância $\alpha = 0,05$; $v_1 = 7$; $v_2 = 24$.

6.5.4 Estimativa da componente de incerteza devida à homogeneidade

Tal como está sugerido no Guia 35 (ISO, 2006), a componente da incerteza devida à homogeneidade (u_{bb}) foi estimada partindo-se das médias quadráticas (MS) obtidas por ANOVA nos estudos de homogeneidade entre frascos para os elementos determinados por INAA, ICP-MS e CV AAS. Quando ANOVA é aplicado, a variância entre grupos, que pode ser estimada a partir de MS_{entre} , dependerá diretamente da homogeneidade entre frascos. Já a variância dentro de cada grupo, estimada de MS_{dentro} , dependerá principalmente da repetibilidade do método de medição.

Para o cálculo da incerteza foram utilizadas as seguintes equações (VAN DER VEEN et al., 2001a; LINSINGER et al., 2001a)

$$u_{bb} = \sqrt{\frac{MS_{entre} - MS_{dentro}}{n}} \quad \text{se } MS_{entre} > MS_{dentro} \quad (6.16)$$

$$u_{bb} = \sqrt{\frac{MS_{dentro}}{n}} \sqrt[4]{\frac{2}{v_{MS_{dentro}}}} \quad \text{se } MS_{entre} \leq MS_{dentro} \quad (6.17)$$

onde:

n = número de replicatas por frasco ($n=5$),

$v_{MS_{dentro}}$ = graus de liberdade para MS_{dentro} ($v_{MS_{dentro}} = 40$).

A Equação 6.19 é utilizada no caso em que a repetibilidade do método seja insuficiente. É um enfoque conservador, que permite estimar a variabilidade máxima entre frascos que poderia ser mascarada pela repetibilidade do método.

Os valores obtidos para as médias quadráticas e incertezas devidas à homogeneidade para cada elemento são apresentados na Tabela 6.28.

Tabela 6.28 – Estimativa da incerteza padrão devida à homogeneidade e médias quadráticas obtidas por ANOVA no estudo de homogeneidade entre frascos

Elemento	MS_{entre}	MS_{dentro}	u_{bb}
As	239	228	0,8 %
Cd	334	234	6,2%
Cl	464813	709284	1,9%
Co	0,008	0,005	1,5%
Cu	182956	204815	0,7%
Fe	52	153	1,1%
Hg	110,6	112,8	9,1%
K	1050074	1696216	3,0%
Mg	3852	6053	2,4%
Mn	0,266	0,380	2,6%
Na	91937	101238	0,8%
Se	0,023	0,063	0,8%
Zn	3,6	11,4	0,8%

Os valores obtidos para u_{bb} são considerados baixos na maioria dos elementos e não afetarão significativamente a incerteza final esperada para o material de referência. As maiores incertezas foram obtidas para o elemento Cd, fato esperável pelos motivos já discutidos, e para o elemento Hg. Neste caso a elevada incerteza é consequência da maior variabilidade obtida na análise deste elemento, devida provavelmente à baixa concentração na que está presente. Somado a isto, a técnica analítica utilizada envolveu um maior número de diluições das alíquotas que foram medidas, fator que aumenta a variabilidade e, por conseguinte, a incerteza nas determinações.

6.6 Avaliação da estabilidade de curto prazo

6.6.1 Avaliação da estabilidade de curto prazo dos elementos analisados por INAA

Para os estudo de estabilidade de curto prazo foram escolhidos 9 frascos de forma aleatória. Os frascos n°31, 33, 49, 60, 74, 136, 142 e 150 foram armazenados a diferentes temperaturas (20 e 50°C) por diferentes períodos de tempo (2, 4, 6 e 8 semanas). O frasco n°144 foi armazenado a -20°C para ser usado como frasco de controle.

Considerou-se que uma temperatura de 20°C era representativa das condições padrão nas quais são armazenados os MR e que 50°C era um valor representativo da temperatura máxima que o MR poderia estar exposto durante o transporte.

Foram analisadas 3 sub-amostras de cada um dos frascos escolhidos. Os valores médios e incertezas expandidas ($k=2$) para cada frasco são apresentados na Tabela 6.29.

Tabela 6.29 – Concentração média obtida por INAA para cada um dos frascos analisados no estudo de estabilidade de curto prazo (base úmida)

Temperatura °C	Frasco	Tempo, semanas	Cl, %	Co, mg kg ⁻¹	Fe, mg kg ⁻¹	K, %	Mg, mg kg ⁻¹
20	49	8	0,950±0,082	1,65±0,10	253±18	1,04±0,27	797±100
	74	6	0,918±0,077	1,60±0,10	246±19	1,08±0,24	694±97
	142	4	0,917±0,077	1,63±0,10	253±19	1,06±0,30	787±129
	31	2	0,890±0,075	1,74±0,11	251±19	1,01±0,20	722±118
50	60	8	0,956±0,083	1,64±0,10	244±18	1,09±0,24	772±124
	33	6	1,028±0,089	1,67±0,11	247±19	1,03±0,30	785±115
	150	4	0,877±0,072	1,59±0,10	246±19	1,04±0,28	663±92
	136	2	0,927±0,079	1,70±0,11	261±19	1,00±0,27	773±123
-20	144	0	0,923±0,080	1,65±0,11	252±19	1,02±0,27	690±102

Tabela 6.29 – continuação

°C	Frasco	Tempo, semanas	Mn, mg kg ⁻¹	Na, %	Se, mg kg ⁻¹	Zn, mg kg ⁻¹
20	49	8	5,2±1,1	0,759±0,021	6,85±0,51	93,8±4,6
	74	6	5,2±1,0	0,768±0,021	6,71±0,50	90,2±4,5
	142	4	5,0±1,0	0,769±0,022	6,76±0,50	94,2±4,6
	31	2	4,4±1,0	0,773±0,021	6,90±0,51	92,3±4,6
50	60	8	5,7±1,2	0,788±0,022	6,84±0,51	90,2±4,5
	33	6	4,8±1,0	0,767±0,022	6,61±0,50	91,9±4,5
	150	4	5,1±1,0	0,761±0,021	6,69±0,49	91,7±4,5
	136	2	4,7±1,1	0,775±0,022	7,08±0,52	96,6±4,8
-20	144	0	4,5±0,9	0,788±0,023	6,85±0,51	92,8±4,6

Da mesma forma que no estudo de homogeneidade entre frascos, primeiramente foram aplicados os testes de Grubbs, para detectar a presença de dados anômalos, o teste de Shapiro-Wilks para verificar a distribuição normal dos resultados e o teste de Levene para verificar a homogeneidade das variâncias. Os resultados obtidos para um nível de confiança de 95% podem ser observados na Tabela 6.30.

Tabela 6.30 – Resultados dos testes estatísticos realizados para avaliar os requisitos de ANOVA na avaliação da estabilidade de curto prazo por INAA

Elemento	Grubbs (n° dados anômalos)	Shapiro-Wilks (valor p)	Levene (valor p)	n
Cl	-	0,20	0,21	27
Co	-	0,40	0,12	27
Fe	-	0,74	0,62	27
K	-	0,13	0,07	27
Mg	-	0,98	0,68	27
Mn	-	0,36	0,73	27
Na	-	0,98	0,70	27
Se	-	0,55	0,40	27
Zn	-	0,33	0,62	27

Não foram observados resultados anômalos e os resultados apresentaram distribuição normal para todos os casos. As variâncias entre as duas temperaturas analisadas também resultaram homogêneas.

Para avaliar a existência de tendências em função do tempo de exposição para cada uma das temperaturas analisadas, os resultados foram colocados em função do tempo para cada temperatura (20°C e 50°C) e realizaram-se ajustes de regressão linear e uma ANOVA dos parâmetros de regressão, tal como já foi descrito. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 6.31.

Tabela 6.31 – Estatísticas de ANOVA da regressão linear para o estudo de tendências em função do tempo de exposição às duas temperaturas analisadas na avaliação da estabilidade de curto prazo por INAA.

Elemento	20°C		50°C		<i>F_c</i>
	<i>F</i>	Valor <i>p</i>	<i>F</i>	Valor <i>p</i>	
Cl	0,59	0,46	0,93	0,35	4,67
Co	0,71	0,41	0,56	0,47	4,67
Fe	0,01	0,93	1,97	0,18	4,67
K	0,59	0,46	4,97	0,04	4,67
Mg	2,27	0,16	1,58	0,23	4,67
Mn	2,96	0,11	2,9	0,11	4,67
Na	1,03	0,33	0,02	0,88	4,67
Se	0,11	0,74	1,35	0,27	4,67
Zn	0,001	0,98	2,1	0,17	4,67

F_c é o valor crítico da distribuição *F* para nível de significância $\alpha = 0,05$; $\nu_1 = 1$; $\nu_2 = 13$

Com exceção do K quando exposto a 50°C, os resultados obtidos foram satisfatórios em todos os casos, não se detectando nenhum tipo de tendência. No caso do K a tendência observada foi pequena, não sendo significativa considerando um nível de confiança de 97%. Por outro lado, como a tendência tem caráter positivo, ou seja que o K estaria aumentando no tempo na temperatura de 50°C, provavelmente tal observação foi devida a alguma variabilidade analítica e não a uma instabilidade do elemento propriamente dita. Para complementar o estudo, no caso do K, foi realizado uma ANOVA

para ver se existiam diferenças significativas entre as médias dos frascos expostos aos diferentes tempos e o frasco de controle. Não foram encontradas diferenças significativas entre os diferentes frascos ($F = 2,0$ menor que $F_c = 3,5$ e $p = 0,17$ para $\alpha = 0,05$) confirmando que o K se manteve estável também na temperatura de 50°C.

Como exemplo na Figura 6.15 são apresentados os resultados obtidos para o analito Zn. Os analitos restantes estão apresentados no Apêndice D.

Figura 6.15 – Estudo de tendências em função do tempo de exposição às duas temperaturas avaliadas para o analito Zn no estudo de estabilidade de curto prazo. Resultados obtidos para 20°C (a) e 50°C (b) com ajuste de curva linear.

Na etapa seguinte aplicou-se o teste de ANOVA para cada analito para avaliar se existiam diferenças significativas entre as duas temperaturas estudadas. Em todos os

casos os resultados obtidos foram satisfatórios, já que não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos resultados dos grupos expostos às diferentes temperaturas.

Na Tabela 6.32 são apresentadas as estatísticas de ANOVA para cada elemento, onde se pode observar que o valor de F obtido é menor que F crítico para todos os casos.

Tabela 6.32 – Estatísticas de ANOVA para resultados obtidos por INAA para o estudo de estabilidade de curto prazo

Elemento	MS_{entre}	MS_{dentro}	F	Valor p	$F_{critico}$
Cl	484462	696407	0,70	0,41	4,3
Co	0,0003	0,006	0,04	0,84	4,3
Fe	18	166	0,11	0,74	4,3
K	22409	564480	0,04	0,84	4,3
Mg	19	5657	0,003	0,95	4,3
Mn	0,07	0,41	0,16	0,69	4,3
Na	16210	103782	0,16	0,70	4,3
Se	0,003	0,085	0,03	0,86	4,3
Zn	0,0001	18,5	0,00006	0,998	4,3

F_c é o valor crítico da distribuição F para nível de significância $\alpha = 0,05$; $\nu_1 = 1$; $\nu_2 = 22$

Aplicou-se uma análise multivariada para descartar qualquer estrutura ou agrupamento de dados. Nos ensaios de estabilidade de curto e longo prazo as mesmas alíquotas de amostras que foram utilizadas para medir os elementos de meias vidas curtas foram reutilizadas para medir os elementos de meias vidas mais longas, motivo pelo qual foi realizada uma única análise de PCA e HCA para todos os analitos.

Na Figura 6.16 são apresentadas as duas componentes principais obtidas na análise de PCA e o dendograma obtido por HCA. Os resultados de todas as sub-amostras analisadas estão apresentados na figura. Para uma melhor interpretação na PCA os frascos expostos a 20°C estão representados na cor azul, os expostos a 50°C na cor laranja e o

frasco de controle na cor verde. Antes da aplicação dos testes estatísticos, os dados foram normalizados utilizando o valor médio e o desvio padrão.

Figura 6.16 – Representação gráfica das duas componentes principais (a) e dendograma obtido na HCA usando método de agrupamento de Ward e distâncias euclidianas (b) para o estudo de estabilidade de curto prazo por INAA.

Nos gráficos da PCA não se observam evidências de nenhum tipo de agrupamento confirmando os resultados obtidos na análise univariada.

No dendograma obtido por HCA, os resultados das diferentes sub-amostras analisadas estão separadas em três grupos a uma distância aproximada de 40 a 60 unidades, porém as sub-amostras expostas a uma mesma temperatura estão distribuídas nos três grupos obtidos, indicando que o agrupamento não está relacionado com a temperatura. Estes resultados confirmam os já obtidos na PCA e ANOVA.

Do conjunto de resultados obtidos no estudo de estabilidade de curto prazo, pode-se afirmar que, para os elementos analisados por INAA, o material é suficientemente estável para tornar-se um MR e que não é necessário efetuar o transporte do MR sob refrigeração.

6.6.2 Avaliação da estabilidade de curto prazo dos elementos analisados por ICP-MS

Para a avaliação da estabilidade de curto prazo nos elementos As, Cd e Cu foram utilizados os mesmos frascos que foram analisados por INAA. Foram analisadas 3 sub-amostras de cada um dos frascos. Os valores médios e incertezas expandidas para cada frasco se apresentam na Tabela 6.33. A incerteza padrão foi calculada usando o desvio padrão da média e o fator de abrangência, k , usado para expandir a incerteza, foi escolhido com base no valor da distribuição t de Student bicaudal para $(n - 1)$ graus de liberdade e 95% confiança.

Tabela 6.33 – Concentração média obtida por ICP-MS para cada um dos frascos analisados no estudo de estabilidade de curto prazo (base úmida)

Temperatura °C	Frasco	Tempo, semanas	As, $\mu\text{g kg}^{-1}$	Cd, $\mu\text{g kg}^{-1}$	Cu, mg kg^{-1}
20	49	8	207 ± 19	85 ± 36	$16,5 \pm 1,0$
	74	6	233 ± 51	66 ± 30	$17,0 \pm 2,4$
	142	4	209 ± 27	54 ± 13	$16,4 \pm 1,3$
	31	2	217 ± 30	82 ± 8	$16,8 \pm 1,3$
50	60	8	216 ± 11	69 ± 33	$16,7 \pm 1,0$
	33	6	222 ± 49	67 ± 30	$17,0 \pm 1,8$
	150	4	225 ± 37	73 ± 9	$16,6 \pm 0,8$
	136	2	231 ± 10	60 ± 31	$16,2 \pm 1,1$
-20	144	0	218 ± 19	74 ± 25	$16,5 \pm 1,3$

Como foi realizados nos estudos anteriores, primeiramente foram aplicados os testes de Grubbs, de Shapiro-Wilks e de Levene para verificar se eram cumpridas as condições para aplicar ANOVA. Os resultados obtidos para um nível de confiança de 95% podem ser observados na Tabela 6.34.

Tabela 6.34 – Resultados dos testes estatísticos realizados para avaliar os requisitos de ANOVA na avaliação da estabilidade de curto prazo por ICP-MS

Elemento	Grubbs (nº dados anômalos)	Shapiro-Wilks (valor p)	Levene (valor p)	<i>n</i>
As	-	0,47	0,56	27
Cd	2	0,85	0,15	25
Cu	-	0,66	0,73	27

Foram observados dois resultados anômalos no caso do Cd e os resultados apresentaram distribuição normal para todos os casos. As variâncias entre as duas temperaturas analisadas também resultaram homogêneas.

Para estudar se existiam tendências em função do tempo de exposição para cada uma das temperaturas analisadas, os resultados foram colocados em função do tempo para cada temperatura (20°C e 50°C) e realizaram-se ajustes de regressão linear e um ANOVA dos parâmetros de regressão, tal como já foi descrito na análise feita para os resultados obtidos por NAA. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 6.35.

Tabela 6.35 – Estatísticas de ANOVA da regressão linear para o estudo de tendências em função do tempo de exposição às duas temperaturas analisadas na avaliação da estabilidade de curto prazo por ICP-MS

Elemento	20°C		50°C		<i>F_c</i>
	<i>F</i>	Valor <i>p</i>	<i>F</i>	Valor <i>p</i>	
As	0,06	0,81	0,46	0,51	4,67
Cd	0,05	0,83	0,01	0,91	4,67
Cu	0,07	0,80	1,77	0,21	4,67

F_c é o valor crítico da distribuição *F* para nível de significância $\alpha = 0,05$; $\nu_1 = 1$; $\nu_2 = 13$

Da mesma forma que para os analitos analisados por INAA, não foram detectadas tendências significativas para nenhuma das duas temperaturas estudadas. Os valores de F resultaram sempre menores que o valor crítico e os valores p maiores que 0,05 para os três analitos determinados.

Como exemplo, na Figura 6.17 são apresentados os resultados obtidos para o analito As. Os analitos restantes estão apresentados no Apêndice D.

Figura 6.17 – Estudo de tendências em função do tempo de exposição às duas temperaturas avaliadas para o analito As no estudo de estabilidade de curto prazo. Resultados obtidos para 20°C (a) e 50°C (b) com ajuste de curva linear.

Na etapa seguinte aplicou-se o teste de ANOVA para cada analito para avaliar se existiam diferenças significativas entre as duas temperaturas estudadas. Em todos os casos os resultados obtidos foram satisfatórios, já que não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos grupos expostos as duas temperaturas.

Na Tabela 6.36 são apresentadas as estatísticas de ANOVA para cada elemento, onde se pode observar que o valor de F obtido é menor que F crítico para todos os casos e o valor de $p > 0,05$.

Tabela 6.36 – Estatísticas de ANOVA para resultados obtidos por ICP-MS para o estudo de estabilidade de curto prazo

Elemento	MS_{entre}	MS_{dentro}	F	$Valor\ de\ p$	$F_{crítico}$
As	293	204	1,43	0,24	4,3
Cd	94	178	0,53	0,48	4,35
Cu	57642	326564	0,18	0,68	4,3

F_c é o valor crítico da distribuição F para nível de significância $\alpha = 0,05$; $\nu_1 = 1$; $\nu_2 = 22$ para As e Cu e $\nu_2 = 20$ para Cd.

Para complementar os resultados obtidos também foi realizada a análise multivariada para descartar qualquer estrutura ou agrupamento de dados. Na Figura 6.18 são apresentadas as duas componentes principais obtidas na análise de PCA e o dendograma obtido por HCA. Os resultados de todas as sub-amostras analisadas estão apresentados na figura. Os dados foram normalizados utilizando o valor médio e o desvio padrão antes da aplicação dos testes estatísticos. Da mesma forma que para os elementos analisados por INAA, os frascos expostos a 20°C estão representados na cor azul, os expostos a 50°C na cor laranja e o frasco de controle na cor verde.

está relacionado com a temperatura. Estes resultados confirmam os já obtidos na PCA e ANOVA.

Do conjunto de resultados obtidos no estudo de estabilidade de curto prazo, pode se afirmar que, também para os elementos analisados por ICP-MS, o material é suficientemente estável para tornar-se um MR e que não será necessário efetuar o transporte do MR sob refrigeração.

6.6.3 Avaliação da estabilidade de curto prazo do elemento Hg analisados por CV AAS

Finalmente foi avaliada a estabilidade de curto prazo do elemento Hg por CV AAS. Os valores médios e incertezas expandidas para cada frasco são apresentados na Tabela 6.37. A incerteza padrão foi calculada usando o desvio padrão da média e o fator de abrangência, k , usado para expandir a incerteza, foi escolhido com base no valor da distribuição t de Student bicaudal para $(n - 1)$ graus de liberdade e 95% confiança.

Tabela 6.37 – Concentração média obtida por CV AAS para cada um dos frascos analisados no estudo de estabilidade de curto prazo (base úmida)

Temperatura, °C	Frasco	Tempo, semanas	Hg, $\mu\text{g kg}^{-1}$
20	49	8	$29,2 \pm 2,8$
	74	6	$33,2 \pm 15,0$
	142	4	$29,7 \pm 11,0$
	31	2	$24,2 \pm 5,5$
50	60	8	$32,1 \pm 3,2$
	33	6	$25,1 \pm 9,3$
	150	4	$26,3 \pm 3,2$
	136	2	$25,7 \pm 13,9$
-20	144	0	$26,9 \pm 5,3$

Da mesma forma que nos estudos anteriores, foram aplicados os testes de Grubbs, de Shapiro-Wilks e de Levene para verificar se eram cumpridas as condições para

aplicar ANOVA. Os resultados obtidos para um nível de confiança de 95% podem ser observados na Tabela 6.38.

Tabela 6.38 – Resultados dos testes estatísticos realizados para avaliar os requisitos de ANOVA na avaliação da estabilidade de curto prazo do Hg por CV AAS

Elemento	Grubbs (nº dados anômalos)	Shapiro-Wilks (Valor p)	Levene (Valor p)	<i>n</i>
Hg	1	0,99	0,20	26

Foi descartado um resultado anômalo e os resultados apresentaram distribuição normal. As variâncias entre as duas temperaturas analisadas também resultaram homogêneas.

Como nos analitos analisados pelas outras técnicas descritas, os resultados foram colocados em função do tempo para cada temperatura (20°C e 50°C) e realizaram-se ajustes de regressão linear e um ANOVA dos parâmetros de regressão, para avaliar a existência de tendências em função do tempo de exposição para cada uma das temperaturas analisadas. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 6.39.

Tabela 6.39 – Estatísticas de ANOVA da regressão linear para o estudo de tendências em função do tempo de exposição às duas temperaturas analisadas na avaliação da estabilidade de curto prazo do Hg por CV AAS

Elemento	20°C		50°C		<i>F_c</i>
	<i>F</i>	Valor <i>p</i>	<i>F</i>	Valor <i>p</i>	
Hg	2,6	0,13	2,2	0,16	4,67

F_c é o valor crítico da distribuição F para nível de significância $\alpha = 0,05$; $v_1 = 1$; $v_2 = 13$

O valor obtido para *F* é menor que o valor crítico e o valor *p* maior que 0,05 indicando que não foram detectadas tendências significativas nas condições estudadas para o analito Hg.

Na Figura 6.19 são apresentados os resultados obtidos para as duas temperaturas analisadas em função do tempo de exposição.

Figura 6.19 – Estudo de tendências em função do tempo de exposição às duas temperaturas avaliadas para o analito Hg no estudo de estabilidade de curto prazo. Resultados obtidos para 20°C (a) e 50°C (b) com ajuste de curva linear

Na etapa seguinte aplicou-se o teste de ANOVA para avaliar se existiam diferenças significativas entre as duas temperaturas estudadas. Na Tabela 6.40 são apresentados os resultados obtidos, onde se pode observar que o valor de F é menor que o F crítico e o valor de $p > 0,05$, indicando que não existem diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos frascos expostos as duas temperaturas, com um nível de confiança de 95%.

Tabela 6.40 – Estatísticas de ANOVA para resultados obtidos para o Hg por CV AAS no estudo de estabilidade de curto prazo

Elemento	MS_{entre}	MS_{dentro}	F	Valor de p	$F_{critico}$
Hg	11,4	17,6	0,65	0,43	4,32

F_c é o valor crítico da distribuição F para nível de significância $\alpha = 0,05$; $\nu_1 = 1$; $\nu_2 = 21$.

Analisando os resultados das avaliações estatísticas realizadas pode se concluir que a estabilidade de curto prazo obtida para o analito Hg também é satisfatória, permitindo sua certificação e transporte nas condições habituais.

6.6.4 Estimativa da componente de incerteza devida à estabilidade de curto prazo

Como já foi demonstrado, nas condições de transporte habituais do material de referência, a estabilidade dos elementos está garantida e portanto, a componente da incerteza devido à estabilidade de curto prazo pode ser desconsiderada neste caso (VAN DER VEEN et al, 2001b). Assim, no cálculo da incerteza do material de referência só será considerada a componente de incerteza da estabilidade de longo prazo calculada tal como está descrito no item 6.7.4.

6.7 Avaliação da estabilidade de longo prazo

6.7.1 Avaliação da estabilidade de longo prazo dos elementos analisados por INAA

Para os estudo de estabilidade a longo prazo foram escolhidos 9 frascos de forma aleatória. Os frascos nº10, 25, 28, 83, 105, 116, 135 e 153 foram expostos a temperatura ambiente (20 °C) por diferentes períodos de tempo (3, 6, 9 e 12 meses). O frasco nº30 foi armazenado a -20°C para ser usado como frasco de controle. Considerou-se que uma temperatura de 20°C era representativa das condições padrão nas quais são armazenados os MR. Os valores médios e incertezas expandidas ($k=2$) obtidos para cada frasco analisado são apresentados na Tabela 6.41.

Tabela 6.41 – Concentração média obtida por INAA para cada um dos frascos analisados no estudo de estabilidade de longo prazo (base úmida)

Tempo, meses	Frasco	Cl, %	Co, mg kg⁻¹	Fe, mg kg⁻¹	K, %	Mg, mg kg⁻¹
0	30	1,019±0,087	1,75±0,11	245±20	1,17±0,12	771±101
3	25	0,913±0,077	1,70±0,11	243±19	1,28±0,19	714±91
	116	0,934±0,079	1,67±0,11	253±20	1,13±0,13	662±88
6	28	0,941±0,080	1,66±0,11	242±21	1,17±0,12	689±122
	135	0,925±0,080	1,62±0,10	249±20	1,21±0,03	627±89
9	83	0,899±0,075	1,60±0,10	246±20	1,31±0,14	760±108
	105	0,949±0,079	1,62±0,10	242±19	1,18±0,14	703±94
12	10	0,983±0,082	1,71±0,11	245±19	1,15±0,10	829±117
	153	0,931±0,077	1,92±0,12	246±22	1,16±0,09	762±115

Tempo, meses	Frasco	Mn, mg kg⁻¹	Na, %	Se, mg kg⁻¹	Zn, mg kg⁻¹
0	30	5,3±1,0	0,866±0,024	6,9±0,5	93,3±4,6
3	25	5,3±1,0	0,837±0,023	6,9±0,5	91,1±4,5
	116	5,2±1,0	0,851±0,059	7,1±0,5	93,3±4,7
6	28	5,2±1,1	0,806±0,022	6,7±0,5	89,3±4,5
	135	5,0±1,0	0,853±0,059	6,9±0,5	92,1±4,5
9	83	4,9±0,9	0,841±0,023	6,7±0,5	90,5±4,4
	105	5,4±1,0	0,844±0,023	6,8±0,5	90,9±4,6
12	10	5,4±1,0	0,841±0,023	7,0±0,5	92,3±4,7
	153	5,1±1,0	0,848±0,023	6,9±0,5	93,5±4,7

Para avaliar a estabilidade foi verificado se existia alguma tendência em função do tempo de exposição dos frascos a temperatura ambiente. Para cada elemento, foram representados graficamente os resultados em função do tempo e realizaram-se ajustes de regressão linear e uma ANOVA dos parâmetros de regressão, tal como já foi descrito anteriormente.

Antes de efetuar a análise de tendências, foram aplicados aos resultados os testes de Grubbs e de Shapiro-Wilks. Os resultados obtidos para um nível de confiança de 95% podem ser observados na Tabela 6.42.

Tabela 6.42 – Resultados dos testes estatísticos realizados para avaliar os requisitos de ANOVA na avaliação da estabilidade de longo prazo por INAA

Elemento	Grubbs n° dados anômalos	Shapiro-Wilks valor p	<i>n</i>
Cl	-	0,44	27
Co	1	0,46	26
Fe	-	0,88	27
K	-	0,69	27
Mg	-	0,39	27
Mn	-	0,25	27
Na	-	0,27	27
Se	-	0,29	27
Zn	-	0,86	27

Só foi detectado um valor anômalo no caso do Co e os resultados apresentaram distribuição normal para todos os casos.

Os resultados obtidos no estudo de tendências em função do tempo são apresentados na Tabela 6.43.

Tabela 6.43 – Estatísticas de ANOVA da regressão linear para o estudo de tendências em função do tempo na avaliação da estabilidade de longo prazo por INAA

Elemento	<i>F</i>	Valor <i>p</i>	<i>F_c</i>
Cl	0,40	0,53	4,24
Co	1,22	0,28	4,26
Fe	0,11	0,74	4,24
K	1,94	0,18	4,24
Mg	1,79	0,19	4,24
Mn	0,06	0,81	4,24
Na	0,38	0,54	4,24
Se	0,26	0,62	4,24
Zn	0,05	0,83	4,24

F_c é o valor crítico da distribuição F para nível de significância $\alpha = 0,05$; $\nu_1 = 1$; $\nu_2 = 25$ menos para o Co onde $\nu_2 = 24$

Todos os resultados no estudo de tendências foram satisfatórios. Os valores F resultaram sempre menores que o F crítico e os valores de p maiores que 0,05 pelo que pode ser afirmado com um nível de confiança de 95% que não existem tendências em função do tempo para nenhum dos elementos no período estudado.

Como exemplo na Figura 6.20 são apresentados os resultados obtidos para os analitos Mn e Na. Os analitos restantes estão apresentados no Apêndice E.

Figura 6.20 – Estudo de tendências em função do tempo de exposição a 20°C no estudo de estabilidade de curto prazo. Resultados obtidos para o analito Mn (a) e o analito Na (b) com ajuste de curva linear

6.7.2 Avaliação da estabilidade de longo prazo dos elementos analisados por ICP-MS

Para a avaliação da estabilidade de longo prazo nos elementos As, Cd e Cu foram utilizados os mesmos frascos que foram analisados por INAA. Foram analisadas 3 sub-amostras de cada um dos frascos. Os valores médios e incertezas expandidas para cada frasco se apresentam na Tabela 6.44. A incerteza padrão foi calculada usando o desvio padrão da média e o fator de abrangência, k , usado para expandir a incerteza, foi escolhido com base no valor da distribuição t de Student bicaudal para $(n - 1)$ graus de liberdade e 95% confiança.

Tabela 6.44 – Concentração média obtida por ICP-MS para cada um dos frascos analisados no estudo de estabilidade de longo prazo (base úmida).

Tempo, meses	Frasco	As, $\mu\text{g kg}^{-1}$	Cd, $\mu\text{g kg}^{-1}$	Cu, mg kg^{-1}
0	30	217 ± 17	60 ± 16	$16,3 \pm 2,2$
3	25	220 ± 5	76 ± 31	$15,9 \pm 0,5$
	116	226 ± 27	69 ± 27	$16,1 \pm 0,7$
6	28	209 ± 5	61 ± 34	$16,4 \pm 2,2$
	135	229 ± 25	68 ± 42	$15,9 \pm 1,9$
9	83	225 ± 33	73 ± 26	$16,2 \pm 1,0$
	105	210 ± 25	59 ± 11	$15,5 \pm 0,2$
12	10	217 ± 45	53 ± 11	$16,2 \pm 2,0$
	153	222 ± 22	51 ± 9	$16,2 \pm 2,3$

Para avaliar a estabilidade, foram realizadas as mesmas etapas que no estudo por INAA. Foram aplicados aos resultados os testes de Grubbs e de Shapiro-Wilks e depois se estudou se existia alguma tendência em função do tempo de exposição dos frascos a temperatura ambiente. Para cada elemento, foram representados graficamente os resultados em função do tempo e realizaram-se ajustes de regressão linear e uma ANOVA dos parâmetros de regressão, tal como já foi descrito anteriormente.

Os resultados obtidos para um nível de confiança de 95% podem ser observados nas Tabelas 6.45 e 6.46.

Tabela 6.45 – Resultados dos testes estatísticos realizados para avaliar os requisitos de ANOVA na avaliação da estabilidade de longo prazo por ICP-MS

Elemento	Grubbs n° dados anômalos	Shapiro-Wilks valor p	n
As	-	0,32	27
Cd	-	0,02	27
Cu	-	0,23	27

Na Tabela 6.45 pode ser observado que não foram detectados valores anômalos e que os resultados apresentaram distribuição normal para todos os casos, exceto o Cd. Porém, aplicando outros testes de normalidade para este elemento como o teste de Kolmogorov-Smirnov-Lillieford e o teste de Jarque-Bera os resultados foram satisfatórios pelo que se decidiu continuar com a análise de regressão.

Tabela 6.46 – Estatísticas de ANOVA da regressão linear para o estudo de tendências em função do tempo na avaliação da estabilidade de longo prazo por ICP-MS.

Elemento	<i>F</i>	Valor p	<i>F_c</i>
As	0,06	0,80	4,24
Cd	4,12	0,053	4,24
Cu	0,02	0,90	4,24

F_c é o valor crítico da distribuição F para nível de significância $\alpha = 0,05$; $v_1 = 1$; $v_2 = 25$.

Todos os resultados obtidos no estudo de tendências foram satisfatórios, com valores de F menores que o F crítico e valores de p maiores que 0,05 indicando com um nível de confiança de 95% que não existem tendências em função do tempo para nenhum dos elementos no período estudado. Porém, os resultados obtidos para o Cd ficaram muito perto dos valores críticos, fato que será considerado na hora de decidir a possível certificação deste elemento.

Na Figura 6.21 são apresentados os resultados obtidos no estudo de tendências em função do tempo para os três analitos.

Figura 6.21 – Estudo de tendências em função do tempo de exposição a 20°C no estudo de estabilidade de longo prazo. Resultados obtidos para o analito As (a), o analito Cd (b) e o analito Cu (c) com ajuste de curva linear.

6.7.3 Avaliação da estabilidade de longo prazo do elemento Hg analisados por CV AAS

Para a avaliação da estabilidade de longo prazo no elemento Hg foram utilizados os mesmos frascos que foram analisados por INAA e ICP-MS. Foram analisadas 3 sub-amostras de cada um dos frascos. Os valores médios e incertezas expandidas para cada frasco são apresentados na Tabela 6.47. Assim como no item anterior, a incerteza padrão foi calculada usando o desvio padrão da média e o fator de abrangência, k , usado para expandir a incerteza, foi escolhido com base no valor da distribuição t de Student bicaudal para $(n - 1)$ graus de liberdade e 95% confiança.

Tabela 6.47 – Concentração média obtida para o Hg por CV AAS para cada um dos frascos analisados no estudo de estabilidade de longo prazo (base úmida)

Tempo, meses	Frasco	Hg, $\mu\text{g kg}^{-1}$
0	30	$26,0 \pm 6,4$
3	25	$30,2 \pm 9,9$
	116	$29,5 \pm 6,2$
6	28	$29,7 \pm 13,2$
	135	$25,2 \pm 10,4$
9	83	$24,7 \pm 5,5$
	105	$23,4 \pm 7,0$
12	10	$22,5 \pm 1,9$
	153	$21,3 \pm 4,6$

Para avaliar a estabilidade foram realizadas as mesmas etapas que nos estudos por INAA e ICP-MS. Foram aplicados aos resultados os testes de Grubbs e de Shapiro-Wilks e depois se estudou se existia alguma tendência em função do tempo de exposição dos frascos a temperatura ambiente. Para cada elemento, foram representados graficamente os resultados em função do tempo e realizaram-se ajustes de regressão linear e um ANOVA dos parâmetros de regressão, tal como já foi descrito anteriormente.

Os resultados obtidos para um nível de confiança de 95% podem ser observados nas Tabelas 6.48 e 6.49.

Tabela 6.48 – Resultados dos testes estatísticos realizados para avaliar os requisitos de ANOVA na avaliação da estabilidade de longo prazo do Hg por CV AAS

Elemento	Grubbs nº dados anômalos	Shapiro-Wilks Valor p	n
Hg	-	0,42	27

Para o elemento Hg não foram detectados valores anômalos e os resultados apresentaram distribuição normal.

Tabela 6.49 – Estatísticas de ANOVA da regressão linear para o estudo de tendências em função do tempo na avaliação da estabilidade de longo prazo do Hg por CV AAS

Elemento	F	Valor p	F_c
Hg	12,4	0,002	4,24

F_c é o valor crítico da distribuição F para nível de significância $\alpha = 0,05$; $\nu_1 = 1$; $\nu_2 = 25$.

Na Figura 6.22 são apresentados os resultados obtidos no estudo de tendências em função do tempo para os Hg.

Figura 6.22 – Estudo de tendências em função do tempo de exposição a 20°C no estudo de estabilidade de longo prazo. Resultados obtidos para o analito Hg com ajuste de curva linear.

Como pode ser observado claramente na Tabela 6.47 e na Figura 6.19, no caso do mercúrio foi obtida uma tendência clara em função do tempo no período estudado, devida provavelmente à volatilidade do elemento e a que está presente em concentração muito baixa. Apesar de que existem numerosos MRC com matriz biológica nos quais a estabilidade do Hg tem sido bem estabelecida (IAEA, 2016; IRMM 2013; MOREIRA, 2010a; NIST, 2015, 2017; NRC, 2012, 2014; ULRICH e SARKIS, 2013) em todos eles os níveis de Hg são mais altos. Por outro lado as matrizes destes MRC são de peixes e animais de origem marinha motivo pelo qual muito do Hg está presente como metil mercúrio o que aumentaria a sua estabilidade. Existem antecedentes reportados de instabilidade do elemento mercúrio em materiais de origem cárnea. WAGSTAFFE et al. (1987), na certificação de músculo e fígado bovino e rim suíno, informaram ter detectado perdas no elemento Hg quando os materiais eram mantidos a 30°C pelo período de um ano, pelo que recomendaram o seu armazenamento refrigerado. Os teores do elemento nestes materiais eram da mesma ordem de grandeza que no candidato a material de referência deste trabalho.

6.7.4 Estimativa da componente de incerteza devida à estabilidade de longo prazo

No Guia ISO 35 (ISO, 2006) sugerem-se duas abordagens para a estimativa da componente de incerteza devida à estabilidade de longo prazo. A abordagem mais conservadora foi proposta por Linsinger et al. (2001b) e será a utilizada neste trabalho.

Nesta abordagem, a incerteza devida à estabilidade de longo prazo (u_{lts}) baseia-se na curva de regressão obtida para a concentração em função do tempo no estudo de estabilidade de longo prazo. Quando a tendência não é significativa, a incerteza na determinação do coeficiente angular (u_a) da curva de regressão pode ser considerada como a incerteza correspondente à determinação do grau de degradação do material. Para definir a incerteza na estabilidade (u_{lts}) é necessário definir um tempo de validade ou tempo de prateleira (t), já que a maior tempo de prateleira maior será a contribuição da incerteza na estabilidade.

Esta incerteza pode ser calculada então, de acordo com a Equação 6.18

$$u_{lts} = u_a \times t \quad (6.18)$$

Na Tabela 6.50 são apresentados os coeficientes angulares, suas incertezas associadas e a componente de incerteza devida à estabilidade para um tempo de prateleira de 24 meses. Os coeficientes angulares e suas incertezas foram obtidos dos testes de ANOVA para regressão linear apresentados nos itens anteriores. Também é apresentada na Tabela 6.50 a incerteza da estabilidade relativa às concentrações médias obtidas para cada elemento nos frascos analisados.

Tabela 6.50 – Estimativa da incerteza padrão devida à estabilidade de longo prazo para um tempo de prateleira de 24 meses

Elemento	$a, \text{mg kg}^{-1} \text{ mês}^{-1}$	$u_a, \text{mg kg}^{-1} \text{ mês}^{-1}$	$u_{lts}, \text{mg kg}^{-1}$	$u_{lts \text{ relativa}}, \%$
As	-0,00014	0,00053	0,0128	5,8
Cd	-0,00113	0,00055	0,0133	21,0
Cl	-20,8	32,7	784	8,4
Co	-0,004	0,004	0,1	5,4
Cu	-0,004	0,030	0,7	4,6
Fe	-0,17	0,50	12,1	4,9
K	-90,4	64,8	1556	12,7
Mg	6,0	4,45	107	15,0
Mn	-0,007	0,028	0,7	12,9
Na	-8,9	14,4	345	4,1
Se	-0,008	0,016	0,4	5,6
Zn	-0,033	0,153	3,7	4,0

Os valores obtidos para u_{lts} são considerados aceitáveis em todos os casos exceto para o Cd, confirmando que para este elemento não poderá ser certificado o valor de concentração no material.

6.8 Certificação do candidato a MR

Para a atribuição de valor às propriedades de interesse no candidato a MR foi organizada uma comparação interlaboratorial. Foi realizado um convite amplo a laboratórios de reconhecida trajetória do Brasil e do exterior, e também foram convidados laboratórios de redes metrológicas do Brasil. Trinta e três laboratórios confirmaram sua participação, sendo 26 do Brasil e 7 do exterior. Dos trinta e três participantes, trinta enviaram resultados para pelo menos 1 elemento, sendo 23 participantes do Brasil, 3 da Argentina, 1 da Áustria, 1 da Bélgica, 1 da Eslovênia e 1 do Peru.

Para contar com uma ferramenta adicional para avaliar os resultados dos laboratórios e escolher quais dos resultados poderiam ser utilizados para estimar os valores de concentração dos elementos de interesse, foi enviado um MRC de tecido de peixe, “IPEN 001-Trace element in fish tissue”, que foi preparado pelo IPEN no âmbito do Projeto de Cooperação Técnica RLA 2/014 da IAEA “Melhoria da qualidade analítica através de testes de proficiência e certificação de materiais de referência de matriz usando técnicas analíticas nucleares e relacionadas, na Rede Latino Americana de técnicas analíticas nucleares - ARCAL XCVII” (IAEA, 2010) e cujo certificado está apresentado no Anexo A.

Os elementos de interesse para a caracterização foram As, Cd, Cl, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Na, Pb, Se e Zn, mas os participantes foram convidados a realizar qualquer outra determinação que fosse de seu interesse. Pediu-se aos participantes que fizessem três determinações independentes dos elementos em cada frasco, utilizando métodos a sua escolha e que enviassem os resultados expressos em mg kg^{-1} , em massa seca, juntamente com descrição do método utilizado e a incerteza de medição. Foram apresentados resultados para 29 elementos, os 15 elementos solicitados mais 14 elementos adicionais. Os resultados informados pelos participantes para as amostras do candidato a MR (denominado IPEN RB1 - Trace elements in bovine kidney) e o MRC enviado como controle de qualidade são apresentados no Apêndice F. Na Tabela 6.51 estão listados os métodos utilizados pelos participantes na determinação dos elementos. No Apêndice G pode-se encontrar uma tabela indicando qual método foi utilizado na determinação de cada analito em particular.

Para representar o LAN foram escolhidos aleatoriamente três resultados de um mesmo frasco do estudo de homogeneidade entre frascos. O código atribuído para o LAN é o número 12.

Tabela 6.51 – Métodos analíticos utilizados pelos laboratórios participantes na determinação dos elementos nas amostras da comparação interlaboratorial.

Abreviatura	Método analítico
CV AAS	Espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio
GF AAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite
F AAS	Espectrometria de absorção atômica de chama
TDA AAS	Espectrometria de absorção atômica com decomposição térmica
IC	Cromatografia iônica
ICP-MS	Espectrometria de massa com fonte de plasma acoplada indutivamente
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com fonte de plasma acoplada indutivamente
MP AES	Espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma induzido por micro-ondas
INAA	Análise por ativação neutrônica instrumental
k0 INAA	Análise por ativação neutrônica instrumental com padronização k0
TXRF	Fluorescência de raios X por reflexão total

Junto com as planilhas para informar os resultados foi enviado um questionário solicitando informação sobre os detalhes da aplicação das metodologias utilizadas, como a calibração, cálculo de incertezas e como estabeleciam a rastreabilidade das medições. Apesar de serem conceitos que já deveriam ser bem conhecidos e aplicados nos laboratórios, ainda alguns deles não responderam às perguntas ou responderam com conceitos metrológicos errados, sobre tudo no que diz respeito à rastreabilidade.

Para que os resultados obtidos nos diferentes laboratórios pudessem ser comparados, foi solicitado aos laboratórios que seguissem um protocolo recomendado para a determinação da umidade nas amostras e que enviassem os resultados obtidos, apresentados na Tabela 6.52.

Tabela 6.52 – Teor de umidade informado pelos participantes para as amostras enviadas no ensaio interlaboratorial de certificação.

Laboratório n°	Umidade, %		Laboratório n°	Umidade, %	
	IPEN RB1	MRC QC		IPEN RB1	MRC QC
1	4,8	3,6	19	10,05	9,79
2	5,24	4,48	20	4,3	2,4
3	5,03	3,35	21	4,7	ni
4	6,37	4,0	22	34	31
5	4,7	3,1	23	< 0,5	< 0,5
8	ni	ni	24	5,49	3,5
10	13,14	7,93	25	7,6	4,9
11	3,1	1,9	26	3,8	5,2
12	5,15	3,55	27	4,94	3,54
13	4,1	3,7	28	5,8	3,9
14	4,6	2,94	29	4,5	3,3
15	2,82	0,98	30	4,59	3,82
16	2,799	4,621	31	5,0	4,6
17	4,347	2,906	32	3,91	2,74
18	4,64	3,47	33	6,65	5,64

ni = não informado pelo participante

Como pode ser observado na Tabela 6.52 existem diferenças entre os resultados informados, devidas provavelmente a que não foi aplicado o protocolo recomendado. Solicitou-se a alguns dos laboratórios a revisão dos dados informados, mas confirmaram a informação pelo que não foi tomada nenhuma medida e os resultados para os elementos foram considerados tal como informados pelos participantes.

6.8.1 Avaliação dos resultados da comparação interlaboratorial

A avaliação dos resultados da comparação interlaboratorial foi realizada em duas etapas. Na primeira etapa, foram analisados os resultados informados para o MRC enviado como controle de qualidade. Foram aplicadas diversas técnicas estatísticas para estimar um valor de consenso do grupo de laboratórios para este material. A comparação do valor de referência declarado no certificado com os valores obtidos pelas diferentes técnicas permitiu escolher a metodologia estatística mais adequada para ser aplicada na determinação do valor de consenso do candidato a material de referência de rim bovino.

Na segunda etapa foram analisados os resultados enviados para o candidato a material de referência de rim bovino. Para atribuir os valores as concentrações no MR candidato só foram considerados os laboratórios que obtiveram resultados satisfatórios no MRC enviado como controle de qualidade e que fizeram uma adequada declaração da rastreabilidade dos seus resultados. A seguir, se detalha cada uma destas etapas.

6.8.1.1 Avaliação dos resultados enviados para o material de referência IPEN 001-Trace element in fish tissue (MRC QC).

6.8.1.1.1 Valor de referência e valor de consenso

Primeiramente foram aplicadas diferentes técnicas estatísticas para determinar um valor de consenso para este material e compará-lo com o valor de referência. As técnicas aplicadas, descritas na norma ISO 13528 (ISO, 2015d) estão listadas na Tabela 6.53.

A finalidade de todas as técnicas utilizadas é a de se obter valores estimados para o valor médio e a dispersão do grupo de dados. O valor obtido para a média será denominado como valor de consenso e o obtido para a dispersão será denominado desvio padrão.

Tabela 6.53 – Métodos estatísticos aplicados para o cálculo do valor de consenso e desvio padrão dos resultados obtidos na comparação interlaboratorial para o MRC IPEN 001-Trace element in fish tissue.

Método clássico

Método robusto do Algoritmo A

Método robusto – mediana / intervalo interquartil normalizado, IQN

Método robusto – mediana / desvio absoluto da mediana, MAD

Método robusto – Hampel / método Q

Normalmente não é necessário investigar se a população de dados tem uma distribuição normal, mas sim é importante verificar se a distribuição é aproximadamente simétrica (THOMPSON et al., 2006). Com este intuito foi representada para cada elemento a distribuição de densidade de Kernel. Os gráficos são apresentados no Apêndice H. A distribuição de densidade de Kernel é um método não paramétrico que permite conhecer a distribuição de uma população sem fazer a suposição prévia de normalidade da mesma (SILVERMAN, 1998). No caso de existirem desvios da simetria é mandatório o uso de métodos estatísticos robustos, para o cálculo dos parâmetros que caracterizam a população. Os métodos robustos são menos afetados por valores extremos ou desvios na distribuição dos dados (ELLISON et al.; 2009).

Os diferentes estimadores estatísticos utilizados em cada método aplicado para obter o valor de consenso e de desvio padrão se descrevem brevemente a seguir.

Método clássico

No método denominado como “clássico” primeiro são aplicados testes para exclusão de dados anômalos aos resultados informados pelos participantes. Neste trabalho foram utilizados os testes C de Cochran e Grubbs (HORWITZ, 1995; ISO, 1994).

O teste C de Cochran é utilizado para avaliar se a variância (ou desvio padrão) nos resultados de um determinado laboratório é estatisticamente comparável com a variância obtida pelos outros laboratórios do grupo. Todas as variâncias devem estar calculadas a partir do mesmo número de réplicas (três neste caso).

O teste de Grubbs está baseado na hipótese de que os valores médios dos resultados do grupo de participantes seguem uma distribuição normal. O teste é aplicado para detectar se algum dos resultados informados não cumpre esta suposição, caso em que se denomina valor anômalo.

Após a exclusão dos dados anômalos encontrados é calculada a média aritmética, para estimar o valor de consenso, e para estimar a dispersão do conjunto de resultados é aplicado uma ANOVA. A partir das médias quadráticas obtidas na ANOVA é possível calcular a variância entre laboratórios e, portanto, o desvio padrão (s).

Método robusto do Algoritmo A

Este algoritmo é aplicado aos valores médios dos dados informados pelos laboratórios participantes para cada amostra. Os valores robustos para estimar a média (x^*) e o desvio padrão (s^*) se calculam como se descreve a seguir.

Denote-se aos p dados, na ordem crescente:

$$x_1, x_2, \dots, x_i, \dots, x_p$$

Calcular os valores iniciais de x^* e σ^* como,

$$x^* = \text{mediana de } x_i \quad (i = 1, 2, \dots, p) \quad (6.19)$$

$$s^* = 1,483 \times \text{mediana de } |x_i - x^*| \quad (i = 1, 2, \dots, p) \quad (6.20)$$

Calcular

$$\varphi = 1,5 \times \sigma^* \quad (6.21)$$

Para cada x_i calcular,

$$x_i^* = x^* - \varphi \quad \text{se } x_i^* < x^* - \varphi \quad (6.22)$$

$$x_i^* = x^* + \varphi \quad \text{se } x_i^* > x^* + \varphi \quad (6.23)$$

$$x_i^* = x_i \quad \text{em qualquer outro caso} \quad (6.24)$$

Recalcular os valores de x^* e s^* como,

$$x^* = \sum x_i^* / p \quad (6.25)$$

$$s^* = 1,134 \sqrt{\sum (x_i^* - x^*)^2 / (p - 1)} \quad (6.26)$$

Os estimadores robustos de x^* e s^* se derivam de um cálculo iterativo, repetindo o passo anterior até o processo convergir. A convergência pode ser assumida quando a mudança de x^* e s^* entre um cálculo e outro está no terceiro algarismo significativo.

Método robusto – mediana / intervalo interquartil normalizado, IQN

Este método utiliza a mediana como estimador robusto do valor médio da população de dados e, como estimador robusto do desvio padrão, utiliza o intervalo interquartil normalizado, IQN, calculado da seguinte forma:

$$IQN = 0,7413(Q_3 - Q_1) \quad (6.27)$$

onde,

Q_3 é o maior quartil, valor acima do qual se encontram $\frac{1}{4}$ dos resultados.

Q_1 é o menor quartil, valor abaixo do qual se encontram $\frac{1}{4}$ dos resultados.

Método robusto – mediana / desvio absoluto da mediana, MAD

Da mesma forma que o método anterior, este método também utiliza a mediana como estimador robusto do valor médio da população de dados. O estimador robusto do desvio padrão, baseado no desvio absoluto da mediana, MAD, é calculado utilizando a Equação 6.20.

Estes dois últimos métodos apresentam a vantagem de estarem baseados em cálculos muito simples e provaram ter sido adequados para uma grande quantidade de comparações interlaboratoriais (ISO, 2015d).

Método robusto – Hampel / método Q

Este método envolve cálculos matemáticos mais complexos, mas os resultados obtidos são mais adequados em alguns casos como, por exemplo, quando a distribuição dos resultados é bimodal ou muito assimétrica.

O método Q é um método robusto para estimar o desvio padrão, que é independente do valor médio. Frequentemente é utilizado em associação com valores médios estimados utilizando o estimador Hampel. Devido à sua complexidade, as equações matemáticas utilizadas para o cálculo não são apresentadas neste trabalho, mas podem ser consultadas nas normas ISO 13528 (ISO, 2015d) ou ISO 20612 (ISO, 2007).

Para o cálculo dos estimadores deste método foi utilizado um programa estatístico desenvolvido por KOCH (2011).

Para cada um dos métodos descritos é possível calcular a incerteza associada ao valor médio estimado, ou valor de consenso. Para o método clássico a incerteza é calculada partindo do desvio padrão calculado utilizando ANOVA, segundo a Equação 6.28 (VAN DE VEEN, 2001c).

$$u_c = \frac{s}{\sqrt{p}} \quad (6.28)$$

No entanto, para os métodos robustos a incerteza é calculada usando a Equação 6.29.

$$u_c = 1,25 \times \frac{s^*}{\sqrt{p}} \quad (6.29)$$

onde p é o número de resultados envolvidos no cálculo e s^* o estimador robusto para o desvio padrão.

Os cinco métodos estatísticos descritos foram aplicados aos resultados enviados pelos laboratórios participantes para o MRC enviado como amostra de controle de qualidade. Os únicos laboratórios excluídos da análise foram os laboratórios participantes que não declararam a rastreabilidade dos seus resultados. Estes laboratórios foram os nº 8, 19, 22, 28 e 30.

Na Tabela 6.54 são apresentados os valores obtidos pela aplicação dos métodos estatísticos para os analitos certificados no MRC, junto com o valor de referência declarado no certificado e as incertezas associadas em cada caso. Na Figura 6.23 é apresentada uma representação gráfica dos resultados para alguns elementos selecionados.

Tabela 6.54 – Valores certificados e valores de consenso, em mg kg^{-1} , obtidos pela aplicação dos cinco testes estatísticos estudados, junto com as incertezas expandidas associadas ($k=2$)

Elemento	Valor de referência	Método clássico	Algoritmo A	Mediana - IQN
As	$5,90 \pm 0,27$	$5,16 \pm 0,64$	$5,36 \pm 0,79$	$5,56 \pm 0,44$
Cd	$0,020 \pm 0,002$	$0,10 \pm 0,08$	$0,10 \pm 0,12$	$0,024 \pm 0,12$
Cu	$1,16 \pm 0,07$	$1,15 \pm 0,19$	$1,57 \pm 0,80$	$1,21 \pm 0,24$
Fe	$13,55 \pm 1,05$	$13,44 \pm 1,37$	$13,98 \pm 1,80$	$13,90 \pm 1,11$
Hg	$0,88 \pm 0,12$	$0,86 \pm 0,15$	$0,91 \pm 0,10$	$0,97 \pm 0,08$
K	12555 ± 490	10780 ± 1446	11101 ± 1877	12266 ± 1700
Mn	$0,370 \pm 0,027$	$0,40 \pm 0,09$	$0,44 \pm 0,13$	$0,41 \pm 0,06$
Na	4775 ± 145	4339 ± 479	4569 ± 408	4705 ± 212
Se	$2,95 \pm 0,14$	$2,65 \pm 0,57$	$2,89 \pm 0,59$	$2,94 \pm 0,40$
Zn	$16,65 \pm 0,50$	$15,31 \pm 1,47$	$16,12 \pm 1,92$	$16,60 \pm 0,86$

Elemento	Valor de referência	Mediana - MAD	Hampel - Método Q
As	$5,90 \pm 0,27$	$5,56 \pm 0,48$	$5,28 \pm 0,67$
Cd	$0,020 \pm 0,002$	$0,024 \pm 0,018$	$0,030 \pm 0,024$
Cu	$1,16 \pm 0,07$	$1,21 \pm 0,16$	$1,17 \pm 0,36$
Fe	$13,55 \pm 1,05$	$13,90 \pm 1,51$	$13,37 \pm 2,04$
Hg	$0,88 \pm 0,12$	$0,97 \pm 0,04$	$0,95 \pm 0,07$
K	12555 ± 490	12266 ± 750	12252 ± 936
Mn	$0,370 \pm 0,027$	$0,41 \pm 0,08$	$0,40 \pm 0,10$
Na	4775 ± 145	4705 ± 201	4723 ± 273
Se	$2,95 \pm 0,14$	$2,94 \pm 0,29$	$2,88 \pm 0,54$
Zn	$16,65 \pm 0,50$	$16,60 \pm 0,97$	$16,12 \pm 1,02$

Figura 6.23 – Resultados obtidos com os métodos estatísticos aplicados na avaliação do MRC QC para alguns elementos selecionados, em vermelho o valor de referência certificado e sua incerteza expandida

Em primeiro lugar foi realizada a inspeção visual dos gráficos de distribuição de densidade de Kernel, onde podem ser observados desvios da simetria para alguns elementos. Por este motivo, decidiu-se que a utilização de métodos estatísticos robustos para a estimativa dos parâmetros da população de dados era a melhor escolha.

Por outro lado, foram comparados os valores de consenso obtidos pelos diferentes métodos com o valor de referência do material. Para a maioria dos elementos o

valor de consenso que resultou mais próximo com o valor de referência foi o valor estimado utilizando a mediana.

Para escolher entre os dois métodos robustos que utilizam a mediana como estimador do valor médio, se analisaram as incertezas obtidas em cada caso. Apesar de que não existiram grandes diferenças entre elas, optou-se por um enfoque mais conservador e foi escolhido o método que utiliza o IQN para estimar o desvio padrão, já que se obtiveram em geral incertezas maiores. Esse valor de consenso será utilizado para avaliar os laboratórios no caso dos elementos que não tem valor de referência declarado. Na Tabela 6.55 são apresentados os valores de consenso e desvio padrão estimados para todos os analitos pelo método robusto escolhido, os valores de referência declarados no certificado, quando disponíveis, e as incertezas expandidas associadas.

Tabela 6.55 – Valores certificados e valores de consenso e desvio padrão calculados para o MRC IPEN 001-Trace element in fish tissue utilizando o método robusto da mediana e IQN, com incertezas expandidas ($k = 2$)

Elemento	Valor de referência	Valor de consenso	Desvio padrão	p
	mg kg⁻¹	mg kg⁻¹	mg kg⁻¹	
As	5,90 ± 0,27	5,56 ± 0,44	0,73	18
Cd	0,020 ± 0,002	0,024 ± 0,12	0,14	8
Cl	nd	4737 ± 1245	1114	5
Co	nd	0,150 ± 0,020	0,024	9
Cr	nd	nc	nc	3
Cu	1,16 ± 0,07	1,21 ± 0,24	0,29	9
Fe	13,55 ± 1,05	13,90 ± 1,11	2,56	20
Hg	0,88 ^a ± 0,12 ^a	0,97 ± 0,08	0,12	13
K	12555 ± 490	12266 ± 1700	2804	17
Mg	nd	1072 ± 60	95	16
Mn	0,370 ± 0,027	0,41 ± 0,06	0,08	8
Na	4775 ± 145	4705 ± 212	360	18
Pb	nd	nc	nc	6
Se	2,95 ± 0,14	2,94 ± 0,40	0,61	15
Zn	16,65 ± 0,50	16,60 ± 0,86	1,50	19

^a = valor informativo; nc= não calculado; nd = não declarado; p = número de dados envolvidos nos cálculos

Para os elementos Cr e Pb não foi possível realizar a análise estatística uma vez que os dados apresentados foram poucos e apresentaram dispersão muito elevada.

No caso do Cl foram informados poucos resultados, mas a dispersão entre eles não foi considerada muito alta, motivo pelo qual foi possível estimar um valor de consenso e um desvio aceitáveis.

No caso do Cd, apesar de haver dados suficientes, a incerteza obtida para o valor de consenso resultou muito elevada. Este fato se deve a que o valor estimado para o desvio padrão resultou muito grande. Analisando a distribuição dos resultados foi observada uma distribuição bimodal, tal como é apresentado na Figura 6.24.

Figura 6.24 – Representação gráfica da densidade de Kernel para os dados informados pelos participantes para o elemento Cd no MRC IPEN 001-Trace element in fish tissue

Apesar de que, pela presença deste tipo de distribuição, a eleição do método robusto para estimar os parâmetros da população de dados é adequada, o valor de desvio resulta elevado em excesso. Por este motivo, na hora de avaliar os resultados dos participantes não será considerado este desvio, tal como se explica no item a seguir.

Na Figura 6.25 são apresentados os resultados informados pelos participantes para o MRC QC para elementos selecionados. Nos gráficos também estão representados os valores de referência e os valores de consenso calculados, com suas respectivas incertezas expandidas associadas. Os laboratórios n°8, 19, 22, 28 e 30, excluídos da análise, estão apresentados na cor vermelha. Os elementos restantes estão apresentados no Apêndice I.

Figura 6.25– Resultados informados pelos participantes para o MRC QC, junto com os valores de referência, valores de consenso e incertezas expandidas associadas, para elementos selecionados

6.8.1.1.2 Avaliação do desempenho dos laboratórios participantes

A avaliação do desempenho é normalmente realizada na base de parâmetros (“scores”) que permitem comparar se um determinado resultado é diferente de um valor designado para o material medido, dentro de um desvio ou incerteza aceitável. Este desvio pode ser estabelecido de diferentes formas dependendo do propósito da intercomparação (ISO, 2015d).

Neste trabalho foram usados dois critérios diferentes. Em primeiro lugar, a avaliação do desempenho dos laboratórios foi realizada utilizando o parâmetro z definido a seguir:

$$z = \frac{(x_i - x_d)}{\sigma} \quad (6.30)$$

onde:

x_i = valor médio informado pelos participantes para um determinado analito.

x_d = valor designado.

σ = desvio padrão.

O valor designado foi o valor de referência do MRC. Para os elementos que não tinham valor de referência declarado no certificado, foi utilizado o valor de consenso (mediana) definido no item anterior.

O desvio padrão utilizado foi o IQN, calculado tal como já foi descrito, exceto para o caso do elemento Cd. O desvio para este elemento resultou muito elevado, pelos motivos já expostos. Portanto, utiliza-lo como critério de aceitação para as diferenças entre os resultados enviados e o valor designado não é aceitável, já que resultaria num critério demasiado permissivo. Decidiu-se por tomar um desvio de 30% do valor de referência, valor obtido com a equação de Horwitz (HORWITZ e ALBERT, 2006). Este desvio é amplamente utilizado pelos provedores de ensaios de proficiência como critério de aceitação dos resultados dos participantes, e está baseado num modelo matemático empírico que relaciona o desvio padrão do conjunto de dados de um grupo de laboratórios, com a concentração do analito analisado. A função matemática foi desenvolvida a partir de dados de um grande número de intercomparações independentes.

Uma vez calculado o parâmetro z , os resultados dos laboratórios avaliam-se segundo a seguinte classificação:

$$|z| \leq 2 \text{ desempenho satisfatório}$$

$$2 < |z| < 3 \text{ desempenho questionável}$$

$$|z| \geq 3 \text{ desempenho insatisfatório}$$

O parâmetro z definido desta forma, portanto, é uma medida de se um laboratório cumpre ou não o critério externo, definido pelo organizador.

Em segundo lugar, como informação adicional para os laboratórios, também foi calculado o parâmetro zeta, definido a seguir:

$$zeta = \frac{(x_i - x_d)}{\sqrt{(u_i^2 + u_d^2)}} \quad (6.31)$$

onde x_i e x_d são os mesmos já definidos e,

u_i = incerteza informada pelos participantes.

u_d = incerteza do valor designado.

A incerteza do valor designado u_d é a incerteza do valor de referência declarada no certificado, quando disponível. Para os elementos sem valor de referência declarado, a incerteza foi a incerteza do valor de consenso calculada utilizando a Equação 6.29.

O parâmetro zeta permite avaliar se um resultado concorda com o valor designado tendo em conta as respectivas incertezas, ou dito de outra forma, tendo em conta um critério estabelecido pelo próprio laboratório. É uma ferramenta que permite aos laboratórios avaliar se a incerteza foi estimada de forma adequada.

Os limites para a avaliação do parâmetro zeta são os mesmos que para o parâmetro z .

$$|zeta| \leq 2 \text{ desempenho satisfatório}$$

$$2 < |zeta| < 3 \text{ desempenho questionável}$$

$$|zeta| \geq 3 \text{ desempenho insatisfatório}$$

No Apêndice J são apresentadas as tabelas com os valores dos parâmetros z e zeta estimados para cada participante. Na Figura 6.26 são apresentados os valores de z obtidos para alguns elementos selecionados.

Figura 6.26 – Valores de z obtidos para o MRC IPEN 001-Trace element in fish tissue, para alguns elementos selecionados

6.8.1.2 Avaliação dos resultados enviados para o candidato a material de referência IPEN RB1 Trace Elements in Bovine Kidney

6.8.1.2.1 Valor de consenso

Para estimar o valor de consenso do candidato a material de referência foi utilizado o método robusto da mediana – IQN, utilizando a mediana e a Equação 6.27 para o cálculo do desvio padrão. A incerteza do valor de consenso foi calculada segundo a Equação 6.29.

Foram excluídos do cálculo os resultados dos laboratórios que obtiveram valores de $z > 2$ na avaliação do MRC QC e os laboratórios que não declararam a rastreabilidade dos seus resultados, devido a que a rastreabilidade do valor de consenso

depende diretamente da rastreabilidade de cada um dos resultados envolvidos no cálculo. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 6.56.

Tabela 6.56 – Valores de consenso e desvio padrão calculados para o candidato a material de referência IPEN RB1 Trace Elements in Bovine Kidney utilizando o método robusto da mediana e IQN, com incertezas expandidas ($k=2$).

Elemento	Valor de consenso	Desvio padrão	p
	mg kg⁻¹	mg kg⁻¹	
As	0,26 ± 0,06	0,08	11
Cd	0,15 ± 0,01	0,02	10
Cl	9798 ± 657	455	3
Co	1,80 ± 0,17	0,23	12
Cr	nc	nc	3
Cu	17,6 ± 1,5	1,9	10
Fe	260 ± 13	21	16
Hg	0,034 ± 0,010	0,010	7
K	11612 ± 1013	1517	14
Mg	708 ± 51	67	11
Mn	5,40 ± 0,50	0,69	12
Na	8631 ± 322	446	12
Pb	nc	nc	6
Se	7,36 ± 0,54	0,74	12
Zn	95,8 ± 3,5	5,0	13

nc= não calculado; p = número de dados envolvidos nos cálculos

Para os elementos Cr e Pb não foi possível realizar a análise estatística devido a que os dados apresentados foram poucos e apresentaram dispersão muito elevada.

Na Figura 6.27 são apresentados, para alguns elementos selecionados, os valores informados pelos participantes junto com o valor de consenso e incerteza expandida. Os elementos restantes estão apresentados no Apêndice I. Na figura está representado o conjunto completo de resultados, incluindo os que não foram considerados no cálculo. Estes resultados foram representados na cor vermelha, para ser diferenciados dos que foram utilizados para estimar os valores de consenso e desvio, representados na cor azul.

Figura 6.27 – Valores obtidos pelos laboratórios no candidato a material de referência IPEN RB1 Trace Elements in Bovine Kidney, valor de consenso e incerteza expandida, para alguns elementos selecionados. Em vermelho, resultados não considerados no cálculo do valor de consenso e incerteza.

Para alguns dos analitos adicionais que foram informados pelos participantes também foi calculado um valor de consenso e de desvio, utilizando o método robusto da mediana e IQN. O cálculo foi realizado para os elementos que tinham pelo menos três resultados, determinados com diferentes técnicas. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 6.57.

Tabela 6.57 – Valores de consenso e desvio padrão calculados para alguns dos elementos adicionais informados pelos participantes no candidato a material de referência IPEN RB1 Trace Elements in Bovine Kidney, com incertezas expandidas ($k=2$).

Elemento	Valor de consenso	Desvio padrão	p
	mg kg⁻¹	mg kg⁻¹	
Br	15,2 ± 0,8	0,6	3
Ca	336 ± 31	22	3
Cs	0,189 ± 0,009	0,006	3
Hf	0,139 ± 0,004	0,003	3
Mo	1,80 ± 0,17	0,12	3
P	8968 ± 121	83	3
Rb	18,0 ± 0,9	0,8	5

No cálculo do elemento Ca foi descartado o resultado do laboratório 18 e no cálculo do elemento P foi descartado o resultado do laboratório 23, devido a que estes resultados eram muito discrepantes e ao fato de que estes dois laboratórios obtiveram resultados não satisfatórios na avaliação da maioria dos outros elementos determinados.

A finalidade de ter calculado os valores de consenso destes outros elementos foi a de oferecer uma informação adicional para o material.

6.8.1.2.2 Metodologias analíticas aplicadas na determinação do valor de consenso.

Na determinação do valor de consenso foram utilizados resultados obtidos por diversas técnicas analíticas. Para avaliar se existiam diferenças entre os resultados obtidos pelas diferentes técnicas foram representados graficamente os resultados obtidos por cada uma delas. Os gráficos para alguns elementos selecionados são apresentados na Figura 6.28. Os elementos restantes podem ser consultados no Apêndice K.

Figura 6.28 – Resultados utilizados para estimar o valor de consenso do candidato a material de referência IPEN RB1 Trace Elements in Bovine Kidney ordenados segundo a metodologia analítica utilizada pelos participantes, para elementos selecionados.

Das figuras pode ser observado que não existem evidências de diferenças entre as diferentes metodologias analíticas utilizadas pelos participantes.

6.8.1.2.3 Avaliação do desempenho dos laboratórios participantes

Como forma de brindar aos participantes outra ferramenta para a avaliação do seu desempenho foi realizada a avaliação utilizando os parâmetros z e $zeta$ já definidos anteriormente, calculados em base ao valor de consenso e desvio padrão do método robusto IQN para os elementos de interesse. No Apêndice J são apresentadas as tabelas com os valores dos parâmetros z e $zeta$ estimados para cada participante para cada elemento determinado no candidato a material de referência do rim bovino.

6.8.2 Cálculo de incertezas de certificação dos valores obtidos

A incerteza de cada um dos valores atribuídos no processo de certificação é estimada levando em consideração as incertezas de cada uma das etapas envolvidas no processo e pode ser calculada utilizando a Equação 6.32 (VAN DE VEEN, 2001c; ISO 2006).

$$u_{MRC} = \sqrt{u_{car}^2 + u_{bb}^2 + u_{lts}^2 + u_{sts}^2} \quad (6.32)$$

onde

u_{MRC} = incerteza padrão do valor certificado;

u_{car} = incerteza padrão obtida no processo de caracterização, ou comparação interlaboratorial neste trabalho;

u_{bb} = incerteza padrão devida a homogeneidade entre frascos;

u_{lts} = incerteza padrão devida a estabilidade de longo prazo;

u_{sts} = incerteza padrão devida a estabilidade de curto prazo.

Como já foi demonstrado no item 5.6, nas condições de transporte habituais do material de referência a estabilidade dos elementos está garantida e por tanto, a componente da incerteza devido a estabilidade de curto prazo foi desconsiderada. Na Tabela 6.58 são apresentadas as diferentes componentes da incerteza e a u_{MRC} calculada

para cada analito. Nos analitos para os quais não foram efetuados ensaios de homogeneidade e estabilidade porque foram informados pelos participantes em forma adicional, considerou-se uma incerteza de 1,5% para u_{bb} e de 6% para u_{lts} . Estes valores foram calculados aplicando a mediana aos resultados de u_{bb} (%) de todos os elementos em cada caso e são considerados representativos dos obtidos para o conjunto de dados.

Tabela 6.58 – Estimativa das incertezas padrão combinadas, em mg kg^{-1} , para os valores de concentração dos elementos analisados na comparação interlaboratorial de caracterização do candidato a material de referência IPEN RB1 Trace Elements in Bovine Kidney

Elemento	u_{bb}	u_{lts}	u_{car}	u_{MRC}
As	0,0022	0,0152	0,0301	0,034
Br	0,23	0,91	0,41	1,03
Ca	5,04	20,18	15,60	26,0
Cd	0,0095	0,0321	0,0071	0,034
Cl	186,2	823,0	328,4	906
Co	0,027	0,097	0,084	0,13
Cs	0,002835	0,01134	0,0043	0,012
Cu	0,123	0,809	0,760	1,11
Fe	2,86	12,76	6,61	14,7
Hf	0,0021	0,0083	0,0021	0,009
Hg	0,0031	nc	0,0049	nc
K	348,3	1474,7	506,7	1598
Mg	16,99	106,19	25,27	110,5
Mn	0,140	0,696	0,250	0,75
Mo	0,027	0,108	0,085	0,14
Na	69,0	353,9	161,0	395
P	134,5	538,1	60,3	558
Rb	0,27	1,08	0,44	1,20
Se	0,059	0,412	0,268	0,50
Zn	0,77	3,83	1,74	4,3

nc = não calculado

Para o elemento mercúrio, não foi calculada a incerteza do valor certificado devido a que se encontraram evidências de instabilidade do elemento no estudo de estabilidade de longo prazo.

Na Figura 6.29 são apresentadas as contribuições da cada uma das fontes de incerteza calculadas na incerteza padrão combinada u_{MRC} , para alguns elementos selecionados. As figuras para os elementos restantes são apresentadas no Apêndice L.

Figura 6.29 – Contribuição das fontes de incerteza das diferentes etapas da caracterização (u_{car} , u_{bb} e u_{lts}) na estimativa das incertezas padrão combinadas para os valores de concentração de elementos selecionados no candidato a material de referência.

Exceto para o elemento As, a componente da incerteza devida à estabilidade de longo prazo é a componente que mais peso tem no cálculo da incerteza padrão combinada, devido provavelmente a que esta fonte foi estimada tendo em conta um enfoque conservador o que forneceria valores superestimados.

6.8.3 Atribuição de valores aos elementos no candidato a material de referência de rim bovino

Os valores obtidos para os diferentes elementos que foram estudados na etapa de caracterização e certificação do candidato a material de referência podem ser classificados segundo diferentes critérios, baseados no grau de confiança do produtor do material em relação aos valores e incertezas obtidos.

O NIST, um dos maiores produtores de MRC do mundo, classifica aos valores atribuídos às propriedades em três categorias: valores certificados, valores de referência e valores informativos (MAY et al., 2000). Os valores certificados são os valores nos quais o NIST tem a maior confiança na sua exatidão e nos quais todas as possíveis causas de desvio foram completamente investigadas. Os valores de referência são valores que representam a melhor estimativa do valor verdadeiro, mas nos quais não foram investigadas todas as possíveis causas de desvio, motivo pelo qual a incerteza poderia não incluir todas as possíveis fontes. Finalmente os valores informativos são valores que podem resultar de utilidade para os usuários, mas para os quais não se tem suficiente informação para uma correta avaliação da incerteza. Esta classificação está baseada em que, no NIST, a maioria dos ensaios realizados para certificar os MRC são realizados pelo próprio NIST, com métodos primários ou métodos muito bem validados por eles mesmos.

Por outro lado, o esquema de certificação adotado pela União Europeia para seus MRC, baseia-se geralmente em resultados obtidos em comparações interlaboratoriais (STOEPPLE et al., 2001). Os valores obtidos são classificados como valores certificados e valores indicativos, e em alguns casos, podem ser informados valores como informação adicional. Os valores certificados são valores obtidos a partir de resultados de pelo menos 10 laboratórios e utilizando pelo menos duas metodologias diferentes. Os valores indicativos são os obtidos de menos de 10 laboratórios ou valores nos quais as incertezas não são adequadas ao uso pretendido do material. Finalmente a informação adicional são valores obtidos para os quais se dispõe de menos informação, e nos quais pode não ser informada a incerteza.

No presente trabalho optou-se por um enfoque similar ao da União Europeia. Foi realizada a classificação dos elementos baseada no conjunto de resultados obtidos nas etapas de caracterização e certificação, tendo em consideração as incertezas estimadas no item anterior. Na Tabela 6.59 figuram os critérios utilizados para a classificação de cada elemento, junto com a categoria designada para cada um deles.

Por último, resumindo toda a informação, nas Tabela 6.60 a 6.62 são apresentados os valores atribuídos aos elementos no material de referência de rim bovino IPEN RB1 Trace Elements in Bovine Kidney e suas incertezas expandidas associadas.

Tabela 6.59 – Classificação dos elementos no candidato a material de referência IPEN RB1 Trace Elements in Bovine Kidney, junto com os critérios considerados

Element	p	Métodos	Incerteza	Classificação
As	11	HG AAS, ICP-MS, INAA, TXRF	Adequada	Valor certificado
Br	3	INAA	Adequada	Valor indicativo
Ca	3	ICP OES, TXRF	Adequada	Valor indicativo
Cd	10	GF AAS, ICP-MS, ICP OES	Alta	Valor indicativo
Cl	3	INAA	Adequada	Valor indicativo
Co	12	ICP-MS, ICP OES, INAA	Adequada	Valor indicativo ^a
Cs	3	INAA	Adequada	Valor indicativo
Cu	10	ICP-MS, ICP OES, INAA, MP AES, TXRF	Adequada	Valor certificado
Fe	16	ICP-MS, ICP OES, INAA, MP AES, TXRF	Adequada	Valor certificado
Hf	3	INAA	Adequada	Valor indicativo
Hg	7	CV AAS, ICP-MS, TDA	-	Informação
K	14	AAS, ICP-MS, ICP OES, INAA, MP AES, TXRF	Adequada	Valor certificado
Mg	11	ICP-MS, ICP OES, INAA, MP AES	Adequada	Valor certificado
Mn	12	ICP-MS, ICP OES, INAA, MP AES, TXRF	Adequada	Valor certificado
Mo	3	ICP OES, INAA	Adequada	Valor indicativo
Na	12	ICP-MS, ICP OES, INAA, MP AES	Adequada	Valor certificado
P	3	ICP OES, TXRF	Adequada	Valor indicativo
Rb	5	ICP-MS, INAA, TX RF	Adequada	Valor indicativo
Se	12	HG AAS, ICP-MS, INAA, TXRF	Adequada	Valor certificado
Zn	13	F AAS, ICP-MS, ICP OES, INAA, TXRF	Adequada	Valor certificado

^a Apesar de sua incerteza ser adequada, a concentração do elemento Co foi classificada como valor indicativo por ter apresentado uma tendência em função do número do frasco no estudo de homogeneidade.

Tabela 6.60 – Valores certificados para a concentração, atribuídos aos elementos no material de referência de rim bovino IPEN RB1 Trace Elements in Bovine Kidney.

Elemento	Concentração^a, mg kg⁻¹
As	0,26 ± 0,07
Cu	17,6 ± 2,2
Fe	260 ± 29
K	11612 ± 3195
Mg	708 ± 221
Mn	5,4 ± 1,5
Na	8631 ± 790
Se	7,4 ± 1,0
Zn	95,8 ± 8,5

^a incertezas expandidas (k = 2) para um nível de confiança de 95%

Tabela 6.61 – Valores indicativos para a concentração, atribuídos aos elementos no material de referência de rim bovino IPEN RB1 Trace Elements in Bovine Kidney.

Elemento	Concentração^a, mg kg⁻¹
Br	15,2 ± 2,0
Ca	336 ± 52
Cd	0,15 ± 0,07
Cl	9798 ± 1811
Co	1,80 ± 0,26
Cs	0,189 ± 0,025
Hf	0,139 ± 0,018
Mo	1,80 ± 0,28
P	8968 ± 1116
Rb	18,0 ± 2,4

^a incertezas expandidas (k = 2) para um nível de confiança de 95%

Tabela 6.62 – Informação adicional para a concentração do elemento Hg no material de referência de rim bovino IPEN RB1 Trace Elements in Bovine Kidney.

Elemento	Concentração, mg kg⁻¹
Hg	0,034

6.8.4 Rastreabilidade dos valores atribuídos aos elementos no candidato a material de referência de rim bovino

Os resultados estão expressos em mg kg⁻¹, unidade derivada do sistema internacional de unidades (SI). A rastreabilidade dos valores atribuídos aos elementos depende diretamente da rastreabilidade de cada um dos valores utilizados no cálculo. Por este motivo, para estimar os valores de consenso só foram considerados os laboratórios que fizeram uma adequada declaração da rastreabilidade dos seus resultados. Esta declaração devia incluir o uso de soluções padrão certificadas para a calibração dos equipamentos utilizados para realizar as determinações, o uso de materiais de referência certificados como controle de qualidade e seguir as diretrizes de algum sistema de gestão de qualidade no laboratório. Não foi requerido ter o sistema acreditado, porém alguns dos laboratórios informaram estar acreditados pela norma ISO 17025 (ISO, 2005) para alguns dos elementos, tanto para matrizes de origem cárnea como para outras matrizes.

Do exposto, pode-se considerar que os valores atribuídos às propriedades são rastreáveis ao SI.

7 CONCLUSÕES

No presente trabalho foram desenvolvidas todas as etapas necessárias para a preparação, caracterização e certificação de um material de referência segundo os requisitos aceitos internacionalmente.

Na etapa de preparação, conseguiu-se obter um material homogêneo, com tamanho de partícula e teor de umidade adequados. O material foi esterilizado exitosamente por radiação gama, verificando-se uma carga microbiológica tal que não comprometerá a estabilidade do material.

Foi estudada a homogeneidade do material tanto dentro quanto entre os diversos frascos preparados. A avaliação da homogeneidade entre as diferentes unidades do material foi satisfatória para todos os elementos estudados e os valores obtidos para a componente da incerteza devida à homogeneidade foram baixos e não afetaram significativamente a incerteza final do material. Também foi investigada a quantidade mínima do material para a qual os valores de incerteza permanecem dentro de um valor aceitável. A quantidade mínima obtida resultou diferente para os diferentes analitos, pelo que dependerá do uso pretendido do MR e do elemento a ser determinado. Os resultados obtidos estiveram entre 2 mg e 40 mg, mostrando que, para a maioria dos elementos estudados, o MR será útil para técnicas microanalíticas.

Foi testada a estabilidade do material em diferentes temperaturas e tempos, simulando as condições as quais o material poderia estar normalmente exposto. O estudo de estabilidade de curto prazo mostrou que o MR pode ser transportado sob condições normais de transporte. No estudo de estabilidade de longo prazo, os resultados obtidos foram satisfatórios para todos os elementos estudados, exceto para o Hg, pelo que não foi possível a certificação deste elemento.

Os estudos de homogeneidade e estabilidade foram realizados utilizando três técnicas analíticas diferentes para poder abarcar todos os elementos de interesse.

Para a avaliação dos estudos de homogeneidade e estabilidade foram utilizadas, além das técnicas estatísticas univariadas clássicas como os testes de ANOVA e regressão,

técnicas de análise multivariada como análise de componentes principais (PCA) e análise de agrupamento hierárquico (HCA). A utilização destas técnicas para este tipo de estudos não está muito difundida, mas demonstraram serem ferramentas úteis nestes casos, pois simplificam a representação gráfica e a visualização do conjunto de dados.

Os resultados satisfatórios nos estudos de homogeneidade e estabilidade demonstraram que o candidato a material de referência era apto para ser certificado e, portanto, foi enviado a diferentes laboratórios nacionais e internacionais para sua certificação. Foi realizada uma convocação ampla e 30 laboratórios confirmaram sua participação. Da avaliação estatística dos resultados enviados pelos participantes foi possível estabelecer valores de consenso para os analitos de interesse e outros enviados adicionalmente pelos participantes.

Da avaliação conjunta dos resultados da comparação interlaboratorial e dos estudos de homogeneidade e estabilidade realizados conseguiu-se atribuir valores a 20 elementos com suas respectivas incertezas, sendo 9 valores certificados, 10 valores indicativos e 1 como informação adicional.

Apesar de não ter sido possível atribuir valores certificados a elementos de interesse como Cd, Hg e Pb, foi possível certificar elementos como As, Zn e outros de importância nutricional e toxicológica.

Futuros trabalhos no MR poderiam atribuir valores certificados a estes elementos devido à sua grande importância como contaminantes alimentares. Por outro lado, futuros desenvolvimentos também poderiam incluir a certificação de alguns compostos orgânicos de interesse nutricional como colesterol e proteínas.

A capacitação e a experiência adquirida no processo de preparo e certificação do MR de rim bovino é um passo importante no desenvolvimento metrológico nacional. Por outro lado, o material preparado, que já foi distribuído aos principais laboratórios de análises do setor, poderá ser utilizado para garantir a qualidade das medições feitas no Brasil nos alimentos de origem carne, tanto do ponto de vista do aspecto nutricional quanto da inocuidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEGRÍA, A.; R. BARBERÁ, R.; LAGARDA, M. J.; FARRÉ, R. Minerals and Trace elements. Em: NOLLET, L.M.L.; TOLDRÁ, F. (Ed) **Handbook of muscle foods analysis**. Boca Ratón, FL: CRC, 2009, p.441 – 463.

ANVISA, AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA. BRASIL. Resolução - RDC Nº 12, 2001. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b>. Acesso em: 10 ago. 2017.

ANVISA, AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA. BRASIL. Resolução - RDC Nº 42, 2013. **Regulamento Técnico sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/393845/RDC%2Bn%C2%BA%2B42_2013_final.pdf/eec629cf-8d17-422b-a362-366b275c1a00?version=1.0>. Acesso em: 12 jun. 2017.

ANVISA, AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA. BRASIL. **Legislação específica para a rotulagem de alimentos**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/legis/especifica/rotuali.htm>>. Acesso em: 06 jul. 2016.

ANMAT, ADMINISTRACION NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGIA MEDICA. ARGENTINA. **Boletín para consumidores** n.29-30, 2006. Disponível em: <http://www.anmat.gov.ar/webanmat/Publicaciones_boletinesConsumidores_06.asp>. Acesso em: 09 jul. 2015.

ANMAT, ADMINISTRACION NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGIA MEDICA. ARGENTINA. **Resolución Conjunta** Nº 116/12 y 356/12, 2012. Disponível em: <http://www.anmat.gov.ar/webanmat/normativas_alimentos_cuerpo.asp>. Acesso em: 07 jul. 2017.

BARDACH, A. E.; CIAPPONI, A.; SOTO, N.; CHAPARRO, M. R.; CALDERON, M.; BRIATORE, A.; CADOPPI, N.; TASSARA, R.; LITTER, M. I. Epidemiology of chronic disease related to arsenic in Argentina: A systematic review. **Science of the Total Environment** v.538, p. 802–816, 2015.

BERLIN, M.; ZALUPS, R. K.; FOWLER, B. A. Mercury. Em: NORDBERG, G. F.; FOWLER, B.A.; NORDBERG, M.; FRIBERG, L. T. (Ed) **Handbook on the Toxicology of Metals**, 3ed, Amsterdam: Elsevier, 2007, p.675-729.

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

BIPM, BUREAU INTERNATIONAL DES POIDS ET MESURES. **The International System of Units (SI)**. 8th ed. Paris, 2006. Disponível em: <<http://www.bipm.org/en/publications/si-brochure/>>. Acesso em: 26 mai. 2017.

BIPM, BUREAU INTERNATIONAL DES POIDS ET MESURES. **International equivalence of measurements: the CIPM MRA**. International comparisons. Disponível em: <<http://www.bipm.org/en/cipm-mra/>>. Acesso em: 07 set. 2017.

CARIONI, V. M. O.; CHELEGÃO, R.; NAOZUKA, J.; NOMURA, C. S. Feasibility study for the preparation of a tuna fish candidate reference material for total As determination. **Accreditation and Quality Assurance**, v.16, p.453-458, 2011.

CARIONI, V. M. O.; NOMURA, C. S., YU, L. L., ZEISLER, R. Use of neutron activation analysis and LC-ICP-MS in the development of candidate reference materials for As species determination. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v.299, p.241-248, 2014.

CARVALHO ROCHA, W.F.; NOGUEIRA, R. Use of multivariate statistical analysis to evaluate experimental results for certification of two pharmaceutical reference materials. **Accreditation and Quality Assurance**, v.16, p.523-528, 2011.

CARVALHO ROCHA, W.F.; NOGUEIRA, R.; DA SILVA, G. E. B.; QUEIROZ, S., M.; SARMANHO, G. F. A comparison of three procedures for robust PCA of experimental results of the homogeneity test of a new sodium diclofenac candidate certified reference material. **Microchemical Journal**, v.109, p.112-116, 2013.

CASTRO, L.; MOREIRA E.G.; VASCONCELLOS, M.B.A. Use of INAA in the homogeneity evaluation of a bovine kidney candidate reference material. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v.311, p.1291-1298, 2017.

CCQM, Comité Consultatif pour la Quantité de Matière. Report of the 13th meeting of the CCQM to the International Committee for Weights and Measures. Paris, BIPM, 2007. Disponível em: <http://www.bipm.org/en/committees/cc/ccqm/publications_cc.html>. Acesso em: 12 jun. 2013.

CETEM, Centro de Tecnologia Mineral. **Programa Material de Referência Certificado**. Disponível em: <<http://www.cetem.gov.br/mrc/>>. Acesso em: 29 mai. 2017.

COLLINS, J. F. Copper: Basic Physiological and Nutritional Aspects. In: Collins, J. F, (Ed). **Molecular, Genetic, and Nutritional Aspects of Major and Trace Minerals**. Amsterdam, Elsevier, 2017, p.69-83.

COMAR, **The international database for certified reference materials**. Disponível em: <<http://www.comar.bam.de>>. Acesso em: 20 mar. 2017.

CURRIE, L. A. Detection and quantification limits: origins and historical overview. **Analytica Chimica Acta**, v. 391, p.127-134, 1999.

DE BIEVRE, P.; DYBKAER, R.; FAJGELJ, A.; HIBBERT, D. B. Metrological traceability of measurement results in chemistry: Concepts and implementation (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v.83, n.10, p.1873–1935, 2011.

DONADIO, J. L. S.; MARTENS, I. B. G.; MARTENS, A.; COZZOLINO, S. M. F. Selênio. Em: COZZOLINO, S. M. F. (Org). **Biodisponibilidade de nutrientes**, 5. ed., Barueri, SP: Manole, 2016, p. 761-821.

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

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

DOS SANTOS, A. M. P.; DOS SANTOS, L. O.; BRANDAO, G. C.; ARAUJO, R. G. O.; DE SANTANA, F. A.; LEMOS, V. A.; BEZERRA, M. A.; ANUNCIAÇÃO, D. S.; PORTUGAL, L. A.; PALACIOS, E.; DE OLIVEIRA, F. M.; MOREIRA, E. G.; GARCIA, R. J. L.; LIMA, D. C.; FROES, R. E. S. Preparation and characterization of a new reference material for the inorganic analysis of corn flour. **Accreditation and Quality Assurance**, v.22, p.37-43, 2017.

DOS SANTOS, S. S. N. S. C. **Caracterização química de leite em pó para produção de material de referência certificado** (2016) p. 81. Dissertação (Mestrado em Química na Agricultura e no Ambiente). Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba. Disponível em:
<<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/64/64135/tde-19052017-084639/pt-br.php>>. Acesso em: 07 set. 2017.

EC, EUROPEAN COMMUNITY. Commission Regulation 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of European Union**, v. 364, p.5–24, 2006.

ELLISON, S.L.R.; BARWICK, V.J.; FARRANT, T.J.D. **Practical Statistics for the Analytical Scientist**. A Bench Guide. 2nd ed. Cambridge, Engl.: RSC Publishing, 2009.

ELLISON, S.L.R.; KING, B.; RÖSSLEIN, M.; SALIT, M.; WILLIAMS, A. (Ed). **EURACHEM/CITAC Guide: Traceability in Chemical Measurement** - A guide to achieving comparable results in chemical measurement, 2003. Disponível em:
<<http://www.eurachem.org>>. Acesso em: 20 mar. 2017.

ELLISON, S.L.R.; WILLIAMS, A. (Ed). **EURACHEM/CITAC Guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement**, 2012. Disponível em:
<<http://www.eurachem.org>>. Acesso em: 20 mar. 2017.

EMBRAPA, EMPRESA BRASILEIRA DE INVESTIGAÇÃO AGROPECUÁRIA. **Materiais de referência**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-produtos-processos-e-servicos/-/produto-servico/1263/materiais-de-referencia>>. Acesso em: 06 jun. 2017a.

EMBRAPA, EMPRESA BRASILEIRA DE INVESTIGAÇÃO AGROPECUÁRIA. **Quem somos**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/quem-somos>>. Acesso em: 04 ago. 2017b.

EUROLAB, EUROPEAN FEDERATION OF NATIONAL ASSOCIATIONS OF MEASUREMENT, TESTING AND ANALYTICAL LABORATORIES. **Guide to the Evaluation of Measurement Uncertainty for Quantitative Test Results**. Technical Report No. 1/2006, Paris, 2006. Disponível em: <http://www.eurolab.org/publications.aspx> Acesso em: 5 out. 2017.

EUROLAB, EUROPEAN FEDERATION OF NATIONAL ASSOCIATIONS OF MEASUREMENT, TESTING AND ANALYTICAL LABORATORIES. **Measurement uncertainty revisited: Alternative approaches to uncertainty evaluation**. Technical Report No. 1/2007, Paris, 2007. Disponível em: <http://www.eurolab.org/publications.aspx> Acesso em: 5 out. 2017.

FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The State of Food and Agriculture**. Food Systems for Better Nutrition. Roma, 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/publications/sofa/en/>>. Acesso em: 9 jul. 2015.

FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Current Worldwide Annual Meat Consumption per capita**, Livestock and Fish Primary Equivalent. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/610/DesktopDefault.aspx?PageID=610#ancor>>. Acesso em: 20 mar. 2017.

FAO/WHO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Codex alimentarius comission. Discussion paper on Cadmium**. 31 Session Codex Committee on Food Additives and Contaminants. Haia, 1999. (CX/FAC 99/21). Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/CCFAC/CCFAC31/fa99_21e.pdf>. Acesso em: 12 jun. 2017

FAO/WHO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Codex alimentarius comission. General standard for contaminants and toxins in food and feed**. Codex Stan 193-1995. Revisada 2016. Disponível em: <<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/list-standards/en/>>. Acesso em: 05 jun. 2017

FAJGELJ, A.; ZEISLER, R. Particle size determination of some IAEA and NIST environmental and biological reference materials. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v.360, p.442-445, 1998.

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

FARKAS, J. Radiation decontamination of dry food ingredients and processing aids. **Journal of Food Engineering**, v.3, p.245-264, 1984.

FARKAS, J. Microbiological safety of irradiated foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.9 p.1-15, 1989.

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

FARKAS, J. Irradiation for better foods. **Trends in Food Science and Technology**, v.17, p.148–152, 2006.

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

FIELD, A. **Postgraduate Statistics: Cluster Analysis**. 2000. Disponível em: <<http://www.discoveringstatistics.com/docs/cluster.pdf>>. Acesso em: 15 set. 2017

FIELD, A. **Discovering statistics using IBM SPSS Statistics**. 3th ed., London: Sage, 2009.

FILBY, R. H. Isotopic and nuclear analytical techniques in biological systems: a critical study. Part IX: Neutron activation analysis. IUPAC Technical Report. **Pure and Applied Chemistry**, v. 67, n.11, p. 1929- 1941, 1995.

GUADALUPE GARCÍA-LLATAS, G.; ALEGRÍA, A.; BARBERÁ, R.; FARRÉ, R. Minerals and Trace Elements. Em: NOLLET, L. M. L.; TOLDRÁ, F. (Ed) **Handbook of analysis of edible animal by-products**. Boca Ratón, FL: CRC, 2011, p.183-203.

GREENBERG, R. R.; FLEMING, R. F.; ZEISLER, R. High sensitivity neutron activation analysis of environmental and biological standard reference materials. **Environment International**, n. 10, p. 129-136, 1984.

GREENBERG, R. R. Pushing the limits of NAA: Accuracy, uncertainty and detection limits. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v.278, p.231–240, 2008.

GREENBERG, R. R.; BODE, P.; FERNANDES, E. A. N. Neutron activation analysis: A primary method of measurement. **Spectrochimica Acta B** v.66, p.193–241, 2011.

HAMIDATOU, L.; SLAMENE, H.; AKHAL, T.; ZOURANEN, B. Concepts, Instrumentation and Techniques of Neutron Activation Analysis. Em: KHARFI, F. (Ed) **Imaging and radioanalytical techniques in interdisciplinary research** - Fundamentals and cutting edge applications. InTech, 2013. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/imaging-and-radioanalytical-techniques-in-interdisciplinary-research-fundamentals-and-cutting-edge-applications>>. Acesso em: 12 set. 2017

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica** v.4(1), p.9, 2001. Disponível em: <<https://folk.uio.no/ohammer/past>>. Acesso em: 15 ago. 2017

HARRIS, E. D. **Minerals in food**. Nutrition, metabolism, bioactivity. Lancaster, PA: DEStech Publications Inc., 2014.

HIBBERT, D. B. **Quality assurance in the analytical chemistry laboratory**. New York, NY: Oxford University Press, 2007.

HONIKEL K. O. Composition and calories. Em: NOLLET, L. M. L. (Ed) **Handbook of muscle foods analysis**. Boca Ratón, FL: CRC, 2009.

HÖGBERG, J.; ALEXANDER, J. Selenium. Em: NORDBERG, G. F.; FOWLER, B.A.; NORDBERG, M.; FRIBERG, L. T. (Ed) **Handbook on the Toxicology of Metals**, 3rd Ed., Amsterdam: Elsevier, 2007, p. 783-807.

HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. IUPAC Technical Report. **Pure and Applied Chemistry**, v.67, n.2, p.331- 343, 1995.

HORWITZ, W.; ALBERT, R. The Horwitz ratio (HorRat): a usefull index of method performance with respect to precision. **Journal of AOAC International**, v. 89, n.4, p. 1095-1109, 2006.

IAEA, INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Regional co-operation agreement for the promotion of nuclear science and technology in latin america and the caribbean. Contribution to sustainable development 1984–2009**. Vienna, 2010. Disponível em: <https://www.iaea.org/technicalcooperation/documents/Brochures/Sus-dev-1984-2009_eng.pdf>. Acesso em: 8 set. 2017.

IAEA, INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Certification of trace elements and methyl mercury mass fractions in IAEA-470 oyster sample. IAEA/AQ/47.** Vienna, 2016.

IAEA, INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, **Nuclear Data Section. Livechart – Table of Nuclides.** Disponível em: < <https://www-nds.iaea.org/relnsd/vcharthtml/VChartHTML.html> >. Acesso em: 5 ago. 2017.

IBGE, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. **Indicadores IBGE.** Estatística da Produção Pecuária. Março 2017. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Fasciculo_Indicadores_IBGE/abate-leite-couro-ovos_201604caderno.pdf>. Acesso em: 9 abr. 2017.

IHNAT, M., CLOUTIER, R., WOOD, D. Reference materials for agricultural and food analysis: preparation and physical characterization of a bovine muscle powder candidate reference material. **Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie**, v. 326, p. 627-633, 1987.

IHNAT, M. Characterization (certification) of bovine muscle powder (NIST RM 8414), whole egg powder (NIST RM 8415) and whole milk powder (NIST RM 8435) reference materials for essential and toxic major, minor and trace element constituents. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 348, p. 459-467, 1994

IHNAT, M. A synopsis of different approaches to the certification of reference materials **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v.360, p. 308–311, 1998.

IHNAT, M. Biological reference materials for quality control of elemental composition analytical data. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v.245, p.65-72, 2000.

INDEC, INSTITUTO NACIONAL DE ESTADISTICAS Y CENSOS. ARGENTINA. Disponível em: <http://www.indec.gob.ar/nivel4_default.asp?id_tema_1=3&id_tema_2=8&id_tema_3=89>. Acesso em: 05/06/2017

INGAMELLS, C. O.; SWITZER, P. Proposed sampling constant for use in geochemical analysis. **Talanta** v.20, n.6, p. 547-568, 1973.

INMETRO, INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **Serviço de Certificação de Material de Referência.** Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/metcientifica/mat_ref_cert.asp>. Acesso em: 29 mai. 2017.

IPT, INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS. **Fornecimento e desenvolvimento de materiais de referência.** Disponível em: <http://www.ipt.br/solucoes/54-fornecimento_e_desenvolvimento_de_materiais_de_referencia.htm> Acesso em: 29 mai. 2017.

IRMM, INSTITUTE FOR REFERENCE MATERIALS AND MEASUREMENT, **Certificate of analysis**, ERM-BB 384, Lyophilized pork muscle, 2009.

IRMM, INSTITUTE FOR REFERENCE MATERIALS AND MEASUREMENT, **Certificate of analysis**, ERM-BB 184, Bovine muscle, 2012a

IRMM, INSTITUTE FOR REFERENCE MATERIALS AND MEASUREMENT, **Certificate of analysis**, ERM-BB 186, Pig Kidney, 2012b

IRMM, INSTITUTE FOR REFERENCE MATERIALS AND MEASUREMENT, **Certificate of analysis**, BCR-463, Tuna Fish, 2013.

ISO, INTERNATIONAL ORGANIZATION OF STANTARDIZATION. **Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results** – Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method. Geneva, 1994 (ISO 5725-2).

ISO, INTERNATIONAL ORGANIZATION OF STANTARDIZATION. **Particle Size Analysis** – Laser Diffraction Methods - Part 1: General Principles. Geneva, 1999 (ISO/FDIS 13320-1).

ISO, INTERNATIONAL ORGANIZATION OF STANTARDIZATION. **General requirements for the competence of testing and calibration laboratories**. 2 ed. Geneva, 2005 (ISO/IEC 17025).

ISO, INTERNATIONAL ORGANIZATION OF STANTARDIZATION. **Certification of reference materials** – General and statistical principles. 3 ed. Geneva, 2006 (ISO Guide 35).

ISO, INTERNATIONAL ORGANIZATION OF STANTARDIZATION. **Water quality** – Interlaboratory comparisons for proficiency testing of analytical chemistry laboratories. 1 ed. Geneva, 2007 (ISO/TS 20612).

ISO, INTERNATIONAL ORGANIZATION OF STANTARDIZATION. **Conformity assessment** - General requirements for proficiency testing. 1 ed. Geneva, 2010 (ISO 17043).

ISO, INTERNATIONAL ORGANIZATION OF STANTARDIZATION. **Reference materials** – Good practice in using reference materials. 3 ed. Geneva, 2015a (ISO Guide 33).

ISO, INTERNATIONAL ORGANIZATION OF STANTARDIZATION. **Reference materials** - Selected terms and definitions. 3 ed. Geneva, 2015b (ISO Guide 30).

ISO, INTERNATIONAL ORGANIZATION OF STANTARDIZATION. **Reference materials** - Contents of certificates and labels. 3 ed. Geneva, 2015c (ISO Guide 31).

ISO, INTERNATIONAL ORGANIZATION OF STANTARDIZATION. **Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons**. 2 ed. Geneva, 2015d (ISO 13528).

ISO, INTERNATIONAL ORGANIZATION OF STANTARDIZATION. **General requirements for the competence of reference material producers**. 1 ed. Geneva, 2016 (ISO 17034).

JCGM, JOINT COMMITTEE FOR GUIDES IN METROLOGY. **Evaluation of measurement data** – Guide to the expression of uncertainty in measurement. 1ed., Paris, BIPM, 2008. (JCGM 100:2008)

JCGM, JOINT COMMITTEE FOR GUIDES IN METROLOGY. **International vocabulary of metrology** – Basic and general concepts and associated terms (VIM). 3ed., Paris, BIPM, 2012. (JCGM 200:2012)

JOLLIFFE, I.T. **Principal Component Analysis**. 2ed. New York, NY: Springer, 2002.

KAARLS, R. Metrology, essential to trade, industry and society. **Accreditation and Quality Assurance**, v.12, p.435-437, 2007.

KATO, L. S. **Caracterização química de feijão (*phaseolus vulgares* L.) para produção de material de referência de certificado** (2014) p. 88. Dissertação (Mestrado em Química na Agricultura e no Ambiente). Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba. Disponível em:

<<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/64/64135/tde-26012015-151312/pt-br.php>>.

Acesso em: 07 set. 2017.

KATO, L. S.; FERNANDES, E. A. N.; BACCHI, M. A.; ELIAS, C.; SARRIÉS, S. R. V.; SARRIÉS, G. A.; MODOLO, P. S. Instrumental neutron activation analysis for assessing homogeneity of a whole rice candidate reference material. **Journal of radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 297, p. 271-275, 2013.

KOCH, M. **Software A45**. AQS Baden-Württemberg, Institute for Sanitary Engineering, Universität Stuttgart, 2011. Disponível em: <http://www.iswa.uni-stuttgart.de/ch/aqs/download/a45.en.html>>. Acesso em: 07 set. 2017.

KOGLIN, D.; BACKHAUS, F.; SCHLADOT, J. D. Particle size distribution in ground biological samples. **Chemosphere**, v.34, p.2041-2047, 1997.

KRAMER, G. N.; GROBECKER, K. H.; PAUWEL, J. Comparison of methods used for the preparation of biological CRMs. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v.352, p.125-130, 1995.

KUČERA, J.; MADER, P.; MIHOLOVA, D.; CIBULKA, J.; FALTEJSEK, J.; KORDIK, D. Preparation of the Bovine Kidney and Bovine Muscle reference materials and the certification of element contents from interlaboratory comparisons. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v.352, p.66-72, 1995.

KUČERA, J.; BODE, P.; STEPANEK, V. Uncertainty evaluation in instrumental and radio-chemical neutron activation analysis. Em: **Quantifying Uncertainty in Nuclear Analytical Measurements**, TECDOC-1401, IAEA, Vienna, 2004, p.77-95.

KURFURST, U.; PAUWELS, J.; GROBECKER, K. H.; STOEPPLE, M.; MUNTAU, H. Micro-heterogeneity of trace elements in reference materials - Determination and statistical evaluation. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry** v.345, p.112-120, 1993.

LAMBERTY, A.; SCHIMMEL, H.; PAUWELS, J. The study of the stability of reference materials by isochronous measurements. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 360, p.359-361, 1998.

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

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

LINSINGER, T. P. J.; PAUWELS, J.; LAMBERTY, A.; SCHIMMEL, H.; VAN DER VEEN, A. M. H.; SIEKMANN, L. Estimating the uncertainty of stability for matrix CRMs. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v.370, p.183-188, 2001b.

LINSINGER, T. P. J.; VAN DER VEEN, A. M. H.; GAWLIK, B., M.; PAUWELS, J.; LAMBERTY, A. Planning and combining of isochronous stability studies of CRMs. **Accreditation and Quality Assurance**, v.9, p.464-472, 2004.

LINSINGER, T. **Comparison of a measurement result with the certified value.** European Commission - Joint Research Centre Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM). Application note 1, Rev. 3, 2010. Disponível em: <http://www.erm-crm.org/ERM_products/application_notes/application_note_1/Documents/erm_application_note_1_english_rev3.pdf>. Acesso em: 08 set. 2017.

LISON, D. Cobalt. Em: NORDBERG, G. F.; FOWLER, B.A.; NORDBERG, M.; FRIBERG, L. T. (Ed) **Handbook on the Toxicology of Metals**, 3ed, Amsterdam: Elsevier, 2007, p.511-528.

LUPTON, J. R.; CROSS, H. R. The contributions of meat, poultry and fish to the health and well being of man. Em: PEARSON, A. M.; DUTSON, T. R. (Eds.) **Quality attributes and their measurement in meat, poultry, and fish products**. Advances in meat research series, vol. 9, Glasgow: Blackie Academic and Professional, 1994, p. 479-499.

MAFRA, D.; COZZOLINO, S. M. F. Magnésio. Em: COZZOLINO, S. M. F. (Org). **Biodisponibilidade de nutrientes**, 5. ed., Barueri, SP: Manole, 2016, p. 657-672.

MAGNUSSON, B.; NÄYKKI, T.; HOVIND, H.; KRYSELL, M. (Ed). **Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories**. Nordtest Technical Report 537, 3ed, 2012. Disponível em: <<http://www.nordtest.info/index.php/technical-reports.html> >. Acesso em: 5 out. 2017.

MAGNUSSON, B.; ÖRNEMARK, U. (Ed). **Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods** - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 2nd ed., 2014. Disponível em: <<http://www.eurachem.org>>. Acesso em: 20 mar. 2017.

MAIHARA, V. A.; FAVARO D. I. T.; VASCONCELLOS, M. B. A.; SATO, I. M.; SALVADOR, V. L. R.; MANTONVANI, D. M. B.; MORGANO, M. A.; MAIO, F. D.; CANTAGALLO, M. I.; SISTI, C.; DANTAS, E. S. K.; SHIHOMATSU, H. M. Estudo interlaboratorial: material de referência secundário fígado bovino. Em: CONGRESSO BRASILEIRO DE METROLOGIA, 3º, 01-05 set. 2003. **Anais...**Recife: SBM, CD-ROM, 2003.

MAPA, MINISTERIO DA AGRICULTURA, PECUARIA E ABASTECIMENTO. BRASIL. **Exportação**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/exportacao>>. Acesso em: 10 abr. 2017.

MARTINEZ, M. I. V.; FERNANDES, E. A. N.; BACCHI, M. A.; GONZAGA, C. L.; SARRIES, S. R. V.; ELIAS, C.; SARRIÉS, G. A. Development of a candidate reference material of tomato leaves with emphasis on As, Cd, Hg and Pb. Em: 13th International Symposium on Biological and Environmental Reference Materials, BERM13, 25-29 jun. 2012, Vienna.

MATOS, E.; BRANDANI, A. Review on meat consumption and cancer in South America. **Mutation Research**, v.506–507, p. 243–249, 2002.

MAY, W.; PARRIS, R.; BECK, C.; FASSETT, J.; GREENBERG R.; GUENTHER, F.; KRAMER, G.; WISE, S.; GILLS, T.; COLBERT, J.; GETTINGS, R.; MACDONALD, B. **Definitions of terms and modes used at NIST for value-assignment of reference materials for chemical measurements**. Gaithersburg, MD, 2000. (NIST Special Publication 260-136).

MEASUREMENT SCIENCE CONFERENCE, MSC. **History of metrology**. Disponível em: <<http://www.msc-conf.com/history-of-metrology/>>. Acesso em: 15 jun. 2017.

MERCOSUR. **Reglamento Técnico MERCOSUR para rotulación de alimentos envasados**. MERCOSUR/GMC/RES. N° 26/03. 2003. Disponível em: <<https://gestorweb.mercosur.int/?pag=n&tab=1>>. Acesso em: 05 jun. 2017.

MERCOSUR. Reglamento Técnico MERCOSUR sobre información nutricional complementaria (Declaraciones de propiedades nutricionales). MERCOSUR/GMC/RES. N° 01/12. 2012. Disponível em: <<https://gestorweb.mercosur.int/?pag=n&tab=1>>. Acesso em: 05 jun. 2017.

MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. 6th ed. Harlow, Eng: Pearson, 2010.

MOLINS, R. A.; MOTARJEMI, Y.; KAFERSTEIN, F. K. Irradiation: a critical control point in ensuring the microbiological safety of raw foods. **Food Control**, v.12, p. 347-356, 2001.

MOREIRA, E. G.; VASCONCELLOS, M. B. A.; SAIKI, M. Uncertainty assessment in instrumental neutron activation analysis of biological materials. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v.269, p.377-382, 2006.

MOREIRA, E. G.; VASCONCELLOS, M. B. A.; CATHARINO, M. G. M.; MAIHARA, V. A.; SAIKI, M. Perna perna mussel reference material: short term stability assessment. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v.282, p. 957-962, 2009

MOREIRA, E. G. **Preparo e caracterização de um material de referência de Mexilhão Perna perna (Linnaeus, 1758)**. (2010a) 283 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85131/tde-21062011-093245/pt-br.php>>. Acesso em: 14 fev. 2013.

MOREIRA, E. G.; VASCONCELLOS, M. B. A.; CATHARINO, M. G. M.; MAIHARA, V. A.; SAIKI, M. Application of INAA complementary gamma ray photopeaks to the homogeneity study of a mussel candidate reference material. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v.283, n. 3, p. 819-822, 2010b.

MOREIRA, E. G.; VASCONCELLOS, M. B. A.; CATHARINO, M. G. M.; MAIHARA, V. A.; SAIKI, M. Long term stability on a Perna perna mussel candidate reference material. **Accreditation and Quality Assurance**, v.14, n. 4, p. 233-238, 2010c.

NIST, NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS & TECHNOLOGY, **Certificate of analysis**, SRM 1577b, Bovine liver, 1991. Disponível em: <<https://www-s.nist.gov/srmors/index.cfm>>. Acesso em: 22 jul. 2013.

NIST, NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS & TECHNOLOGY, **Certificate of analysis**, SRM 1546, Meat homogenate, 2008. Disponível em: <<https://www-s.nist.gov/srmors/index.cfm>>. Acesso em: 22 jul. 2013.

NIST, NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS & TECHNOLOGY, **Certificate of analysis**, SRM 1577c, Bovine liver, 2009. Disponível em: <<https://www-s.nist.gov/srmors/index.cfm>>. Acesso em: 22 jul. 2013.

NIST, NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS & TECHNOLOGY, **Certificate of analysis**, SRM 1566b, Oyster tissue, 2015. Disponível em: <<https://www-s.nist.gov/srmors/index.cfm>>. Acesso em: 07 jun. 2017.

NIST, NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS & TECHNOLOGY, **Certificate of analysis**, SRM 2976, Trace Elements and Methylmercury in Mussel Tissue (Freeze-Dried), 2017. Disponível em: <<https://www-s.nist.gov/srmors/index.cfm>>. Acesso em: 07 jun. 2017.

NORDBERG, G. F.; NOGAWA, K.; NORDBERG, M.; FRIBERG, L. T. Cadmium. In: NORDBERG, G. F.; FOWLER, B.A.; NORDBERG, M.; FRIBERG, L. T. (Ed) **Handbook on the Toxicology of Metals**, 3ed, Amsterdam: Elsevier, 2007, p.445-486.

NRIAGU, J.; BOUGHANEN, M.; LINDER, A.; HOWE, A.; GRANT, C.; RATTRAY, R.; VUTCHKOV, M.; LALOR, G. Levels of As, Cd, Pb, Cu, Se and Zn in bovine kidneys and livers in Jamaica. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p. 564-571, 2009.

NOLLET, L. M. L; TOLDRÁ, F. Introduction - Offal Meat: Definitions, Regions, Cultures, and Generalities. Em: NOLLET, L.M.L.; TOLDRÁ, F. (Ed) **Handbook of analysis of edible animal by-products**. Boca Ratón, FL: CRC, 2011.

NRC, NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA, **Certificate of analysis**, RM-8414, Bovine muscle powder, 1993.

NRC, NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA, **Certificate of analysis**, DORM-4, Fish protein certified reference material for trace elements, 2012.

NRC, NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA, **Certificate of analysis**, DOLT-5, Dogfish liver certified reference material for trace metals and other constituents, 2014.

OLIVEIRA JUNIOR, O.P. **Preparação, caracterização e certificação de materiais de referência isotópicos de urânio**. (2006) 235 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85134/tde-08062007-135148/pt-br.php>>. Acesso em: 22 jun. 2013.

O'KEEFFE, M.; NUGENT, A.; CADOGAN, A., HOPKINS, J. P., DAESELEIRE, E., VAN PETEGHEM, C. Development of bovine muscle, liver and urine reference materials for zeranol – preparation, homogeneity and stability. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v.357, p.1029-1034, 1997.

PAUWELS, J.; VANDECASTEELE, C. Determination of the minimum sample mass of a solid CRM to be used in chemical analysis. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v.345, p.121-123, 1993.

PAUWELS, J.; LAMBERTY, A.; SCHIMMEL, H. Quantification of the expected shelf-life of certified reference. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry** v.361, p.395–399, 1998.

PETRONI, R. **Validação dos métodos de análise por ativação do Laboratório de Análise por ativação neutrônica do IPEN – CNEN/SP visando a produção de materiais de referência certificados**. (2015). 261 p. Dissertação. (Mestrado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85131/tde-18062015-143835/pt-br.php>>. Acesso em: 21 ago. 2015.

PONKA, P.; TENENBEIN, M.; EATON, J. W. Iron. Em: NORDBERG, G. F.; FOWLER, B.A.; NORDBERG, M.; FRIBERG, L. T. (Ed) **Handbook on the Toxicology of Metals**, 3rd Ed., Amsterdam: Elsevier, 2007, p. 577-598.

QUEVAUVILLER P.; MAIER, E. **Interlaboratory studies and certified reference materials for environmental analysis**. The BCR approach. Oxford: Elsevier, 1999.

RAFFI, J.; KISTER, J. Food irradiation: wholesomeness and treatment control. Em: SPOTHEIM-MAURIZOT, M.; MOSTAFAVI, M.; DOUKI, T.; BELLONI, J. (Ed) **Radiation chemistry**. From basics to applications in material and life sciences, 3ed, Les Ulis: EDP Science, 2008.

ROSSBACH, M.; GROBECKER, K. H. Homogeneity studies of reference materials by solid sampling – AAS and INAA. **Accreditation and Quality Assurance**, v.4, p.498-503, 1999.

SANTANA, L.V. **Preparo, caracterização e uso de um material de referência para ensaios de proficiência para determinação de metais em tecido de peixe in natura**. (2013) 207 p. Dissertação. (Mestrado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85134/tde-05092013-090937/pt-br.php>>. Acesso em: 07 jun. 2017.

SAREMBAUD, J.; PINTO, R.; RUTLEDGE, D. N.; FEINBERG, M. Application of the ANOVA-PCA method to stability studies of reference materials. **Analytica Chimica Acta**, v.603, p.147-154, 2007.

SARIC, M.; LUCCHINI, R. Manganese. Em: NORDBERG, G. F.; FOWLER, B.A.; NORDBERG, M.; FRIBERG, L. T. (Ed) **Handbook on the Toxicology of Metals**, 3rd Ed., Amsterdam: Elsevier, 2007, p. 645-674.

SECEX, SECRETARIA DE COMERCIO EXTERIOR. MINISTERIO DO DESENVOLVIMENTO, INDUSTRIA E COMERCIO EXTERIOR. BRASIL. **Balança comercial**. Disponível em: <<http://www.mdic.gov.br/index.php/balanca-comercial>>. Acesso em: 29 mai. 2017.

SILVA, G. B.; REIS, B. Z.; COZZOLINO, S. M. F. Zinco. Em: COZZOLINO, S. M. F. (Org). **Biodisponibilidade de nutrientes**, 5. ed., Barueri, SP: Manole, 2016, p. 729-760.

SILVERMAN, B.W. **Density estimation for statistics and data analysis**. Boca Raton, FL: CRC, 1998.

SKERFVING, S.; BERGDAHL, I. A. Lead. Em: NORDBERG, G. F.; FOWLER, B.A.; NORDBERG, M.; FRIBERG, L. T. (Ed) **Handbook on the Toxicology of Metals**, 3rd Ed., Amsterdam: Elsevier, 2007, p. 599-643.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentals of Analytical Chemistry**, 9th Ed., Belmont, CA: Brooks/Cole, 2014.

SONNTAG, T. M.; ROSSBACH, M. Micro-homogeneity of candidate reference materials characterized by particle size and homogeneity factor determination. **Analyst**, v.122, p. 27-31, 1997.

STATSOFT. **Software STATISTICA 7.0**, Statsoft, Inc., Tulsa,OK, 2005.

STOEPLER, M.; WOLF, W. R.; JENKS, P. J. (Ed.). **Reference Materials for Chemical Analysis**. Certification, availability, and proper usage. Weinheim: Wiley-VCH, 2001.

SWIECKY, C.; GARCÍA, S. I.; VILLAAMIL LEPORI, E. C. **Epidemiología del Hidroarsenicismo crónico regional endémico (HACRE) en la República Argentina**. Buenos Aires: UnIDA- CONAPRIS - ATA, 2006. Disponível em: <<http://www.msal.gob.ar/images/stories/ministerio/intoxicaciones/hacre/libro-hidroarsenicismo.pdf>>. Acesso em: 12 set. 2017.

THOMPSON M.; STEPHEN L. R. E. A review of interference effects and their correction in chemical analysis with special reference to uncertainty. **Accreditation and Quality Assurance**, v.10, p.82–97, 2005.

THOMPSON M., ELLISON S. L. R., WOOD R. The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories. IUPAC Technical Report. **Pure and Applied Chemistry**, v.78, n.1, p.145- 196, 2006.

TOLDRA, F.; REIG, M. **Analytical Tools for Assessing the Chemical Safety of Meat and Poultry**. New York, NY: Springer, 2012.

TRAMONTE, V. L. C. G.; CALLOU, K. R. A.; COZZOLINO, S. M. F. Sódio, cloro e potássio. Em: COZZOLINO, S. M. F. (Org). **Biodisponibilidade de nutrientes**, 5. ed., Barueri, SP: Manole, 2016, p. 575-597.

ULRICH, J.C. **Preparação e caracterização de um material de referência de peixe**. (2011) p. 129. Tese (Doutorado em tecnologia nuclear). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo. Disponível em:
<<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85134/tde-15092011-092620/pt-br.php>>.
Acesso em: 22 jul. 2013.

ULRICH, J. C.; SARKIS, J. E. S. Preparation and certification of a reference material for the total mercury and methylmercury mass fractions in fish. **Accreditation and Quality Assurance**, v.18, p.511–516, 2013.

VAN DER VEEN, A. M. H.; PAUWELS, J. Uncertainty calculations in the certification of reference materials. 1. Principles of analysis of variance. **Accreditation and Quality Assurance**, v.5, p.464–469, 2000.

VAN DER VEEN, A. M. H.; LINSINGER, T. P. J.; PAUWELS, J. Uncertainty calculations in the certification of reference materials. 2. Homogeneity study. **Accreditation and Quality Assurance**, v.6, p.26–30, 2001a.

VAN DER VEEN, A. M. H.; LINSINGER, T. P. J.; LAMBERTY, A.; PAUWELS, J. Uncertainty calculations in the certification of reference materials. 3. Stability study. **Accreditation and Quality Assurance**, v.6, p.257–263, 2001b.

VAN DER VEEN, A. M. H.; LINSINGER, T. P. J.; SCHIMMEL, H.; LAMBERTY, A.; PAUWELS, J. Uncertainty calculations in the certification of reference materials. 4. Characterisation and certification. **Accreditation and Quality Assurance**, v.6, p.290–294, 2001c.

VEGA MARTINEZ, M. A. **Desenvolvimento e produção de material de referência certificado de folhas de cana-de-açúcar para avaliação da qualidade nutricional** (2016) p. 181. Tese (Doutorado em Química na Agricultura e no Ambiente). Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba.

VIEIRA PERES, T.; ASCHNER, M. Nutritional, Genetic, and Molecular Aspects of Manganese Intoxication. In: Collins, J. F, (Ed). **Molecular, Genetic, and Nutritional Aspects of Major and Trace Minerals**. Amsterdam, Elsevier, 2017, p.367-376.

WAGSTAFFE, P.J; HECHT, H.; MUNTAU, H.; SCHRAMEL, P. Preparation of bovine muscle, bovine liver and pig kidney reference materials and the certification of the contents of nine elements of toxicological and nutritional interest. **Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie**, v.329, p. 475-479, 1987.

WESSLING-RESNICK, M. Iron: Basic Nutritional Aspects. In: Collins, J. F, (Ed). **Molecular, Genetic, and Nutritional Aspects of Major and Trace Minerals**. Amsterdam, Elsevier, 2017, p.161-173.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Food irradiation. A technique for preserving and improving the safety of food**. Geneva, Switzerland, 1988. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/handle/10665/38544>>. Acesso em: 29 mai. 2017.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Trace elements in human nutrition and health**. Geneva, 1996. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/handle/10665/37931>>. Acesso em: 29 mai. 2017.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **High-dose irradiation: wholesomeness of food irradiated with doses above 10 kGy**. WHO Technical report series 890. Geneva, 1999. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/handle/10665/42203>>. Acesso em: 29 mai. 2017.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diet, nutrition, and the prevention of chronic disease**. Report of a joint WHO/FAO Expert Consultation. WHO Technical Report Series 916. Geneva, 2003. Disponível em: <<http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/trs916/en/>>. Acesso em: 29 mai. 2017.

WOLD, S. Principal component Analysis. **Chemometrics and intelligent laboratory systems**, v.2, p.37-52, 1987.

WOLF, W. R.; ANDREWS, K. W. A system for defining reference material applicable to all food matrices. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 352, p.73-76, 1995.

ZEILLER, E.; BENETKA, KOLLER, R.; SCHORN, M. Dry mass determination: what role does it play in combined measurement uncertainty? A case study using IAEA 392 and IAEA 413 algae reference materials. **Accreditation and Quality Assurance**, v.12, p.295–302, 2007.

ZEISLER, R.; GREENBERG, R. R.; MACKEY, E. A.; MURPHY, K. E.; SPATZ, R. O.; TOMLIN, B. E. Challenges and successes in the use of neutron activation analysis procedures for value assignment of animal serum and bovine liver Standard Reference Materials. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 281, p.11–15, 2009.

ZEISLER, R.; VAJDA, N.; KENNEDY, G.; LAMAZE, G. MOLNÁR, G. L. Activation analysis. Em: VÉRTES, A.; NAGY, S.; KLENCsÁR, Z.; LOVAS, R.; ROSCH, F. (Ed). **Handbook of Nuclear Chemistry**, 2nd Ed, Dordrecht: Springer, 2011, p. 1553-1617.

ZSCHUNKE, A The role of reference materials **Accreditation and Quality Assurance**, v.5, p.441–445, 2000a.

ZSCHUNKE, A. (Ed.) **Reference materials in analytical chemistry** – A guide for selection and use. Berlin: Springer, 2000b.

APÊNDICE A – Lista de participantes do programa de comparação interlaboratorial para caracterização de candidato a material de referência de rim bovino

Bioagri Ambiental Ltda.

Laboratório de Metais
Brasil

Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear - CDTN-CNEN/MG

Laboratório de Radioquímica/Ativação Neutrônica
Brasil

Centro de Inovação e Tecnologia SENAI FIEMG – Campus CETEC

Instituto SENAI de Tecnologia em Química
Laboratório de Traços Metálicos
Brasil

Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA), Argentina

Departamento de Química Nuclear
Laboratorio de Técnicas Analíticas Nucleares
Argentina

Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA), Argentina

Departamento de Química Analítica
Laboratorio de Fluorescencia de Rayos X
Argentina

Comissão Nacional de Energia Nuclear - CNEN

Laboratório de Poços de Caldas – LAPOC
Setor de Química Analítica
Brasil

Eletrobras Eletronorte S.A.

Centro de Tecnologia
Ensaio Físico-químicos
Brasil

Embrapa Pecuária Sudeste

Laboratório de Química Analítica
Brasil

APÊNDICE A – continuação

Freitag Laboratórios Ltda.

Controle da qualidade

Brasil

Fundação de Ciência e Tecnologia - CIENTEC

Departamento de Química - DEQUIM

Laboratório de Análises Inorgânicas

Brasil

IAEA Environment Laboratories

Department of Nuclear Sciences and Applications

Terrestrial Environment Laboratory

Austria

IBTeC – Instituto Brasileiro de Tecnologia do Couro, Calçado e Artefatos

Unidade de Materiais

Laboratório de Substâncias Restritivas

Brasil

Instituto Evandro Chagas (IEC)

Seção de Meio Ambiente (SAMAM)

Laboratório de Toxicologia

Setor de Espectrometria III – ICP-MS

Brasil

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN - CNEN/SP

CQMA – Centro de Química e Meio Ambiente

LCQ - Laboratório de Caracterização Química

Brasil

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN - CNEN/SP

CRPq - Centro de Reator de Pesquisas

LAN -Laboratório de Análise por Ativação Neutrônica

Brasil

Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL

Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos - CCQA

Laboratório de Inorgânicos

Brasil

APÊNDICE A – continuação

Instituto de Tecnologia do Paraná- TECPAR

Centro de Tecnologia em Saúde e Meio Ambiente

Laboratório de espectrometria

Brasil

Instituto Peruano de Energia Nuclear

Departamento de Investigación Científica

Laboratorio de Técnicas Analíticas

Perú

Jožef Stefan Institute

Department of Environmental Sciences

Slovenia

Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento

Laboratório Nacional Agropecuário em Minas Gerais – LANAGRO/MG

Laboratório de Elementos Inorgânicos

Brasil

Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento

Laboratório Nacional Agropecuário - Lanagro - RS

Laboratório de metais, traços e contaminantes

Brasil

Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento

Laboratório Nacional Agropecuário - Lanagro - SP

Laboratório de Contaminantes Inorgânicos (COI)

Brasil

NSF Bioensaios - Prestação de Serviços de Análises e Certificação Ltda.

Setor Metais

Brasil

SCK - CEN

LRM

Laboratory k0 -NAA

Belgium

APÊNDICE A – continuação

Tommasi Analítica Ltda.

Área Técnica

Laboratório de Metais

Brasil

TÜV SÜD SFDK Laboratório de Análise de Produtos Ltda.

Laboratório de Análise de Produtos

Brasil

Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Químicas

Centro de Química Aplicada - CEQUIMAP

Argentina

Universidade Federal de Sergipe

Departamento de Química

Laboratório de Química Analítica Ambiental

Brasil

Universidade Federal do ABC

Centro de Ciências Naturais e Humanas (CCNH)

Brasil

Universidade Federal do Pará

Programa de Pós-graduação em Geologia e Geoquímica

LAMIGA- MUGEO

Brasil

APÊNDICE B – Carta convite e instruções de medição do programa de comparação interlaboratorial para caracterização de candidato a material de referência de rim bovino

Programa de comparação interlaboratorial para caracterização de candidato a material de referência de rim bovino

O laboratório de Análise por Ativação Neutrônica do IPEN - CNEN/SP tem a satisfação de convidá-lo para participar da comparação interlaboratorial para a **caracterização do candidato a material de referência de rim bovino: IPEN RB-1 – Rim bovino**. O objetivo deste projeto é preparar um material de referência certificado de matriz biológica para ser utilizado na garantia de qualidade e inocuidade dos alimentos de origem cárnea, que seja de utilidade para os laboratórios da região. O projeto também está relacionado a um trabalho de doutorado que está sendo desenvolvido no IPEN - CNEN/SP, sob a orientação dos Drs. Edson Gonçalves Moreira e Marina B. A. Vasconcellos.

Os rins utilizados neste projeto vêm de bovinos criados em condições de estrito controle sanitário e de alimentação, na Fazenda Canchim, localizada em São Carlos, estado de São Paulo. O material foi processado seguindo-se as recomendações do ISO Guia 35 sobre o preparo de materiais de referência. O material foi liofilizado e o tamanho de grãos ajustado para menos que 100 μm . Após homogeneização, o material foi embalado em frascos com aproximadamente 12 g cada, sendo finalmente esterilizado com radiação gama.

Os elementos de interesse para a caracterização são: As, Cd, Cl, Co, Cr, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Na, Pb, Se e Zn, que se apresentam em nível de concentração natural no material. A caracterização de outros analitos, tais como substâncias orgânicas e radionuclídeos, também é bastante bem vinda.

Dois frascos serão enviados para cada participante, devendo ser armazenados sob refrigeração. Um frasco corresponderá ao **material a ser caracterizado** e o outro será um **material de referência certificado** que será utilizado como controle de qualidade.

Uma vez que os materiais são higroscópicos, pede-se que seja feita a determinação de umidade residual dos materiais. Uma alíquota Independente de cada frasco deve ser seca em estufa a 85°C até massa constante.

Pede-se que os participantes façam três determinações independentes dos elementos em cada frasco, utilizando métodos a sua escolha.

Os participantes devem enviar os resultados em mg kg^{-1} , em massa seca, juntamente com descrição do método utilizado.

Junto com as amostras será enviado um instrutivo detalhando toda a informação necessária.

Todos **os resultados serão tratados de forma estritamente confidencial** e um relatório com a avaliação do estudo será enviado a cada um dos participantes.

Junto com o relatório será enviada a informação relativa ao material de referência certificado enviado como controle de qualidade.

No caso de que esteja interessado em participar, pedimos enviar por email o formulário adjunto. É muito importante o correto preenchimento do formulário para que o envio das amostras seja satisfatório.

Email de contato: Liliana Castro, lcastroesnal@usp.br

Cronograma aproximado:

Recepção do interesse em participação	até 30 de agosto de 2016
Envio das amostras	até 10 de setembro de 2016
Recepção de resultados	até 31 de outubro de 2016
Envio de relatório preliminar	até 30 de novembro de 2016
Envio de relatório final	até 10 de abril de 2017

Laboratório de Análise por Ativação Neutrônica, LAN

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN - CNEN/SP

Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, São Paulo, SP, 05508-000, Brasil

Telefone de contato: (+5511) 3133 9962

Email de contato: lcastroesnal@usp.br

FORMULÁRIO DE INSCRIÇÃO

Dados do participante
<i>Instituição</i>
Departamento:
Laboratório:
<i>Pessoa de contato</i>
Nome:
Telefone:
Email:

Endereço	
Rua	Nº
Bairro	CEP
Cidade	País

Se estiver interessado em participar, por favor, enviar o formulário completo por email a lcastroesnal@usp.br ate 30 de agosto de 2016.

Programa de comparação interlaboratorial para caracterização de candidato a material de referência de rim bovino

INSTRUÇÕES DE MEDIÇÃO

Por favor, ler atentamente estas instruções antes de realizar as determinações e completar a Planilha de Resultados.

Descrição das amostras enviadas

Foram enviados 2 frascos a cada participante, com as seguintes características:

1. Frasco com o **material a ser caracterizado**. Está identificado como **IPEN RB1 Trace Elements in Bovine Kidney**. Seu conteúdo é de aproximadamente 12g.
2. Frasco com um **material de referência certificado** que será utilizado como controle de qualidade. Está identificado como **CRM Quality Control**. Seu conteúdo é de aproximadamente 25g.

Descrição do preparo do material a caracterizar

Os rins utilizados neste projeto vêm de bovinos criados em condições de estrito controle sanitário e de alimentação, na Fazenda Canchim, localizada em São Carlos, estado de São Paulo. O material foi processado seguindo-se as recomendações do ABNT ISO Guia 35 sobre o preparo de materiais de referência. O material foi liofilizado e o tamanho de grãos ajustado para menos que 100 μm . Após homogeneização, o material foi embalado em frascos com aproximadamente 12 g cada, sendo finalmente esterilizado com radiação gama.

Instruções de medição

Solicita-se que os participantes façam três determinações independentes de cada elemento em cada frasco, usando como mínimo 0,2 g de material.

Uma vez que os materiais são higroscópicos, pede-se que seja feita a determinação de umidade residual dos materiais numa alíquota independente de cada frasco (diferente da utilizada para análise). Todos os resultados devem ser informados na base seca.

A determinação do teor de umidade é um parâmetro definido pelo método de medição. Por este motivo, é importante a aplicação da mesma metodologia para poder comparar os resultados obtidos nos diferentes laboratórios. O protocolo recomendado neste caso é: uma sub-amostra de 1g deve ser seca em estufa a $85^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ até massa constante.

Controle de qualidade

Os laboratórios devem seguir seus próprios procedimentos de controle de qualidade. Adicionalmente pede-se informar os resultados da amostra enviada "**CRM Quality Control**" junto com os resultados do material a ser caracterizado, na Planilha de Resultados.

Elementos a determinar

Os elementos de interesse para a caracterização são: As, Cd, Cl, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Na, Pb, Se e Zn, que se apresentam em nível de concentração natural no material. A

caracterização de outros analitos, tais como substâncias orgânicas e radionuclídeos, também é bastante bem vinda.

Os participantes devem utilizar as técnicas analíticas de sua escolha para realizar as determinações.

Informe de resultados

1. Os participantes deverão informar os resultados junto com uma breve descrição da metodologia de medição utilizada na Planilha de Resultados eletrônica que será enviada por email junto com o código do laboratório. A descrição do método de medição deve incluir a seguinte informação:

- Procedimento de preparo de amostras;
- Método instrumental usado para a quantificação dos elementos informados;
- Informação sobre a validação do método;
- Declaração da rastreabilidade dos resultados obtidos;
- Forma em que foram calculados os resultados e incertezas;
- Procedimentos de controle de qualidade utilizados;

2. Para cada elemento o participante deverá informar:

- A massa média utilizada para realizar as determinações;
- Os resultados de cada determinação independente;
- O valor médio e incerteza combinada em mg kg^{-1} ;
- Incerteza expandida e fator de abrangência;
- Limite de detecção do método;
- Os resultados devem ser informados com tantos algarismos significativos como corresponda, segundo a incerteza da medição;
- Os resultados devem ser informados na base seca, indicando o valor de umidade determinado.

Todos **os resultados serão tratados de forma estritamente confidencial**. Um relatório com a avaliação do estudo será enviado a cada um dos participantes ao finalizar a intercomparação. No mesmo, os participantes estarão identificados com o código que será enviado junto com as Planilhas de resultados. Junto com o relatório será enviada a informação relativa ao material de referência certificado enviado como controle de qualidade.

A data limite para o envio de resultados é 11 de novembro de 2016.

Cronograma aproximado:

Recepção de resultados	até 11 de novembro de 2016
Envio de relatório preliminar	até 09 de dezembro de 2016
Envio de relatório final	até 30 de abril de 2017

APÊNDICE C – Estudo de tendências na avaliação da homogeneidade entre frascos: a) resultados apresentados por ordem de medição com ajuste de curva linear; b) resultados apresentados por ordem de frasco com ajuste de curva linear

APÊNDICE C – continuação

APÊNDICE C – continuação

APÊNDICE C – continuação

a)

b)

a)

b)

APÊNDICE C – continuação

a)

b)

a)

b)

APÊNDICE C – continuação

APÊNDICE D – Estudo de tendências em função do tempo de exposição às duas temperaturas avaliadas no estudo de estabilidade de curto prazo. a) resultados obtidos a 20°C com ajuste de curva linear; b) resultados obtidos a 50°C com ajuste de curva linear

APÊNDICE D – continuação

a)

b)

a)

b)

APÊNDICE D – continuação

a)

b)

a)

b)

APÊNDICE D – continuação

a)

b)

a)

b)

APÊNDICE D – continuação

APÊNDICE D – continuação

a)

b)

APÊNDICE E – Estudo de tendências em função do tempo de exposição a 20°C no estudo de estabilidade de longo prazo. Resultados obtidos com ajuste de curva linear.

APÊNDICE E – continuação

APÊNDICE F – Resultados informados pelos laboratórios participantes na comparação interlaboratorial de certificação.

F1 – Resultados informados para o material de referência IPEN 001-Trace element in fish tissue.

Lab. nº	As (mg/kg)					Cd (mg/kg)					Cl (mg/kg)					Co (mg/kg)				
	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U
1	6,969	6,987	6,924	6,96	-	0,019	0,018	0,019	0,019	-	-	-	-	-	-	0,111	0,118	0,109	0,1127	-
2	5,93	5,490	6,02	5,81	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,165	0,188	0,183	0,179	0,024
3	5,5	5,6	5,4	5,5	0,404	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,133	0,130	0,131	0,132	0,009
4	6,20	5,96	6,08	6,08	0,41	< 0,5	< 0,5	< 0,6	-	-	5350	6450	5090	5630	263	0,15	0,17	0,15	0,15	0,01
5	5,08	5,16	5,49	5,24	0,5	<20	<20	<20	-	-	223	102	112	146	82	<1	<1	<1	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	0,0046	0,0038	0,0043	0,0042	0,0007	3310	3400	3390	3366,7	150	-	-	-	-	-
11	4,35	4,02	3,77	4,07	0,84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	5,593	5,5523	5,7405	5,6286	0,183	-	-	-	-	-	4386	5438,3	4387,7	4737,3	824,1	0,143	0,1297	0,2181	0,1636	0,0044
13	5,71	4,47	5,82	-	0,84	0,239	0,260	0,291	-	0,042	-	-	-	-	-	<4	<4	<4	-	-
14	5,77	5,82	5,95	5,8467	0,304	-	-	-	-	-	4937	4804	4865	4869	263	0,144	0,150	0,166	0,153	0,016
15	-	-	-	-	-	-	-	-	< 0,0067	-	-	-	-	-	-	-	-	-	< 0,006	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	10,62	9,21	11,37	10,40	2,2598	0,22	0,17	0,17	0,19	0,0907	-	-	-	-	-	0,31	0,26	0,27	0,28	0,0279
19	3,92	3,853	3,875	3,883	0,0002	0	0	0	0,000	0,0002	-	-	-	-	-	0,044	0,044	0,044	0,044	0,008
20	3,5092	3,2654	2,990	3,2548	0,293	0,0297	0,0297	0,0277	0,029	0,001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	-
22	6	6	6	6	0,1	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	-
23	2,96	2,81	2,89	2,8867	0,25	<0,05	<0,05	<0,05	< 0,05	-	-	-	-	-	-	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	-
24	4,89	5,28	5,34	5,17	0,24	0,24	0,27	0,27	0,26	0,24	-	-	-	-	-	<1	<1	<1	<1	0,63
25	5,183	4,897	4,882	-	-	< 0,01	< 0,01	< 0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	6,7368	6,4727	6,1479	6,4525	-	0,0215	0,0189	0,0153	0,0186	-	-	-	-	-	-	0,1407	0,1262	0,1266	0,1312	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	<0,002	<0,002	<0,002	-	-	<0,026	<0,026	<0,026	-	-	-	-	-	-	-	<0,07	<0,07	<0,07	-	-
29	6,06	6,04	6,34	6,15	0,18	< 0,150	< 0,150	< 0,150	< 0,150	0,006	-	-	-	-	-	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	-
30	4,883	4,579	4,9066	4,7895	-	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	-
31	-	-	-	-	-	0,020	0,016	0,020	0,019	0,008	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	2,786	2,536	2,708	2,6767	0,068	< 0,013	< 0,013	< 0,013	< 0,013	0,091	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	5,85	5,83	5,8	5,83	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,13	0,127	0,131	0,13	0,01

APÊNDICE F1 – continuação.

Lab. nº	Cr (mg/kg)					Cu (mg/kg)					Fe (mg/kg)					Hg (mg/kg)				
	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U
1	0,049	0,018	0,017	0,028	-	1,316	1,152	1,112	1,1933	-	12,979	12,197	12,449	12,542	-	0,956	0,942	0,955	0,951	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17	16,8	13,8	15,9	4,8	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18	16	17	17	2,019	0,88	0,74	0,85	0,82	0,101
4	<0,15	<0,20	<0,15	-	-	<3	<2	<1,5	-	-	13,8	16,2	14,6	14,9	2	0,97	0,99	0,99	0,98	0,05
5	<1	<1	<1	-	-	2	1	2	2	1	16	16	15	15	2	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	112,1	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,98	0,98	0,97	0,977	0,34
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	14	14	14	2,1	0,950	1,040	1,000	1,000	0,35
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11,997	15,862	11,317	13,059	1,834	-	-	-	-	-
13	<8	<8	<8	-	-	2,1807	2,4922	4,3614	-	0,6	51	44	45	-	6	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	12	12	12	1	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	<0,043	-	15,41	14,13	13,54	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10,40	11,23	10,82	10,32	1,26	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11,85	10,21	11,03	10,71	1,70	-	-	-	-	-
18	0,77	0,62	0,80	0,73	0,4757	3,98	2,88	2,81	3,23	0,77	172,79	152,59	113,95	146,45	101,4	1,11	0,96	0,85	0,98	0,116
19	0,111	0,111	0,088	0,103	0,0003	0,243	0,266	0,221	0,243	0,008	1,041	1,1	1,041	1,0	0,003	0,022	0,022	0,022	0,022	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	1,01	1,2	1,1	1,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	0	0	0	0	-	1,5	1,5	1,4	1,4	0,1	2,216	1,8	2,4937	2,1814	1	1,1088	1,2065	1,2184	1,1779	0,003
23	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	-	0,61	0,69	0,65	0,65	0,09	6,38	6,51	6,45	6,4467	0,5	0,341	0,372	0,355	0,356	0,14
24	1,04	1,12	1,21	1,12	0,28	1,20	0,90	1,16	1,08	0,3	12,4	11,3	10,2	11,3	3,4	0,456	0,471	0,399	0,442	0,048
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,891	0,826	0,885	-	-
26	-	-	-	-	-	1,50	1,18	1,29	1,32	-	12,79	11,92	11,50	12,07	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14,596	14,155	13,615	14,1	1,1	1,13	1,11	1,09	1,1	0,09
28	<0,1	<0,1	<0,1	-	-	<0,075	<0,075	<0,075	-	-	48,95	47,54	49,74	50,67	17,6	0,2	0,22	0,24	0,23	0,0002
29	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	-	1,26	1,14	1,22	1,21	-	14,1	13,6	13,4	13,7	-	0,98	0,97	0,96	0,97	-
30	0	0	0	0	-	1,811	1,554	1,805	0	-	13,529	13,393	14,656	13,859	-	0,6083	0,6328	0,6061	0,6157	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18	23	21	21	6	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0130	0,9990	1,0030	1,0050	0,0160
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	12	12,3	12	1	0,7910	0,779	0,7540	0,7750	0,052

APÊNDICE F1 – continuação.

Lab. nº	K (mg/kg)					Mg (mg/kg)					Mn (mg/kg)					Na (mg/kg)				
	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U
1	12272	12276	12250	12266		1086,9	1086,1	1078,1	1083,7		<0,013	<0,013	<0,013	<0,013		4615	4555	4523	4564,3	
2	13400	13200	12700	13100	2000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5020	5070	4810	4970	400
3	13373	12381	12185	12647	1151	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4936	4677	4606	4740	388
4	13300	13800	13100	13400	600	1200	1400	1130	1243	60	0,4	0,51	0,36	0,42	0,06	4930	5130	4830	4963	240
5	9622	8772	8286	8893	931	-	-	-	-	-	5,7	5,8	5,7	5,7	1,6	-	-	-	-	-
8	-	-	-	10770	-	-	-	-	1670,9	-	-	-	-	15	-	-	-	-	3760	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	854	868	844	855	104	0,30	0,28	0,29	0,29	0,04	4314	4227	4239	4260	513
12	12819	12113	11804	12245	883,92	973	1096	1155	1075	158,4	0,34	0,32	0,32	0,33	0,175	4910,6	4484,8	4701,2	4698,9	65,143
13	12894	12325	12809	-	1850	1064	977	984	-	142	<1	<1	<1	-	-	5967	6115	6005	-	867,45
14	-	-	-	-	-	1135	1052	1059	1082	171	-	-	-	-	-	4628	4236	4646	4503	234
15	7575,1	7677,5	7640,7	-	-	984,88	1002,74	1000,26	-	-	-	-	-	< 0,066	-	-	-	-	-	-
16	5545	5642	5593	5335	97	766,68	749,27	757,97	722,95	144,76	-	-	-	-	-	2436	2467	2451	2338	30,82
17	5855,6	5633,7	5744,6	5578	221,88	768,89	766,53	767,71	745,40	141,22	-	-	-	-	-	2537,4	2485,2	2511,3	2438	52,2
18	13212	13958	15455	14208	2551,5	1610,3	1792,6	1597,4	1666,8	384,88	1,21	0,91	0,99	1,04	0,048	6484	7041	6138	6554	1120,8
19	4906,3	4930,3	4872,2	4903	0,002	298,81	301,09	297,33	299,07	0,004	0,066	0,066	0,066	0,066	0,008	1639	1641,3	1659,3	1647	0,002
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,60	0,60	0,60	0,60	-	-	-	-	-	-
22	13010	13251	13112	13125	10	1501,7	1545,1	1521,5	1522,8	10	0,00	0,00	0,00	0,00	1	6982,8	7137,5	7046,7	7055,7	10
23	6160	6200	6150	6170	142	497	500	506	501	55	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	-	2350	2392	2400	2380,7	25
24	12653	12253	12392	12433	206	984,2	989,5	1001,9	991,9	30	-	-	-	-	-	4701	4730	4700	4710	201
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	1238,7	1171,7	1199,9	1203,4	-	0,3948	0,3635	0,3561	0,3715	-	4115	3893	4008	4006	-
27	12185	12088	12367	12312	423	1086,5	1090,8	1101,2	1093	38,6	-	-	-	-	-	4716,2	4724,6	4774,6	4738	205,4
28	-	-	-	-	-	243,81	242,83	242,27	252,56	8,60	<0,05	<0,05	<0,05	-	-	-	-	-	-	-
29	11859	11672	11523	11685	-	1064	1078	1065	1069	-	0,41	0,41	0,41	0,41	-	4920	4806	4737	4821	-
30	13739	13696	13775	13737	-	1072,7	1041,3	1061	1058,3	-	1,838	1,891	1,64	1,7897	-	4194,3	4054,5	4172,3	4140,4	-
31	13600	13400	13600	13600	1400	1090	1070	1080	1080	80	0,41	0,42	0,38	0,41	0,05	4600	4500	4900	4700	500
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	12398	12483	11869	12250	940	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4756	4793	4735	4761	336

APÊNDICE F1 – continuação.

Lab. nº	Pb (mg/kg)					Se (mg/kg)					Zn (mg/kg)				
	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U
1	0,014	0,012	0,01	0,012	-	4,183	4,192	4,067	4,1473	-	16,67	16,853	16,936	16,82	-
2	-	-	-	-	-	2,14	2,04	2,04	2,07	0,76	17,6	17,5	16,8	17,3	1,4
3	-	-	-	-	-	2,8	2,9	2,7	2,8	0,227	17,88	17	15	17	1,877
4	-	-	-	-	-	3,17	3,2	3,2	3,2	0,2	17,9	18,2	17,8	18	1,2
5	<0,5	<0,5	<0,5	-	-	3	3	4	3	0,5	18	19	17	18	4
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17,9	-
10	0,015	0,018	0,017	0,017	0,003	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	2,84	2,89	2,73	2,82	0,0893	16,8	16,6	16,3	16,6	0,473
13	3,74	3,32	4,26	-	0,62	1,80	1,95	1,80	-	0,26	42,368	32,295	30,114	-	4
14	-	-	-	-	-	2,71	2,82	2,67	2,73	0,16	17,1	17,5	16,7	17,1	0,9
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11,24	10,44	10,42	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,16	12,15	12,16	11,595	0,86
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11,74	11,85	11,8	11,45	1,42
18	0,17	0,13	0,13	0,15	0,0723	5,76	4,92	5,94	5,54	1,3891	29,3	23,5	22,1	25,0	5,75
19	0	0	0	0,000	0,002	0,443	0,421	0,531	0	0,003	0,864	0,864	0,864	0,86	0,005
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	0	0	0	0	0,2	13,6	13,2	13,4	13,394	0,2	23,546	24,007	23,67	23,7	2
23	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	-	1,91	1,87	2,01	1,93	0,15	9,02	9,55	9,37	9,3133	0,9
24	0,60	0,64	0,46	0,57	0,28	2,86	2,75	3,33	2,98	0,34	14,6	15,1	15,2	15,0	3,4
25	<0,050	<0,050	<0,050	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	0,027	0,0219	0,028	0,0256	-	3,1701	3,21229	2,8624	3,0816	-	18,463	17,335	17,433	17,744	-
27	-	-	-	-	-	0,829	0,7964	0,8499	0,83	0,067	15,6	15	17,1	16	2,61
28	<0,13	<0,13	<0,13	-	-	1,8	1,52	1,9	1,81	0,0002	22,29	29,36	24,5	26,8	1,161
29	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	0,02	3,8	3,8	3,9	3,8	-	16,2	16,9	16,1	16,4	-
30	0	0	0	0	-	2,838	2,754	2,926	2,8393	-	13,684	13,141	13,615	13,48	-
31	-	-	-	<0,03	-	-	-	-	-	-	16,8	16,1	16,5	16,5	2
32	<0,100	<0,100	<0,100	<0,100	0,027	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	2,9	2,96	2,97	2,94	0,22	16,5	16,7	16,5	16,6	1,2

APÊNDICE F1 – continuação.

Lab nº	Al (mg/kg)					Br (mg/kg)					Ca (mg/kg)					Cs (mg/kg)					Hf (mg/kg)				
	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U
2	-	-	-	-	-	26,5	26,7	27,00	26,7	2,00	-	-	-	-	-	0,046	0,051	0,06	0,052	0,011	0,0443	0,0414	0,0560	0,0472	0,009
3	-	-	-	-	-	23,5	23,1	22,3	22,9	1,762	-	-	-	-	-	0,049	0,043	0,042	0,045	0,006	0,041	0,044	0,034	0,039	0,006
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	534,0	498,4	480,7	504,4	46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	446,45	430,47	438,46	418,2	43,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	518,36	514,96	516,66	501,65	47,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	6,23	4,54	5,61	5,46	1,93	-	-	-	-	-	2060,2	1875,7	1145,5	1693,8	844,82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	24,9	25	24,9	24,9	1,8	-	-	-	-	-	0,045	0,046	0,046	0,046	0,004	0,039	0,037	0,037	0,038	0,004
Lab nº	Li (mg/kg)					Mo (mg/kg)					Ni (mg/kg)					P(mg/kg)					Rb (mg/kg)				
	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,0	2,9	3,0	3,0	0,4
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,2	2,4	2,2	2,3	0,198
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<30	<30	<30	<30	-	5214	4437,6	4062,9	4571,5	760,53	2,0	2,0	2,1	2,0	0,2
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5550,3	5595,8	5573	5315,5	78,4	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5525,2	5563,1	5544,2	5383	95,48	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,52	0,37	0,34	0,41	0,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3345	3420	3415	3393,3	55	-	-	-	-	-
26	0,0983	0,1065	0,0902	0,0983	-	-	-	-	-	-	0,2903	0,2564	0,2226	0,2564	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	-	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,51	2,45	2,46	2,47	0,17
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,48	2,67	2,45	2,53	0,22
Lab nº	S (mg/kg)					Sb (mg/kg)					Sr (mg/kg)					U (mg/kg)									
	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U					
5	6565	5472	5025	5687	955	-	-	-	-	-	2,766	2,806	2,98	2,851	0,222	-	-	-	-	-					
23	5334	5402	5390	5375,3	63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0007	0,0005	0,0006	0,0006	-					
29	-	-	-	-	-	<0,15	<0,15	<0,15	<0,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,57	3,50	3,55	3,54	0,24	-	-	-	-	-					

F2 – Resultados informados para o candidato a material de referência IPEN RB1 Trace Elements in Bovine Kidney.

Lab. nº	As (mg/kg)					Cd (mg/kg)					Cl (mg/kg)					Co (mg/kg)				
	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U
1	0,140	0,147	0,117	0,1347	-	0,149	0,161	0,140	0,150	-	-	-	-	-	-	1,546	1,685	1,475	1,5687	-
2	0,209	0,160	0,198	0,189	0,062	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,84	1,74	1,92	1,83	0,22
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,84	1,77	1,67	1,76	0,157
4	0,19	0,19	0,20	0,19	0,03	< 0,5	< 0,7	< 0,6	-	-	10800	11100	10800	10900	500	1,89	2,05	1,91	1,95	0,09
5	0,32	0,28	0,24	0,28	0,0717	<20	<20	<20	-	-	688	850	436	658	345	<1	<1	<1	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	0,074	0,073	0,076	0,0743	0,012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	0,12	0,13	0,14	0,13	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	0,222	0,006	-	-	-	-	-	9983,8	9738,2	9295	9672,3	536	1,7375	1,7028	1,6847	1,7084	0,049
13	1,11	0,79	0,86	-	0,13	0,415	0,391	0,286	-	0,0429	-	-	-	-	-	<4	<4	<4	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10100	9645	9649	9798	529	1,928	1,805	1,837	1,857	0,186
15	-	-	-	-	-	0,87	0,89	0,89	0,88	-	-	-	-	-	-	2,78	2,66	2,63	2,69	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	1,33	1,37	1,85	1,52	0,76	0,45	0,42	0,40	0,43	0,03	-	-	-	-	-	3,60	3,19	4,05	3,61	0,47
19	0,266	0,244	0,288	0,266	0,0002	0,111	0,089	0,111	0,104	0,0002	-	-	-	-	-	1,176	1,154	1,198	1,176	0,008
20	0,2633	0,2738	0,254	0,2637	0,024	0,1588	0,1599	0,1557	0,1581	0,008	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,42	1,33	1,30	1,35	-
22	0	0	0	0	0,1	0,2532	0,2322	0,2614	0,2489	0,02	-	-	-	-	-	2,2951	2,4401	2,4045	2,3799	0,1
23	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	-	0,16	0,17	0,16	0,16	0,008	5830	5800	5890	5840	200	0,81	0,79	0,85	0,8167	0,08
24	0,81	0,79	0,87	0,83	0,24	0,33	0,36	0,33	0,34	0,26	-	-	-	-	-	1,98	1,99	1,99	1,99	0,63
25	0,349	0,327	0,345	-	-	0,138	0,142	0,137	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	0,233	0,2247	0,217	0,2249	-	0,1455	0,1385	0,1432	0,1424	-	-	-	-	-	-	1,5302	1,6005	1,5622	1,5643	-
27	-	-	-	-	-	0,1259	0,1200	0,1201	0,13	0,0086	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	<0,002	<0,002	<0,002	-	-	<0,026	<0,026	<0,026	-	-	-	-	-	-	-	<0,07	<0,07	<0,07	-	-
29	0,277	0,295	0,288	0,287	0,009	0,168	0,177	0,167	0,171	0,006	-	-	-	-	-	1,0	1,0	1,0	1,0	-
30	0	0	0	0	-	0,1347	0,1344	0,1432	0,1374	-	-	-	-	-	-	1,436	1,408	1,486	1,4433	-
31	-	-	-	-	-	0,160	0,166	0,170	0,166	0,017	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	0,195	0,195	0,188	0,1927	0,068	0,156	0,147	0,163	0,1553	0,091	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,80	1,87	1,81	1,83	0,14

APÊNDICE F2 – continuação.

Lab. nº	Cr (mg/kg)					Cu (mg/kg)					Fe (mg/kg)					Hg (mg/kg)				
	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U
1	0,008	0,044	0,061	0,0377	-	16,7	18,1	15,9	16,9	-	223	240,3	215,5	226,27	-	<0,035	<0,035	<0,035	<0,035	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	275	267	273	272	26	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	252	252	242	249	18,53	-	-	-	-	-
4	<0,3	<0,3	<0,3	-	-	15	19	21	18	5	270	279	272	274	14	<1	<1,5	<0,9	-	-
5	<1	<1	<1	-	-	21	21	18	20	3	258	261	253	257	60	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	562,3	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,035	0,034	0,033	0,034	0,012
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	286	286	285	286	34	0,048	0,055	0,051	0,051	0,019
12	<0,12	<0,12	<0,12	-	-	-	-	-	18,2	0,17	266,78	259,77	256,8	261,12	7,4	-	-	-	-	-
13	<8	<8	<8	-	-	25,235	18,457	21,376	-	3,2	213	251	269	-	40	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	270	267	280	272	19	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	16,1	16,71	15,71	16,17	-	282,23	280,19	270,94	277,8	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	200,34	201,30	200,30	195,03	3,18	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	199,26	195,19	197,23	188,65	4,12	-	-	-	-	-
18	0,81	0,69	0,85	0,78	0,2	34,45	31,26	36,02	33,91	5,17	537,43	552,42	452,27	514,04	12	0,34	0,34	0,20	0,29	0,07
19	0,311	0,333	0,311	0,318	0,0003	5,413	5,369	5,435	5,406	0,008	146,2	147,0	146,43	146,6	0,003	0	0	0	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	19,579	19,265	19,788	19,54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	0	0	0	0	0,2	27,2	27,5	27,8	27,5	0,1	370,22	373,0	374,83	372,67	1	0,0505	0,0497	0,0503	0,0502	0,003
23	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	-	8,62	8,72	8,66	8,6667	0,09	105	108	106	106,33	8	0,017	0,021	0,019	0,019	0,003
24	1,22	1,17	1,01	1,13	0,28	13,45	13,63	14,39	13,83	0,56	270,5	275,0	268,6	271,4	14	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	0,047
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,025	0,023	0,022	-	-
26	-	-	-	-	-	16,72	17,48	17,27	17,15	-	258,73	260,24	260,52	259,83	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	18,882	19,532	19,259	19,2	0,81	279,13	282,72	290,91	284	14,65	0,0376	0,0321	0,0316	0,034	0,0082
28	<0,1	<0,1	<0,1	-	-	17,91	19,08	18,56	19,66	9,27	305,33	315,77	317,92	332,28	115,9	<0,0006	<0,0006	<0,0006	<0,0006	<0,0006
29	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	-	14,3	16,2	13,7	14,7	-	224	246	216	229	-	0,056	0,055	0,053	0,055	-
30	0	0	0	0	-	16,397	17,328	17,739	17,155	-	221,52	221,88	226,92	223,44	-	0	0	0	0	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	270	277	296	281	35	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0298	0,0303	0,0296	0,0299	0,0164
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	256	262	252	257	18	0,0270	0,0268	0,0280	0,0273	0,0018

APÊNDICE F2 – continuação.

Lab. nº	K (mg/kg)					Mg (mg/kg)					Mn (mg/kg)					Na (mg/kg)				
	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U
1	9951	10833	9598	10127	-	669,1	729,8	656	684,97	-	4,127	4,519	3,899	4,1817	-	7339	8022	7247	7536	-
2	13000	13100	13200	13100	1920	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8820	8930	8680	8810	700
3	12194	12394	11059	11882	1176	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8524	8862	8630	8672	639
4	11900	12800	12700	12467	700	810	830	800	813	87	5,96	6,18	5,95	6,03	0,30	9300	8700	9100	9033	467
5	9949	10288	8501	9580	1913	-	-	-	-	-	5,7	5,8	5,7	5,7	1,6	-	-	-	-	-
8	-	-	-	11200	-	-	-	-	1461	-	-	-	-	23	-	-	-	-	5720	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	613	601	622	612	76	4,88	4,78	4,86	4,84	0,58	7912	8008	8053	7991	956
12	12771	12553	13659	12994	1375	688	700	600	663	35	5,62	4,83	5,58	5,34	0,37	8995,7	8879,6	8729,2	8868	113
13	10191	12176	11229	-	1700	567	696	689	-	103	4,17	4,69	4,90	-	0,74	8879	10369	9261	-	1400
14	11148	10047	10956	10717	793,03	736	729	716	727	115	8,4	5,6	5,1	6,4	1,1	8836	8738	9071	8882	462
15	7419,9	7505,9	6921,6	7282	-	722,33	719,93	681,49	707,92	-	5,36	5,03	4,29	4,89	-	-	-	-	-	-
16	5537	5582	5559	5404	45	512,86	518,46	515,66	501,23	101,46	-	-	-	-	-	4019	4060	4039	3926	40,82
17	5628,9	5391,5	5510,2	5271	237,38	527,39	509,83	518,27	495,96	100,78	-	-	-	-	-	4096	3896,9	4019	3830	199,02
18	13501	14111	15134	14249	590,4	1263,7	1339,1	1194,6	1265,8	47,08	12,87	11,56	14,29	12,91	1,71	12031	12652	11404	12029	385,8
19	6053,1	6092,1	6016,9	6054	0,002	527,98	531,26	531,15	530,13	0,004	4,104	4,193	4,06	4,119	0,008	3314,2	3345,5	3306,3	3322	0,002
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,96	5,82	5,55	5,78	-	-	-	-	-	-
22	13617	13760	14324	13900	10	1123	1137,3	1152,7	1137,6	10	5,98	5,93	5,99	5,97	1	14779	15101	14970	14950	10
23	5580	5702	5680	5654	300	332	340	338	336,67	40	2,53	2,61	2,57	2,57	0,32	3970	4010	3950	3976,7	60
24	11679	11467	11682	11609	204	686,2	682,9	674,1	681,1	17	-	-	-	-	-	8521	8629	8617	8589	115
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	823,45	878,71	879,08	860,41	-	5,2693	5,558	5,5187	5,4486	-	7184	7612	7595	7464	-
27	11610	11608	11625	11614	370,9	786,34	792,56	810,62	796	28,6	5,801	5,926	5,858	5,86	0,16	8542,9	8511,6	8415	8490	416,3
28	-	-	-	-	-	236,73	240,7	241,96	254,56	8,72	9,26	9,54	7,92	9,46	1,109	-	-	-	-	-
29	9823	9472	8649	9315	-	666	732	655	684	-	4,90	5,35	5,58	5,28	-	7627	7434	6877	7313	-
30	15496	15283	15097	15292	-	762,16	782,99	805,9	783,68	-	6,299	6,443	6,494	6,412	-	7418,3	7415,7	7806,4	7546,8	-
31	12600	12500	12500	12600	1300	760	750	750	750	50	5,9	5,8	5,8	5,8	0,4	8400	8200	8300	8300	800
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	11644	11858	11430	11644	852	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8807	8874	8746	8809	622

APÊNDICE F2 – continuação.

Lab. nº	Pb (mg/kg)					Se (mg/kg)					Zn (mg/kg)				
	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U
1	0,051	0,056	0,038	0,0483	-	9,1085	9,398	8,411	8,9725	-	85,394	91,653	82,657	86,568	-
2	-	-	-	-	-	5,2	5,3	6,1	5,53	1,86	95,9	94,9	96,5	95,8	7,0
3	-	-	-	-	-	7,1	7,1	6,9	7,0	0,506	94	93	89	92	7,124
4	-	-	-	-	-	7,7	8,3	7,8	7,9	0,4	100	103	98	100	5
5	<0,5	<0,5	<0,5	-	-	7	7	9	8	2	102	94	93	96	12
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	113,4	-
10	0,051	0,062	0,067	0,060	0,010	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	7,28	7,07	7,22	7,19	0,22	94,7	93,8	92,9	93,8	2,6
13	4,28	7,19	5,74	-	0,86	6,20	6,12	6,41	-	0,96	95	102	-	-	15
14	-	-	-	-	-	7,14	8,23	7,38	7,58	0,46	99,4	99,3	103,0	100,6	5,2
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	93,63	92,82	87,29	91,25	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	68,05	70,34	69,19	67,257	4,36
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	67,99	66,49	67,24	64,32	3,86
18	0,27	0,22	0,20	0,23	0,02	14,16	13,62	17,73	15,17	2,16	159,0	141,9	158,5	153,1	22,93
19	0,333	0,244	0,288	0,288	0,002	0	0	0	0	0,003	69,485	69,441	68,709	69,21	0,005
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	0	0	0	0	0,2	15,2	16,8	15,5	15,839	0,2	157,48	159,6	161,08	159,4	2
23	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	-	3,35	3,68	3,65	3,56	0,3	47,2	48,9	47,8	47,967	5
24	0,44	0,58	0,53	0,52	0,28	6,48	5,97	6,12	6,19	0,34	85,3	85,3	85,8	85,5	3,4
25	< 0,050	< 0,050	< 0,050	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	0,0531	0,0523	0,0526	0,0527	-	7,3848	6,9452	7,4121	7,2474	-	96,289	100,87	99,127	98,763	-
27	-	-	-	-	-	5,1178	5,5192	5,2868	5,3	1,8	98,5	97,9	95,3	97	1,56
28	<0,13	<0,13	<0,13	-	-	0,22	0,22	0,28	0,25	0,0008	110,4	114,01	120,16	122,08	5,41
29	< 0,50	< 0,50	< 0,50	< 0,50	0,02	8,59	8,63	8,75	8,66	-	79	86	77	81	-
30	0	0	0	0	-	6,72	6,762	7,244	6,9087	-	76,645	76,722	80,245	77,871	-
31	-	-	-	<0,1	-	-	-	-	-	-	99	100	99	99	7
32	< 0,100	< 0,100	< 0,100	< 0,100	0,027	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	7,48	7,53	7,44	7,48	0,52	96,1	95,9	95,4	95,8	6,8

APÊNDICE F2 – continuação.

Lab nº	Al (mg/kg)					Br (mg/kg)					Ca (mg/kg)					Cs (mg/kg)					Hf (mg/kg)				
	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U
2	-	-	-	-	-	15,46	15,56	15,60	15,54	1,20	-	-	-	-	-	0,214	0,168	0,208	0,197	0,022	0,133	0,126	0,158	0,139	0,020
3	-	-	-	-	-	13,6	14,4	13,9	14	1,073	-	-	-	-	-	0,185	0,183	0,175	0,181	0,014	0,136	0,138	0,134	0,136	0,01
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	402,4	381,4	361,9	381,9	64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	337,65	354,31	345,98	336,3	35,82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	340,46	336,16	338,31	323,6	27,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	7,08	6,07	6,97	6,71	1,27	-	-	-	-	-	2252,1	2287,5	961,0	1833,5	118,81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	15,2	15,4	15,1	15,2	1,0	-	-	-	-	-	0,186	0,189	0,191	0,189	0,014	0,142	0,144	0,147	0,144	0,010

Lab nº	Li (mg/kg)					Mo (mg/kg)					Ni (mg/kg)					P(mg/kg)					Rb (mg/kg)				
	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18,6	17,8	19,5	18,6	1,58
3	-	-	-	-	-	1,585	1,949	1,665	1,733	0,252	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16,9	17,6	16,3	17,0	1,413
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<30	<30	<30	<30	-	9327,6	10041	7720,8	9029,8	2284,3	18	18	17	18	3
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9261	9191,8	9226,4	8968,2	189,84	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9234,6	9174,5	9204,5	8804,4	282,56	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,57	0,51	0,47	0,52	0,09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5480	5405	5387	5424	60	-	-	-	-	-
26	0,0110	0,0073	0,0084	0,0089	-	-	-	-	-	-	0,2793	0,2531	0,2117	0,2480	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	1,8	1,7	1,8	1,8	-	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18,1	18,2	17,9	18	1,3
33	-	-	-	-	-	1,99	2,02	2,13	2,05	0,16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18,6	18,8	18,6	18,7	1,4

Lab nº	S (mg/kg)					Sb (mg/kg)					Sr (mg/kg)					U (mg/kg)				
	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U	R 1	R 2	R 3	Media	U
3	-	-	-	-	-	0,036	0,043	0,039	0,039	0,005	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	5594	5945	4569	5369	1459	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	4006	4100	4050	4052	80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0328	0,0309	0,0312	0,0316	-
29	-	-	-	-	-	<0,15	<0,15	<0,15	<0,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,74	0,73	0,73	0,73	0,05	-	-	-	-	-

APÊNDICE G – Métodos utilizados pelos participantes para a determinação dos elementos na comparação interlaboratorial.

Lab	As	Cd	Cl	Co	Cr	Cu	Fe	Hg	K	Mg	Mn	Na	Pb	Se	Zn
1	ICP MS	ICP MS	-	ICP MS	ICP MS	ICP MS	ICP MS	ICP MS	ICP MS	ICP MS	ICP MS	ICP MS	ICP MS	ICP MS	ICP MS
2	INAA	-	-	INAA	-	-	INAA	-	INAA	-	-	INAA	-	INAA	INAA
3	k0 INAA	-	-	k0 INAA	-	-	k0 INAA	k0 INAA	k0 INAA	-	-	k0 INAA	-	k0 INAA	k0 INAA
4	k0 NAA	k0 NAA	k0 NAA	k0 NAA	k0 NAA	k0 NAA	k0 NAA	k0 NAA	k0 NAA	k0 NAA	k0 NAA	k0 NAA	-	k0 NAA	k0 NAA
5	TXRF	TXRF	TXRF	TXRF	TXRF	TXRF	TXRF	-	TXRF	-	TXRF	-	TXRF	TXRF	TXRF
8	-	-	-	-	-	-	ICP OES	-	ICP OES	ICP OES	ICP OES	ICP OES	-	-	ICP OES
10	-	ICP MS	-	-	-	-	-	DMA-80	-	-	-	-	ICP MS	-	-
11	ICP OES	ICP OES	-	-	-	-	ICP OES	TDA AAS	-	ICP OES	ICP OES	ICP OES	-	-	-
12	ICP MS	-	INAA	INAA	INAA	ICP MS	INAA	-	INAA	INAA	INAA	INAA	-	INAA	INAA
13	ICP MS	ICP MS	-	ICP AES	ICP AES	ICP MS	ICP AES	-	AA	ICP AES	ICP AES	AA	ICP MS	GFAAS	ICP AES
14	k0 INAA	-	k0 INAA	k0 INAA	-	-	k0 INAA	-	k0 INAA	k0 INAA	k0 INAA	k0 INAA	-	k0 INAA	k0 INAA
15	-	ICP OES	-	ICP OES	-	ICP OES	ICP OES	-	ICP OES	ICP OES	ICP OES	ICP OES	-	-	ICP OES
16	-	-	-	-	-	-	ICP OES	-	ICP OES	ICP OES	-	ICP OES	-	-	ICP OES
17	-	-	-	-	-	-	ICP OES	-	ICP OES	ICP OES	-	ICP OES	-	-	ICP OES
18	ICP MS	ICP MS	-	ICP MS	ICP MS	ICP MS	ICP MS	ICP MS	ICP MS	ICP MS	ICP MS	ICP MS	ICP MS	ICP MS	ICP MS
19	ICP OES	ICP OES	-	ICP OES	ICP OES	ICP OES	ICP OES	ICP OES	ICP OES	ICP OES	ICP OES	ICP OES	ICP OES	ICP OES	ICP OES
20	GF AAS	GF AAS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	ICP OES	-	ICP OES	-	-	-	-	ICP OES	-	-	-	-
22	ICP	ICP	-	ICP	ICP	ICP	ICP	ICP	ICP	ICP	ICP	ICP	ICP	ICP	ICP
23	ICP MS	ICP MS	IC	ICP MS	ICP MS	ICP MS	ICP MS	ICP MS	ICP MS	ICP MS	ICP MS	ICP MS	ICP MS	ICP MS	ICP MS
24	ICP MS	ICP MS	-	ICP OES	ICP MS	ICP MS	ICP OES	CVAAS	ICP OES	ICP OES	ICP OES	ICP OES	ICP MS	ICP MS	ICP OES
25	GF AAS	GF AAS	-	-	-	-	-	CV-AAS	-	-	-	-	GF AAS	-	-
26	ICP MS	ICP MS	-	ICP MS	-	ICP MS	ICP MS	-	-	ICP MS	ICP MS	ICP MS	ICP MS	ICP MS	ICP MS
27	-	GFAAS	-	-	-	MP-AES	MP-AES	CV-AAS	MP-AES	MP-AES	MP-AES	MP-AES	-	GFAAS	FAAS
28	GF AAS	FAAS	-	FAAS	FAAS	FAAS	FAAS	GF AAS	-	FAAS	FAAS	-	FAAS	GF AAS	FAAS
29	ICP MS	ICP MS	-	ICP OES	ICP OES	ICP OES	ICP OES	ICP MS	ICP OES	ICP OES	ICP OES	ICP OES	ICP MS	ICP MS	ICP OES
30	ICP OES	ICP OES	-	ICP OES	ICP OES	ICP OES	ICP OES	ICP OES	ICP OES	ICP OES	ICP OES	ICP OES	ICP OES	ICP OES	ICP OES
31	-	ICP MS	-	-	-	-	ICP MS	-	ICP MS	ICP MS	ICP MS	ICP MS	ICP MS	-	ICP MS
32	GF AAS	GF AAS	-	-	-	-	-	TDA AAS	-	-	-	-	GF AAS	-	-
33	k0 INAA	-	-	k0 INAA	-	-	k0 INAA	CV AAS	k0 INAA	-	-	k0 INAA	-	k0 INAA	k0 INAA

APÊNDICE H – Gráficos de distribuição de densidade de Kernel para os resultados da comparação interlaboratorial.

APÊNDICE H1 – Resultados informados para o MRC IPEN 001-Trace element in fish tissue.

APÊNDICE H1 – continuação

APÊNDICE H2 – Resultados informados para o candidate a MR IPEN RB1-Trace element in Bovine Kidney.

APÊNDICE H2 – continuação.

APÊNDICE I – Resultados informados pelos participantes na comparação interlaboratorial, valor de consenso e valor certificado, quando disponível. Valores em vermelho não foram considerados nos cálculos do valor de consenso e incerteza associada.

I1 – Resultados para o MRC IPEN 001-Trace element in fish tissue.

APÊNDICE II – continuação

APÊNDICE II – continuação

APÊNDICE I1 – continuação

APÊNDICE I2 – Resultados para o candidato a material de referência IPEN RB1-Trace element in bovine kidney

APÊNDICE I2 – continuação

APÊNDICE I2 – continuação

APÊNDICE I2 – continuação

APÊNDICE J – Valores de z e zeta obtidos pelos laboratórios participantes na comparação interlaboratorial de certificação.

J1 – Valores de z e zeta obtidos para o material de referência IPEN 001-Trace element in fish tissue.

Lab. nº	As				Cd				Cl				Co				Cu			
	Media	U	z	Zeta	Media	U	z	Zeta	Media	U	z	Zeta	Media	U	z	Zeta	Media	U	z	Zeta
1	7,0	-	1,4	-	0,0187	-	-0,2	-	-	-	-	-	0,11	-	-1,6	-	1,19	-	0,1	-
2	5,8	0,2	-0,1	-0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	0,18	0,02	1,2	1,9	-	-	-	-
3	5,5	0,4	-0,5	-1,6	-	-	-	-	-	-	-	-	0,13	0,01	-0,7	-1,6	-	-	-	-
4	6,1	0,4	0,2	0,7	-	-	-	-	5630	263,00	0,8	1,4	0,15	0,01	0,0	0,0	-	-	-	-
5	5,2	0,5	-0,9	-2,3	-	-	-	-	146	82	-4,1	-7,4	-	-	-	-	1,50	0,5	1,2	1,3
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	0,0042	0,0007	-2,6	-14,9	3367	150	-1,2	-2,2	-	-	-	-	-	-	-	-
11	4,1	0,8	-2,5	-4,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	5,6	0,2	-0,4	-1,7	-	-	-	-	4737	824,080	0,0	0,0	0,16	0,004	0,6	1,3	-	-	-	-
13	5,3	0,8	-0,8	-1,3	0,26	0,042	40,5	11,6	-	-	-	-	-	-	-	-	3,01	0,6	6,3	5,8
14	5,8	0,3	-0,07	-0,3	-	-	-	-	4869	262,92	0,1	0,2	0,15	0,02	0,1	0,3	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	10,4	2,3	6,1	4,0	0,19	0,09	27,8	3,7	-	-	-	-	0,28	0,03	5,4	7,5	3,23	0,8	7,0	5,4
19	3,9	0,0002	-2,8	-14,9	-	-	-	-	-	-	-	-	0,04	0,01	-4,4	-9,8	0,243	0,008	-3,1	-26,0
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,10	-	-0,2	-
22	5,8	0,1	-0,1	-0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,44	0,1	1,0	4,6
23	2,9	0,3	-4,1	-16,4	< 0,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,65	0,1	-1,7	-8,9
24	5,2	0,2	-1,0	-4,0	0,26	0,24	40,0	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-	1,08	0,3	-0,3	-0,5
25	5,0	-	-1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	6,5	-	0,8	-	0,0186	-	-0,2	-	-	-	-	-	0,13	-	-0,8	-	1,32	-	0,6	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	6,2	0,2	0,3	1,5	< 0,150	0,006	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,21	-	0,2	-
30	4,8	-	-1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	0,019	0,008	-0,2	-0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	2,7	0,1	-4,4	-23,2	< 0,013	0,091	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	5,8	0,4	-0,1	-0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	0,13	0,01	-0,9	-1,9	-	-	-	-

APÊNDICE J1 – continuação.

Lab. nº	Fe				Hg				K				Mg			
	Media	U	z	Zeta	Media	U	z	Zeta	Media	U	z	Zeta	Media	U	z	Zeta
1	12,5	-	-0,4	-	0,95	-	0,6	-	12266	-	-0,1	-	1084	-	0,1	-
2	15,9	4,8	0,9	1,0	-	-	-	-	13100	2000	0,2	0,5	-	-	-	-
3	17,0	2,0	1,3	3,0	0,82	0,10	-0,5	-0,8	12647	1151	0,03	0,1	-	-	-	-
4	14,9	2,0	0,5	1,2	0,98	0,05	0,8	1,5	13400	600	0,3	2,2	1243	60	1,8	4,1
5	15,4	2,0	0,7	1,6	-	-	-	-	8893	931	-1,3	-7,0	-	-	-	-
8	112,1	-	38,4	-	-	-	-	-	10770	-	-0,6	-	1671	-	6,3	-
10	-	-	-	-	0,98	0,34	0,8	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-
11	14,1	2,1	0,2	0,5	1,00	0,35	1,0	0,6	-	-	-	-	855	104	-2,3	-3,6
12	13,1	1,8	-0,2	-0,5	-	-	-	-	12245	884	-0,1	-0,6	1075	158	0,03	0,03
13	46,9	6,5	13,0	10,1	-	-	-	-	12676	1850	0,04	0,1	1008	142	-0,7	-0,8
14	12,1	0,8	-0,6	-2,2	-	-	-	-	-	-	-	-	1082	171	0,1	0,1
15	14,4	-	0,3	-	-	-	-	-	7631	-	-1,8	-	996	-	-0,8	-
16	10,3	1,3	-1,3	-3,9	-	-	-	-	5335	97	-2,6	-28,9	723	145	-3,7	-4,5
17	10,7	1,7	-1,1	-2,8	-	-	-	-	5578	222	-2,5	-25,9	745	141	-3,4	-4,3
18	146,4	101,4	51,8	2,6	0,98	0,12	0,8	1,2	14208	2552	0,6	1,3	1667	385	6,3	3,1
19	1,0	0,003	-4,9	-23,8	0,02	-	-7,2	-	4903	0,002	-2,7	-31,2	299	0,004	-8,1	-26,0
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,25	0,3	-11,2	-35,9
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	2,2	1,0	-4,4	-15,7	1,18	0,003	2,5	5,0	13125	10	0,2	2,3	1523	10	4,7	15,0
23	6,4	0,5	-2,8	-12,2	0,36	0,14	-4,4	-5,7	6170	142	-2,3	-25,0	501	55	-6,0	-14,1
24	11,3	3,4	-0,9	-1,3	0,44	0,05	-3,7	-6,8	12433	206	-0,04	-0,5	992	30	-0,8	-2,4
25	-	-	-	-	0,87	-	-0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	12,1	-	-0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1203	-	1,4	-
27	14,1	1,1	0,2	0,7	1,10	0,09	1,9	2,9	12312	423	-0,1	-0,8	1093	39	0,2	0,6
28	50,7	17,6	14,5	4,2	0,23	0,0002	-5,5	-10,8	-	-	-	-	253	9	-8,6	-27,3
29	13,7	-	0,1	-	0,97	-	0,8	-	11685	-	-0,3	-	1069	-	-0,03	-
30	13,9	-	0,1	-	0,62	-	-2,2	-	13737	-	0,4	-	1058	-	-0,1	-
31	21,0	6,0	2,9	2,4	-	-	-	-	13600	1400	0,4	1,4	1080	80	0,1	0,2
32	-	-	-	-	1,01	0,02	1,1	2,1	-	-	-	-	-	-	-	-
33	12,4	1,0	-0,4	-1,6	0,78	0,05	-0,9	-1,6	12250	940	-0,1	-0,6	-	-	-	-

APÊNDICE J1 – continuação.

Lab. nº	Mn				Na				Se				Zn			
	Mediã	U	z	Zeta	Mediã	U	z	Zeta	Mediã	U	z	Zeta	Mediã	U	z	Zeta
1	-	-	-	-	4564	-	-0,6	-	4,15	-	2,0	-	16,8	-	0,1	-
2	-	-	-	-	4970	400	0,5	0,9	2,07	0,8	-1,4	-2,3	17,3	1,4	0,4	0,9
3	-	-	-	-	4740	388	-0,1	-0,2	2,80	0,2	-0,2	-1,1	17,0	1,9	0,2	0,4
4	0,42	0,06	0,6	1,5	4963	240	0,5	1,3	3,20	0,2	0,4	2,0	18,0	1,2	0,9	2,1
5	-	-	-	-	-	-	-	-	3,24	0,5	0,5	1,1	17,7	4,0	0,7	0,5
8	15	-	187,9	-	3760	-	-2,8	-	-	-	-	-	17,9	-	0,8	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	0,3	0,04	-1,0	-3,3	4260	513	-1,4	-1,9	-	-	-	-	-	-	-	-
12	0,3	0,2	-0,5	-0,5	4699	65	-0,2	-1,0	2,82	0,1	-0,2	-1,6	16,6	0,5	-0,1	-0,3
13	-	-	-	-	6029	867	3,5	2,9	1,85	0,3	-1,8	-7,5	34,9	4,4	12,2	8,3
14	-	-	-	-	4503	234	-0,8	-2,0	2,73	0,2	-0,4	-2,0	17,1	0,9	0,3	0,9
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10,7	-	-4,0	-
16	-	-	-	-	2338	31	-6,8	-32,9	-	-	-	-	11,6	0,9	-3,4	-10,2
17	-	-	-	-	2438	52	-6,5	-30,3	-	-	-	-	11,5	1,4	-3,5	-6,9
18	1,0	0,05	8,6	24,3	6554	1121	4,9	3,1	5,54	1,4	4,3	3,7	25,0	5,7	5,6	2,9
19	0,07	0,008	-3,9	-21,6	1647	0,002	-8,7	-43,2	0,47	0,003	-4,1	-35,5	0,9	0,01	-10,5	-63,1
20	0,03	0,001	-4,4	-25,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	0,60	-	3,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	7056	10	6,3	31,4	13,4	0,2	17,2	85,6	23,7	2,0	4,7	6,9
23	-	-	-	-	2381	25	-6,7	-32,5	1,93	0,2	-1,7	-9,9	9,3	0,9	-4,9	-14,3
24	-	-	-	-	4710	201	-0,2	-0,5	2,98	0,3	0,05	0,2	15,0	3,4	-1,1	-1,0
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	0,37	-	0,02	-	4006	-	-2,1	-	3,08	-	0,2	-	17,7	-	0,7	-
27	-	-	-	-	4738	205	-0,1	-0,3	0,83	0,1	-3,5	-27,3	16,0	2,6	-0,4	-0,5
28	-	-	-	-	-	-	-	-	1,81	0,0002	-1,9	-16,3	26,8	1,2	6,8	16,1
29	0,41	-	0,5	-	4821	-	0,1	-	3,80	-	1,4	-	16,4	-	-0,2	-
30	1,79	-	18,2	-	4140	-	-1,8	-	2,84	-	-0,2	-	13,5	-	-2,1	-
31	0,41	0,05	0,5	1,4	4700	500	-0,2	-0,3	-	-	-	-	16,5	2,0	-0,1	-0,1
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	4761	336	-0,04	-0,1	2,94	0,2	-0,02	-0,1	16,6	1,2	-0,03	-0,1

J2 – Valores de z e zeta obtidos para o candidato a material de referência IPEN RB1-Trace element in bovine kidney

Lab. n°	As				Cd				Co				Cu				Fe				Hg			
	Media	U	z	Zeta	Media	U	z	Zeta	Media	U	z	Zeta	Media	U	z	Zeta	Media	U	z	Zeta	Media	U	z	Zeta
1	0,135	-	-1,6	-	0,150	-	-0,1	-	1,6	-	-1,0	-	16,9	-	-0,4	-	226	-	-1,6	-	<0,035	-	-	-
2	0,189	0,062	-0,9	-1,7	-	-	-	-	1,8	0,2	0,2	0,3	-	-	-	-	272	26	0,5	0,8	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	1,8	0,2	-0,2	-0,3	-	-	-	-	249	19	-0,5	-1,0	-	-	-	-
4	0,190	0,030	-0,9	-2,2	-	-	-	-	2,0	0,1	0,7	1,6	18,0	5,0	0,2	0,2	274	14	0,6	1,4	-	-	-	-
5	0,279	0,072	0,2	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	20,0	3,1	1,2	1,4	257	60	-0,1	-0,1	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	562	-	14,3	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	0,074	0,012	-4,4	-8,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,034	0,01	0,0	0,0
11	-	-	-	-	0,130	0,030	-1,3	-1,4	-	-	-	-	-	-	-	-	286	34	1,2	1,4	0,051	0,02	1,6	1,6
12	0,222	0,006	-0,5	-1,4	-	-	-	-	1,71	0,05	-0,4	-1,0	18,2	0,2	0,3	0,8	261	7	0,03	0,1	-	-	-	-
13	0,918	0,128	8,2	9,2	0,364	0,043	11,8	9,4	-	-	-	-	21,7	3,2	2,1	2,3	245	40	-0,8	-0,8	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	1,9	0,2	0,3	0,5	-	-	-	-	272	19	0,5	1,0	-	-	-	-
15	-	-	-	-	0,883	-	40,8	-	2,7	-	3,9	-	16,2	-	-0,7	-	278	-	0,8	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	195	3	-3,1	-9,6	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	189	4	-3,4	-10,4	-	-	-	-
18	1,516	0,760	15,7	3,3	0,426	0,030	15,2	16,5	3,6	0,5	7,8	7,3	33,9	5,2	8,5	6,1	514	12	12,0	28,4	0,292	0,070	25,1	7,3
19	0,266	0,0002	0,03	0,1	0,104	0,0002	-2,7	-6,9	1,18	0,01	-2,7	-7,4	5,4	0,01	-6,3	-16,0	147	0,003	-5,4	-17,2	-	-	-	-
20	0,264	0,024	0,0	0,0	0,158	0,008	0,3	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	1,4	-	-1,9	-	19,5	-	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	0,249	0,020	5,4	7,9	2,4	0,1	2,5	6,0	27,5	0,1	5,2	13,0	373	1	5,3	16,9	0,050	0	1,6	3,2
23	-	-	-	-	0,163	0,008	0,6	1,3	0,8	0,1	-4,2	-10,6	8,7	0,1	-4,6	-11,7	106	8	-7,3	-19,9	0,02	0	-1,5	-2,9
24	0,830	0,240	7,1	4,6	0,340	0,260	10,4	1,4	2,0	0,6	0,8	0,6	13,8	0,6	-1,9	-4,6	271	14	0,5	1,1	-	-	-	-
25	0,340	-	1,0	-	0,139	-	-0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,023	-	-1,0	-
26	0,225	-	-0,5	-	0,142	-	-0,6	-	1,6	-	-1,0	-	17,2	-	-0,2	-	260	-	-0,03	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	0,130	0,009	-1,3	-2,7	-	-	-	-	19,2	0,8	0,8	1,9	284	15	1,1	2,4	0,03	0,01	0,0	0,0
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19,7	9,3	1,1	0,4	332	116	3,4	1,2	-	-	-	-
29	0,287	0,009	0,3	0,8	0,171	0,006	1,0	2,4	1,0	-	-3,4	-	14,7	-	-1,5	-	229	-	-1,5	-	0,06	-	2,0	-
30	-	-	-	-	0,137	-	-0,8	-	1,4	-	-1,5	-	17,2	-	-0,2	-	223	-	-1,7	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	0,166	0,017	0,7	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	281	35	1,0	1,1	-	-	-	-
32	0,193	0,068	-0,9	-1,6	0,155	0,091	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,030	0,016	-0,4	-0,4
33	-	-	-	-	-	-	-	-	1,8	0,1	0,2	0,3	-	-	-	-	257	18	-0,2	-0,3	0,027	0,002	-0,7	-1,4

APÊNDICE J2 – continuação.

Lab. nº	Fe				Hg				K				Mg			
	Media	U	z	Zeta	Media	U	z	Zeta	Media	U	z	Zeta	Media	U	z	Zeta
1	226	-	-1,6	-	<0,035	-	-	-	10127	-	-1,0	-	685	-	-0,3	-
2	272	26	0,5	0,8	-	-	-	-	13100	1920	1,0	1,4	-	-	-	-
3	249	19	-0,5	-1,0	-	-	-	-	11882	1176	0,2	0,3	-	-	-	-
4	274	14	0,6	1,4	-	-	-	-	12467	700	0,6	1,4	813	87	1,6	2,1
5	257	60	-0,1	-0,1	-	-	-	-	9580	1913	-1,3	-1,9	-	-	-	-
8	562	-	14,3	-	-	-	-	-	11200	-	-0,3	-	1461	-	11,2	-
10	-	-	-	-	0,034	0,012	0,0	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-
11	286	34	1,2	1,4	0,051	0,019	1,6	1,6	-	-	-	-	612	76	-1,4	-2,1
12	261	7	0,03	0,1	-	-	-	-	12994	1375	0,9	1,6	663	35	-0,7	-1,5
13	245	40	-0,8	-0,8	-	-	-	-	11199	1700	-0,3	-0,4	651	103	-0,9	-1,0
14	272	19	0,5	1,0	-	-	-	-	10717	793	-0,6	-1,4	727	115	0,3	0,3
15	278	-	0,8	-	-	-	-	-	7282	-	-2,9	-	708	-	0,0	-
16	195	3	-3,1	-9,6	-	-	-	-	5404	45	-4,1	-12,2	501	101	-3,1	-3,6
17	189	4	-3,4	-10,4	-	-	-	-	5271	237	-4,2	-12,2	496	101	-3,2	-3,8
18	514	12	12,0	28,4	0,292	0,070	25,1	7,3	14249	590	1,7	4,5	1266	47	8,3	16,2
19	147	0,003	-5,4	-17,2	-	-	-	-	6054	0	-3,7	-11,0	530	0,004	-2,7	-7,0
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	373	1	5,3	16,9	0,050	0,003	1,6	3,2	13900	10	1,5	4,5	1138	10	6,4	16,7
23	106	8	-7,3	-19,9	0,019	0,003	-1,5	-2,9	5654	300	-3,9	-11,3	337	40	-5,5	-11,5
24	271	14	0,5	1,1	-	-	-	-	11609	204	-0,002	-0,005	681	17	-0,4	-1,0
25	-	-	-	-	0,023	-	-1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	260	-	-0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	860	-	2,3	-
27	284	15	1,1	2,4	0,034	0,0082	0,0	0,0	11614	371	0,002	0,005	796	29	1,3	3,0
28	332	116	3,4	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	255	9	-6,8	-17,7
29	229	-	-1,5	-	0,055	-	2,0	-	9315	-	-1,5	-	684	-	-0,4	-
30	223	-	-1,7	-	-	-	-	-	15292	-	2,4	-	784	-	1,1	-
31	281	35	1,0	1,1	-	-	-	-	12600	1300	0,7	1,2	750	50	0,6	1,2
32	-	-	-	-	0,030	0,016	-0,4	-0,4	-	-	-	-	-	-	-	-
33	257	18	-0,2	-0,3	0,027	0,002	-0,7	-1,4	11644	852	0,02	0,05	-	-	-	-

APÊNDICE J2 – continuação.

Lab. nº	Mn				Na				Se				Zn			
	Media	U	z	Zeta	Media	U	z	Zeta	Media	U	z	Zeta	Media	U	z	Zeta
1	4,2	-	-1,8	-	7536	-	-2,5	-	9,0	-	2,2	-	86,6	-	-1,8	-
2	-	-	-	-	8810	700	0,4	0,5	5,5	1,9	-2,5	-1,9	95,8	7,0	0,0	0,0
3	-	-	-	-	8672	639	0,1	0,1	7,0	0,5	-0,4	-0,9	92,0	7,1	-0,8	-1,0
4	6,0	0,3	0,9	2,2	9033	467	0,9	1,4	7,9	0,4	0,7	1,6	100,3	5,0	0,9	1,5
5	5,7	1,6	0,5	0,4	-	-	-	-	7,8	2,0	0,6	0,4	96,3	12,0	0,1	0,1
8	23,0	-	25,4	-	5720	-	-6,5	-	-	-	-	-	113,4	-	3,5	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	4,8	0,6	-0,8	-1,5	7991	956	-1,4	-1,3	-	-	-	-	-	-	-	-
12	5,3	0,4	-0,1	-0,2	8868	113	0,5	1,4	7,2	0,2	-0,2	-0,6	93,8	2,6	-0,4	-0,9
13	4,6	0,7	-1,2	-1,8	9503	1400	2,0	1,2	6,2	1,0	-1,5	-2,0	98,5	15,3	0,5	0,3
14	6,4	1,1	1,4	1,7	8882	462	0,6	0,9	7,6	0,5	0,3	0,6	100,6	5,2	0,9	1,5
15	4,9	-	-0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	91,2	-	-0,9	-
16	-	-	-	-	3926	41	-10,5	-29,0	-	-	-	-	67,3	4,4	-5,7	-10,2
17	-	-	-	-	3830	199	-10,8	-25,4	-	-	-	-	64,3	3,9	-6,3	-12,1
18	12,9	1,7	10,8	8,4	12029	386	7,6	13,5	15,2	2,2	10,5	7,0	153,1	22,9	11,4	4,9
19	4,12	0,01	-1,8	-5,1	3322	0	-11,9	-33,0	-	0,0	-9,9	-27,5	69,2	0,01	-5,3	-15,3
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	5,8	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	6,0	1,0	0,8	1,0	14950	10	14,2	39,2	15,8	0,2	11,4	29,6	159,4	2,0	12,7	31,7
23	2,6	0,3	-4,1	-9,5	3977	60	-10,4	-28,4	3,6	0,3	-5,1	-12,4	48,0	5,0	-9,5	-15,7
24	-	-	-	-	8589	115	-0,1	-0,2	6,2	0,3	-1,6	-3,7	85,5	3,4	-2,1	-4,2
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	5,4	-	0,1	-	7464	-	-2,6	-	7,2	-	-0,2	-	98,8	-	0,6	-
27	5,9	0,2	0,7	1,8	8490	416	-0,3	-0,5	5,3	1,8	-2,8	-2,2	97,0	1,6	0,2	0,6
28	9,5	1,1	5,9	6,7	-	-	-	-	0,3	0,001	-9,6	-26,6	122,1	5,4	5,2	8,2
29	5,3	-	-0,2	-	7313	-	-3,0	-	8,7	-	1,7	-	81,0	-	-3,0	-
30	6,4	-	1,5	-	7547	-	-2,4	-	6,9	-	-0,6	-	77,9	-	-3,6	-
31	5,8	0,4	0,6	1,3	8300	800	-0,7	-0,8	-	-	-	-	99,0	7,0	0,6	0,8
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	8809	622	0,4	0,5	7,5	0,5	0,2	0,3	95,8	6,8	0,0	0,0

APÊNDICE K – Resultados utilizados para estimar o valor de consenso do candidato a material de referência IPEN RB1 Trace Elements in Bovine Kidney ordenados segundo a metodologia analítica utilizada pelos participantes.

APÊNDICE K – continuação

APÊNDICE K – continuação

APÊNDICE L – Contribuição das fontes de incerteza das diferentes etapas da caracterização (u_{car} , u_{bb} e u_{lts}) na estimativa das incertezas padrão combinadas (u_{MRC}) para os valores de concentração dos elementos no candidato a material de referência IPEN RB1 Trace Elements in Bovine Kidney.

APÊNDICE L – continuação

ANEXO A – Certificado do material de referência IPEN 001-Trace element in fish tissue

REPORT OF ANALYSIS
TRACE ELEMENTS IN FISH TISSUE
PREPARED UNDER IAEA RLA 2/014 PROJECT

Fish is widely consumed in many parts of the world because of its high nutritional value. However water pollution leads to fish contamination with toxic elements, from many sources, such as industrial and domestic waste water. The analysis of essential and toxic elements present in fish tissue is very important if public health and economic issues are concerned. This fish tissue Reference Material (RM) can be used for the development and validation of analytical methods for determination of trace elements in fish and seafood samples, and to ensure the reliability and validity of analytical results.

The fish tissue material was prepared under IAEA RLA 2/014 Technical Cooperation Project “Improvement of analytical quality through proficiency testing and certification of matrix reference materials using nuclear and related analytical techniques in the Latin American nuclear analytical techniques network- ARCAL XCVII”.

The preparation and certification of this reference material was carried out according to the requirements of ISO Guides 30 series [1-4].

The fish species was chosen taking into account production criteria (produced quantity), health safety and the interest of the other Latin American countries. Whitemouth croaker, *Micropogonias furnieri*, was chosen due to it represents the second fish-scale production in Brazil and it is widely distributed and consumed on the Latin American countries.

About 300 kg of Whitemouth croaker fish (*Micropogonias furnieri*) were purchased from a fishery industry. The fish were collected in Itajuba City, in the coast of Santa Catarina state (SC), southern of Brazil and were then transported to the Neutron Activation Laboratory of the Nuclear and Energy Research Institute (LAN, IPEN - CNEN/SP). Each fish (without head and gutted) weighed about 900 g. The edible parts were then separated and cut in small pieces using ceramic knives. After that, the fish tissues (120 kg) were frozen in a freeze-dried food industry. In this process, about 80% mass was lost.

After freeze-drying, the total remaining material (approximately 26 kg) was milled in a planetary ball mill with tungsten carbide jars using zirconium oxide balls. The milled material was then sieved in an Analysette 3 micro-process sieve shaker with polyester 105 μm sieves. Thus, the powdered material was again submitted to the freeze-drying process using a Modulyo Model freeze-dryer. The fish material was homogenized in a 30 L-Y type 201/30 MO Model homogenizer for 72 hours and the fish material was bottled in 534 bottles with approximately 25g each. The bottles were gamma-ray irradiated at 5 kGy dose at the ^{60}Co irradiation facility at IPEN - CNEN/SP in order to enhance the stability of the material.

The fish material homogeneity was evaluated using statistically stable analytical method under repeatability conditions of a representative number of bottles of the fish reference material.

For the short and long-term stability studies, the isochronous design was also adopted. No trend was detected due to short term stability and therefore it could be considered that the material is stable during the shipment at the assumed temperatures.

Ten expert laboratories from Europe, North America and Latin America participated in the characterization campaign of the fish tissue CRM. Characterization of the trace element mass fractions was based on the application of different analytical techniques, destructive and non-destructive. The collected sets of data of studied analytes were subjected to several statistical tests. Outlier tests (Dixon, Grubbs, Skewness, Kurtosis) at 95% confidence level, Directional tests (Skewness, Kurtosis), Normality test (Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors). No statistically detected outlying data was observed within the sets of reported results. The reference values in the fish tissue were derived as a consensus of all reported results estimated using the median as described in ISO 13528 [5], rounded off to the most significant number of the uncertainty. According to the ISO Guide 35 [4], the combined uncertainty associated with the reference value consists of uncertainties related to characterization (u_{char}), between bottle heterogeneity (u_{bb}) and long-term stability (u_{lst}).

Reference Values: The reference values and associated expanded uncertainty ($k = 2$) were established for As, Cd, Cu, Fe, K, Mn, Na, Se and Zn.

Information values: Due to the limited number of provided results the information value was assigned to Hg.

Indicative values: the indicative value was provided for I for a range.

Moisture content determination: The average moisture content of the material at the time of bottling was determined by drying several test portions of 1 g in an oven at 85°C for 24 hours, and was found to be approximately 3% (w/w). Since the moisture content can vary with ambient humidity and temperature, it is recommended that it should be checked prior to analysis and that all results be reported on a dry mass basis.

Instruction for use: The material homogeneity is guaranteed if a minimum test portion of 0.1 g is used. To overcome segregation effects due to storage or transportation, the material should be mixed before opening the bottle. It is recommended that the original unopened bottle be stored securely at ambient temperature in a dark and dry place. It is recommended to avoid direct exposure to sunlight or to a source of heat.

The issue date of this fish tissue material is June 2016, the analytical results were finalized in 2012. Based on experience with similar materials and previously performed stability studies the reference values of the studied elements in this reference material are valid at least until June 2019, provided the original bottle is handled and stored in accordance with the provided instructions.

The producer makes no warranties, expressed or implied, with respect to the data contained in this report and shall not be liable for any damage that may result from the use of such data.

Report Issue Data: June 2016

Vera A. Maihara and Edson G. Moreira

Neutron Activation Analysis Laboratory

Research Reactor Center- CRPq

Nuclear and Energy Institute – IPEN –CNEN/SP - Brazil

REFERENCE VALUES FOR TRACE ELEMENTS MASS FRACTIONS AND
THEIR EXPANDED UNCERTAINTY ($K=2$) IN THE FISH TISSUE CRM

Element	Reference Value ¹ [mg kg ⁻¹]	Expanded Uncertainty ² [mg kg ⁻¹]
As	5.90	0.27
Cd	0.020	0.002
Cu	1.16	0.07
Fe	13.55	1.05
Hg ³	0.88	0.12
K	12555	490
Mn	0.37	0.027
Na	4775	145
Se	2.95	0.14
Zn	16.65	0.50

¹The value is the median of accepted results. The certified values are reported on dry mass basis and are traceable to the SI;

² Expanded uncertainty with a coverage factor $k = 2$ according to the Guide to the Expression of Uncertainty of Measurement (GUM), corresponding to the level of confidence of about 95 %;

³Information value.

INDICATIVE VALUE FOR I IN THE FISH TISSUE CRM

Element	Indicative Value Range [mg kg ⁻¹]
I	1.3 – 1.6

REFERENCES

- [1] ISO Guide 31:2015, Reference materials – Contents of certification and labels and accompanying documentation
- [2] ISO Guide 33:2015, Reference materials - Good practice in using reference materials.
- [3] ISO Guide 34:2009, General requirements for the competence of reference material producers.
- [4] ISO Guide 35:2006, Reference materials – General and statistical principles for certification.
- [5] ISO 13528:2015, Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison.