

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS E PRODUÇÃO DE
MATERIAIS DE REFERÊNCIA DE SUPLEMENTO
MINERAL PARA NUTRIENTES E CONTAMINANTES
INORGÂNICOS**

Patricia Helena Toniolo da Silva*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

Orientadora: Dra. Ana Rita de Araújo Nogueira

***Bolsista REUNI**

**SÃO CARLOS – SP
2011**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S586ap

Silva, Patricia Helena Toniolo da.

Avaliação de parâmetros e produção de materiais de referência de suplemento mineral para nutrientes e contaminantes inorgânicos / Patricia Helena Toniolo da Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2011.

111 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Química analítica. 2. Material de referência. 3. Suplementos minerais. 4. Teste de estabilidade. 5. Teste de homogeneidade. I. Título.

CDD: 543 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Mestrado Acadêmico

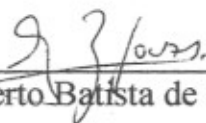
*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado acadêmico da candidata **Patricia Helena Toniolo da Silva**, realizada em 09 de setembro de 2011:*



Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira



Profa. Dra. Cassiana Seimi Nomura



Dr. Gilberto Batista de Souza

**Dedico este trabalho à minha querida tia
Ana Ap. Pires Minotto, por sempre estar
ao meu lado e nunca me deixar desistir e
ao meu querido marido Danilo Muniz
da Silva, por ser o perfume das flores do
manacá nas minhas manhãs de
Setembro.**

*Ando devagar
Porque já tive pressa
E levo esse sorriso
Porque já chorei demais*

*Hoje me sinto mais forte,
Mais feliz, quem sabe
Só levo a certeza
De que muito pouco sei,
Ou nada sei*

*Conhecer as manhas
E as manhãs
O sabor das massas
E das maçãs*

*É preciso amor
Pra poder pulsar
É preciso paz pra poder sorrir
É preciso a chuva para florir*

*Penso que cumprir a vida
Seja simplesmente
Compreender a marcha
E ir tocando em frente*

*Como um velho boiadeiro
Levando a boiada
Eu vou tocando os dias
Pela longa estrada, eu vou
Estrada eu sou*

*Todo mundo ama um dia,
Todo mundo chora
Um dia a gente chega
E no outro vai embora*

*Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si
Carrega o dom de ser capaz
E ser feliz*

Tocando em Frente Composição: Almir Sater e Renato Teixeira

AGRADECIMENTOS

Agradeço, à Prof. Dra. Ana Rita de Araújo Nogueira pela orientação, amizade, paciência, oportunidade e exemplo em todos estes anos. A ela toda a minha admiração, carinho e respeito.

Ao Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega pela amizade e contribuições de sempre para meu crescimento acadêmico.

Ao Prof. Dr. Edenir R. Pereira Filho pela amizade e valiosas sugestões para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Gilberto Batista de Souza pela amizade, sabedoria, extrema paciência e por sempre me motivar.

Aos meus amigos do coração Eveline, Fernanda, Carlinha, Clarice, Rodolfo, Caio e Marcelo, com quem o convívio de laboratório foi mais intenso: obrigada pelo carinho e por todas as vezes que deixaram seus trabalhos de lado para me ajudar.

Aos amigos Mário, Silmara e Ana Beatriz por me dispensarem uma atenção especial no início deste trabalho, me ensinando com paciência conceitos que lhe eram triviais.

À Dra. Silvia Brondi pela amizade e incentivo.

À todos os meus amigos do Gaia pela ótima convivência e constantes contribuições para o trabalho.

Aos meus queridos pais Maria Helena e Dorival por toda a formação e carinho de sempre.

Às minhas queridas irmãs Amanda e Isabela por serem tão especiais em minha vida e sempre perdoarem a minha ausência.

Às professoras do Departamento de Química da UFSCar, Dra. Vânia Gomes Zuin, Dra. Wânia da Conceição Moreira e Dra. Rose Maria Carlos pela ajuda e compreensão quando do desenvolvimento de meu plano de monitorias para a graduação.

À Embrapa Pecuária Sudeste por todo o suporte técnico para o desenvolvimento do trabalho.

A todos os funcionários da Embrapa Pecuária Sudeste que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFSCar, em especial às secretarias Ariane, Cristina e Luciane por toda a paciência e eficiência nos trabalhos.

Ao REUNI pela bolsa concedida.

A todos que contribuíram para que este trabalho fosse desenvolvido.

Muito obrigada!

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 3.1 – Macro e micronutrientes essenciais para as espécies domésticas e suas funções..... | 18 |
| Tabela 4.1. Variáveis e níveis do planejamento fatorial | 27 |
| Tabela 4.2 Variáveis e níveis do planejamento Doehlert..... | 28 |
| Tabela 4.3 Programa de Aquecimento do Forno de Micro-ondas Anton Paar...29 | |
| Tabela 5.1. Técnica utilizada e analitos determinados..... | 32 |
| Tabela 5.2 - Parâmetros empregados na análise por espectrometria de emissão óptica com plasma plasma acoplado indutivamente..... | 33 |
| Tabela 5.3 Parâmetros utilizados nas determinações por espectrometria de absorção atômica com chama..... | 34 |
| Tabela 5.4 Parâmetros utilizados nas determinações por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite para cádmio..... | 35 |
| Tabela 5.5 Parâmetros utilizados nas determinações por espectrometria de absorção atômica com termospray e forno tubular na chama..... | 35 |
| Tabela 5.6 Parâmetros utilizados nas determinações por espectrometria de absorção atômica com tubo na chama..... | 36 |
| Tabela 5.7 Parâmetros utilizados para a determinação de arsênio por espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos..... | 37 |
| Tabela 5.8 Parâmetros utilizados nas determinações por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite para arsênio..... | 38 |
| Tabela 6.1 Limites de detecção e quantificação..... | 61 |
| Tabela 6.2 Determinação da faixa de trabalho..... | 62 |
| Tabela 6.3 Curvas em meio HNO ₃ 1% e matriz..... | 62 |
| Tabela 7.1. Resultados das repetições para o teste de homogeneidade intramostral..... | 63 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 7.2 Dados da ANOVA <i>one- way</i> para o teste de homogeneidade interamostral. | 70 |
| Tabela 7.3 Parâmetros utilizados no teste de homogeneidade interamostral..... | 74 |
| Tabela 8.1 Parâmetros utilizados para o teste de estabilidade a curto prazo..... | 83 |
| Tabela 8.2 Dados ANOVA para o teste de estabilidade a longo prazo..... | 88 |
| Tabela 9.1. Participantes do ensaio colaborativo..... | 90 |
| Tabela 9.2 Dados obtidos a partir do ensaio colaborativo..... | 91 |
| Tabela 10.1. Incertezas para cada analito..... | 101 |
| Tabela 10.2. Incertezas representadas em porcentagem..... | 101 |
| Tabela 10.3 Valor designado acompanhado da incerteza expandida para cada analito..... | 102 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 3.1 Balança Comercial do Agronegócio..... | 13 |
| Figura 3.2 Variações percentuais do índice de custo de produção de leite acumulado em 2011..... | 19 |
| Figura 4.1 Aspecto do material candidato antes da moagem (A) e depois da moagem (B) | 26 |
| Figura 5.1 Sistema para análise por injeção em fluxo para determinação de fósforo..... | 36 |
| Figura 6.1 Comparações para a determinação de sódio..... | 42 |
| Figura 6.2 Comparações para a determinação de potássio..... | 42 |
| Figura 6.3 Comparações para a determinação de cobre..... | 44 |
| Figura 6.4 Comparações para a determinação de zinco..... | 46 |
| Figura 6.5 Comparações para a determinação de ferro..... | 47 |
| Figura 6.6 Comparações para a determinação de manganês..... | 49 |
| Figura 6.7 Comparações para a determinação de magnésio..... | 59 |
| Figura 6.8 Comparações para a determinação de cálcio..... | 52 |
| Figura 6.9 Comparações para a determinação de fósforo..... | 53 |
| Figura 6.10 Comparações para a determinação de arsênio..... | 54 |
| Figura 6.11 Comparações para a determinação de cádmio..... | 55 |
| Figura 6.12 Comparações para a determinação de chumbo..... | 56 |
| Figura 6.13 Análise de componentes principais..... | 57 |
| Figura 7.1 Homogeneidade interamostral para o arsênio..... | 66 |
| Figura 7.2 Homogeneidade interamostral para o cádmio..... | 66 |
| Figura 7.3 Homogeneidade interamostral para o chumbo..... | 66 |
| Figura 7.4 Homogeneidade interamostral para o sódio..... | 67 |
| Figura 7.5 Homogeneidade interamostral para o potássio..... | 67 |

| | |
|--|----|
| Figura 7.6 Homogeneidade interamostral para o fósforo..... | 67 |
| Figura 7.7 Homogeneidade interamostral para o magnésio..... | 68 |
| Figura 7.8 Homogeneidade interamostral para cálcio..... | 68 |
| Figura 7.9 Homogeneidade interamostral para o cobre..... | 68 |
| Figura 7.10 Homogeneidade interamostral para o ferro..... | 69 |
| Figura 7.11 Homogeneidade interamostral para o manganês..... | 69 |
| Figura 7.12 Homogeneidade interamostral para o zinco..... | 70 |
| Figura 8.1.1 Aparato utilizado para a realização de teste de estabilidade a curto prazo..... | 78 |
| Figura 8.1 Réplicas para as quantificações de sódio após 1 mês..... | 79 |
| Figura 8.2 Réplicas para as quantificações de magnésio após 1 mês..... | 79 |
| Figura 8.3 Réplicas para as quantificações de cálcio após 1 mês..... | 79 |
| Figura 8.4 Réplicas para as quantificações de fósforo após 1 mês..... | 79 |
| Figura 8.5 Repetições para as quantificações de potássio após 1 mês..... | 80 |
| Figura 8.6 Réplicas para as quantificações de cobre após 1 mês..... | 80 |
| Figura 8.7 Réplicas para as quantificações de manganês após 1 mês..... | 80 |
| Figura 8.8 Réplicas para as quantificações de ferro após 1 mês..... | 81 |

| | |
|--|----|
| Figura 8.9 Réplicas para as quantificações de zinco após 1 mês..... | 81 |
| Figura 8.10 Réplicas para as quantificações de chumbo após 1 mês..... | 81 |
| Figura 8.11 Réplicas para as quantificações de arsênio após 1 mês..... | 82 |
| Figura 8.12 Réplicas para as quantificações de cádmio após 1 mês..... | 82 |
| Figura 8.13 Estabilidade longo prazo para o manganês..... | 84 |
| Figura 8.14 Estabilidade longo prazo para ferro..... | 84 |
| Figura 8.15 Estabilidade longo prazo para cobre..... | 84 |
| Figura 8.16 Estabilidade longo prazo para zinco..... | 85 |
| Figura 8.17 Estabilidade longo prazo para magnésio..... | 85 |
| Figura 8.18 Estabilidade longo prazo para sódio..... | 85 |
| Figura 8.19 Estabilidade longo prazo para cálcio..... | 86 |
| Figura 8.20 Estabilidade longo prazo para fósforo..... | 86 |
| Figura 8.21 Estabilidade longo prazo para potássio..... | 86 |
| Figura 8.22 Estabilidade longo prazo para arsênio..... | 87 |
| Figura 8.23 Estabilidade longo prazo para cádmio..... | 87 |
| Figura 8.24 Estabilidade longo prazo para chumbo..... | 87 |
| Figura 9.1. Gráfico de índice z para o ensaio colaborativo..... | 94 |

RESUMO

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS E PRODUÇÃO DE MATERIAIS DE REFERÊNCIA DE SUPLEMENTO MINERAL PARA NUTRIENTES E CONTAMINANTES INORGÂNICOS

Neste trabalho foi preparado um material candidato a material de referência de suplemento mineral para gado de leite. Foram determinados os constituintes inorgânicos e nutrientes Ca, K, Na, P, Cu, Fe, Mn, Mg, Zn e os contaminantes As, Cd e Pb. O material foi moído, peneirado até atingir uma granulometria inferior a 80 μ m e envasado. Foi feito um estudo do melhor preparo da amostra por meio do uso de planejamento fatorial, planejamento Doehlert em sistema fechado e 4 experimentos em sistema aberto. Através de uma análise de componentes principais, optou-se pelo preparo da amostra que se utilizava de 3 mL de solução de ácido HNO₃ 3mol.L⁻¹ e 1 mL de H₂O₂, em sistema fechado. Técnicas de espectrometria de absorção e emissão atômica foram avaliadas para a determinação de cada um dos analitos em estudo. Foram realizados testes de homogeneidade intramostral e interamostral para verificar se a amostra se apresentava homogênea. Foram realizados também testes de estabilidade a curto e a longo prazo. Os valores designados para cada analito foram obtidos através de um programa interlaboratorial colaborativo. Ao fim, foram determinadas as incertezas relativas a cada etapa do preparo do material candidato e obteve-se a incerteza expandida para cada um dos analitos em estudo.

ABSTRACT

EVALUATION OF PARAMETERS AND PRODUCTION OF REFERENCE MATERIALS FOR MIXING MINERAL NUTRIENTS AND INORGANIC CONTAMINANTS

This paper was prepared a material candidate for reference material for mineral mixture for dairy cattle. Shape certain analytes Ca, K, Na, P, Cu, Fe, Mn, Mg, Zn and contaminants As, Cd and Pb The material was crushed, sieved until a particle size less than 80 μ m and packaged. A study was conducted in the best sample preparation through the use of factorial design, planning Doehlert and 4 in a closed system open system experiments. Through a principal component analysis, we chose to sample preparation that was used in 3 mL of HNO₃ acid 3mol.L⁻¹ and 1 mL of H₂O₂ in a closed system. Techniques of absorption and emission spectrometry were evaluated for the determination of analytes in each of the study. Form testing for between-bottle homogeneity and within-bottle homogeneity to check if the sample is homogeneous. Were also carried out tests in the short-term and long-term stability. The values assigned to each analyte were obtained by an interlaboratory collaborative program. In the end, the uncertainties were determined for each stage of preparation of candidate material and obtained expanded uncertainty pair each of the analytes under study.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. Introdução..... | 1 |
| 2. Objetivo..... | 5 |
| 3. Revisão Bibliográfica..... | 7 |
| 3.1 Materiais de Referência..... | 8 |
| 3.2 Suplementação Mineral..... | 15 |
| 3.3 Preparo de Amostra..... | 20 |
| 3.4 Quimiometria..... | 21 |
| 4. Preparo do Material Candidato..... | 24 |
| 4.1 Preparo da Amostra..... | 27 |
| 5. Metodologias..... | 31 |
| 6. Pré-caracterização do material..... | 40 |
| 6.1 Determinações..... | 41 |
| 6.1.1 Sódio..... | 41 |
| 6.1.2 Potássio..... | 42 |
| 6.1.3 Cobre..... | 44 |
| 6.1.4 Zinco..... | 45 |
| 6.1.5 Ferro..... | 46 |
| 6.1.6 Manganês..... | 48 |
| 6.1.7 Magnésio..... | 49 |
| 6.1.8 Cálcio..... | 51 |
| 6.1.9 Fósforo..... | 52 |
| 6.1.10 Arsênio..... | 53 |
| 6.1.11 Cádmio..... | 55 |
| 6.1.12 Chumbo..... | 56 |
| 6.2 Conclusões Parciais..... | 57 |

| | |
|---|-----|
| 6.3 Figuras de mérito..... | 59 |
| 6.4 Determinação da faixa de trabalho..... | 61 |
| 6.5 Adição de padrão..... | 62 |
| 7. Teste de Homogeneidade..... | 62 |
| 7.1 Teste de Homogeneidade intramostral..... | 63 |
| 7.2 Teste de Homogeneidade interamostral..... | 64 |
| 8. Testes de Estabilidade..... | 76 |
| 8.1 Teste de estabilidade a curto prazo..... | 77 |
| 8.2 Teste de estabilidade a longo prazo..... | 83 |
| 9. Ensaio colaborativo..... | 90 |
| 10. Determinação das incertezas..... | 91 |
| 10.1 Descrição dos cálculos..... | 97 |
| 10.2 Incertezas obtidas..... | 100 |
| 11. Conclusões..... | 105 |
| 12. Referências Bibliográficas..... | 106 |

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1. Introdução

Todos os dias, uma quantidade expressiva de dados analíticos são gerados nas mais diversas áreas de conhecimento. Tais dados serão base para a tomada de decisões, que implicarão em conseqüências diretas para a população em geral e para o meio ambiente.

Um exemplo típico seria a quantificação de Pb em amostras de efluentes industriais por um laboratório. O resultado gerado pelo laboratório leva à ação de descarte ou não do efluente em corpos d'água.

A qualidade do resultado gerado pelo laboratório que realizou a análise leva a uma contaminação ou não do ambiente e risco à saúde pública.

Desta forma, a garantia da qualidade dentro de laboratórios de medição deve ser rígida e apresentar formas para a verificação de que seus controles são realmente adequados.

Na área médica, o diagnóstico de doenças é embasado por ensaios específicos de acordo com o organismo em questão. Novamente, se o método utilizado para quantificação não é adequado ou apresenta falhas, haverá um diagnóstico errado que comprometerá a vida do paciente. Novamente, a garantia da qualidade dentro de laboratórios de medição deve ser rígida e apresentar formas para verificar sua eficácia.

Existem algumas maneiras de se verificar se os resultados obtidos são realmente confiáveis.

O uso de métodos de análise validados, a participação em programas de ensaio de proficiência, o uso de procedimentos de qualidade interna e a implementação da rastreabilidade das medidas são exemplos de práticas que

conduzem a uma maior confiança nos dados gerados.(EURACHEM/CITAC,1998).

Neste contexto, os materiais de referência e materiais de referência certificados vêm de encontro ao objetivo da garantia da qualidade, uma vez que minimizam os erros que podem ser cometidos em uma quantificação. (ABNT ISO/GUIA 34).

Segundo o VIM, Vocabulário Internacional de Metrologia(2000), material de referência (MR) é um “material suficientemente homogêneo e estável em determinadas propriedades, que foi preparado para uma utilização prevista numa medição ou para o exame de propriedades nominais”. Já o material de referência certificado (MRC) é um “material de referência acompanhado de documentação emitida por uma entidade qualificada, fornecendo valores de uma ou mais propriedades especificadas e as incertezas e rastreabilidades associadas, usando procedimentos válidos”.

Uma vez que o material de referência permite que os resultados gerados por um laboratório sejam transferidos por meio de uma rede de calibração, a rastreabilidade pode ser assegurada.

Em um olhar mais metuculoso, é desejável que o material de referência tenha um grau de similaridade alto com a matriz a ser analisada, visando refletir no primeiro os mesmos problemas analíticos que seriam observados na amostra real. (ABNT ISO/GUIA 33).

Segundo o COMAR (Banco Internacional de Dados de Materiais de Referência Certificados), existem cerca de 11.300 MRC disponíveis no mercado em diversas matrizes (clínicas, ambientais, matéria-prima). Contudo, somente cerca de 400 destes materiais são voltados à agropecuária. Este dado se torna crítico quando o contexto é o mercado brasileiro. O agronegócio no

Brasil responde por 33% do PIB, 42% das exportações totais e 37% dos empregos do país e há uma previsão de expansão.

Visando tal expansão e assegurar a competitividade, a garantia da qualidade do produto brasileiro se faz obrigatória. (http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/image/RELATORIO_GESTAO/SRI/2009.pdf).

O objetivo deste trabalho foi obter um material de referência para suplemento mineral normalmente fornecido para gado de leite.

Para tanto, todo um estudo de estratégias para abertura da amostra, seleção de métodos para quantificação, testes de homogeneidade, estabilidade, determinação de incertezas e determinação dos valores verdadeiros para cada parâmetro avaliado foi desenvolvido.

CAPÍTULO 2

OBJETIVO

2. Objetivo

O objetivo da presente dissertação foi preparar um material de referência para mistura mineral para futura distribuição a laboratórios de nutrição animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e outros laboratórios nacionais.

CAPÍTULO 3

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Materiais de Referência

Atualmente, há uma grande pressão por parte do mercado no sentido de se obter resultados confiáveis e garantir sua rastreabilidade.

A rastreabilidade de uma medida pode ser obtida a partir da combinação das seguintes práticas: os equipamentos de medição precisam ser calibrados com padrões que possuem sua rastreabilidade garantida ao Sistema Internacional (SI); quando não for possível o uso de métodos primários, é desejável que o método adotado para a medida analítica seja comparado a um método previamente validado; os métodos utilizados tenham sua validade demonstrada e seja feito o uso de materiais de referência de controle interno ou material de referência certificado de uma matriz que guarde o maior grau de similaridade possível com a amostra em questão.(EURACHEM/CITAC, 1998).

Ao buscar a rastreabilidade, a intenção é que todos os laboratórios envolvidos na obtenção de uma medida tenham uma escala de medição muito similar, fato este que leva a um controle maior do resultado.(EURACHEM/CITAC, 1998, PAUWELS & LAMBERTY, 2001).

Desta forma, a utilização dos materiais de referência e materiais de referência certificados têm influência direta na qualidade dos resultados gerados, uma vez que possibilitam a transferência dos valores de grandezas entre diferentes laboratórios. (ABNT ISO/GUIA 34, 2004).

Segundo ZSCHUNKE (2003), os resultados obtidos em química analítica somente são válidos se submetidos a um esquema de referência: os

Revisão Bibliográfica

materiais de referência. Esses são designados como os padrões a serem utilizados em química analítica.

Segundo o COMAR (Banco Internacional de Dados de Materiais de Referência Certificados), existem cerca de 11.300 MRC disponíveis no mercado em diversas matrizes (clínicas, ambientais, matéria-prima).

Os primeiros materiais de referência foram preparados na Europa para a certificação de matrizes estáveis. Alemanha e Reino Unido produziram no início do século XX materiais de referência de ferro e aço.(PAUWELS & LAMBERTY, 2001).

Em 1951, o National Bureau of Standards (NBS), instituto que mais tarde daria origem ao americano National Institute of Standards and Technology (NIST), teve seus esforços concentrados no sentido de produzir materiais de referência que fossem de interesse da indústria da época: as matrizes escolhidas foram minério, metais, cerâmicas, ou seja, matérias primas. (GILLS et al., 2001).

Em 1958 houve a criação da European Coal and Steel Community (ECSC) Working Group, que mais tarde daria origem aos materiais de referência EURONORM. Esta, ainda mantém no mercado cerca de 200 tipos de materiais de referência para metais, ligas minérios e concentrados. (PAUWELS & LAMBERTY, 2001).

Em 1950, houve a criação dos materiais de referência nucleares e isotópicos por parte de centros nucleares como o Atomic Energy Research Establishment in Harwell do Reino Unido, Commissariat à l'Energie Atomique, da França e o Central Bureau for Nuclear Measurements (CBNM) na Bélgica. (PAUWELS & LAMBERTY, 2001).

Nestes primórdios, os materiais de referência eram materiais reais que eram retirados da produção industrial e seguiam para uma caracterização por

Revisão Bibliográfica

meio de comparações interlaboratoriais (no caso de metais e minérios) ou, como no caso dos materiais isotópicos, eram produzidos de forma sintética. (PAUWELS & LAMBERTY, 2001).

A certificação destes materiais na década de 1980 teve seu foco voltado para ações que garantissem a sua homogeneidade e assegurassem sua estabilidade. (PAUWELS & LAMBERTY, 2001).

Esta preocupação culminou na obtenção dos materiais de referência certificados para análise ambientais de composto orgânicos, alimentos, análises clínicas e biotecnologia. (PAUWELS & LAMBERTY, 2001).

No Brasil, foi criado em Dezembro de 1973 o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - Inmetro -, vinculado ao Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, que atua como Secretaria Executiva do Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Conmetro), substituindo o Instituto Nacional de Pesos e Medidas (INPM). (<http://www.inmetro.gov.br>).

O Inmetro tem como principal missão “prover confiança à sociedade brasileira nas medições e nos produtos, através da metrologia e da avaliação da conformidade, promovendo a harmonização das relações de consumo, a inovação e a competitividade do País”.(<http://www.inmetro.gov.br>).

Várias são as funções do Inmetro, dentre elas executar as políticas nacionais de metrologia e da qualidade; fiscalizar o cumprimento das normas técnicas e legais referentes às unidades de medidas; manter e conservar padrões de medidas, bem como promover e manter a cadeia de rastreabilidade dos padrões das unidades de medida no Brasil e executar atividades de acreditação de laboratórios de calibração e de ensaio, provedores de ensaios de proficiência e de organismos de certificação, entre outros. (<http://www.inmetro.gov.br>).

O início da produção de material de referência no Brasil data de 1975 pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT) com a criação do Núcleo de Padrões Analíticos, atualmente Agrupamento de Materiais de Referência.

Desde sua criação, o IPT já desenvolveu cerca de 130 tipos diferentes de materiais de referência certificados de minérios, refratários, metais puros e ligas. Também podem ser encontrados materiais de referência certificados para padrões físicos, como viscosidade e poder calorífico e padrões direcionados para a indústria do petróleo. (<http://www.ipt.br/solucoes/54.htm>).

Estes materiais produzidos são disponibilizados tanto para o meio acadêmico como para o setor industrial e parte deles é utilizado, além do mercado interno, por empresas internacionais como Estados Unidos, Inglaterra, Alemanha, França e Argentina, entre outros. (<http://www.ipt.br/solucoes/54.htm>).

Em 1978 foi criado o Centro de Tecnologia Mineral (CETEM), um centro de pesquisa vinculado ao Ministério de Ciência e Tecnologia. Este centro atua no desenvolvimento de materiais de referência de amostras minerais (bauxita, minérios de sulfetos de cobre). (<http://www.cetem.gov.br/mrc/historico.htm>).

Tanto a preparação como a coordenação dos programas de medição interlaboratorial para a certificação desses materiais são realizadas no âmbito do Programa Materiais de Referência Certificados (PMRC) da Coordenação de Processos Mineraiis (COPM). (<http://www.cetem.gov.br/mrc/historico.htm>).

Em 1982 o Instituto Nacional de Controle de Qualidade na Saúde (INCQS) - Fundação Oswaldo Cruz/Ministério da Saúde, iniciou a produção de material de referência certificado para matrizes biológicas por meio de um

Revisão Bibliográfica

programa de controle de qualidade de produtos sujeitos à vigilância sanitária e controle de qualidade de conjuntos de diagnósticos.

No setor agropecuário, grande contribuição foi dada pelo Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) em colaboração com a Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) que produziu em 1992 o material de referência Trace Elements in Soya Flour (IAEA RM-361), certificado para Br, Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Rb e Zn. O material foi obtido por meio de um estudo de comparação interlaboratorial que contou com a participação de 21 laboratórios da América Latina.

TAGLIAFERRO e colaboradores produziram em 2006 um material de referência de café denominado “Café Arábica”.

CARIONI e colaboradores (2011) avaliaram vários parâmetros para a quantificação de arsênio total em um material candidato a material de referência de atum.

MOREIRA e colaboradores (2006) produziram um material de referência nacional para mexilhão.

No panorama mundial, vários são os trabalhos relacionados à produção de materiais de referência.

KRAMER e colaboradores (1998) preparam um material de referência certificado para sedimento antártico.

Em outro trabalho, atenção foi dada por SEGURA e colaboradores (2004) para a produção de três materiais de referência certificados para As, Cd, Cu, Fe, Pb, Mn, Ni, Se e Zn em águas residuárias.

Contudo, ainda há uma dificuldade a ser vencida para a obtenção destes materiais de referência, pois a grande parte deles é importada e tem custo elevado, além de gerar problemas com as condições de entrega e prazos de validade. (<http://www.ipt.br/solucoes/54.htm>)

Revisão Bibliográfica

Some-se a essa dificuldade a carência de materiais de referência para o setor agropecuário.

Essa informação se torna crítica quando percebe-se o panorama do agronegócio brasileiro.

Dados da Balança Comercial do Agronegócio referentes ao mês de Junho de 2011, fornecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento mostram que as exportações no mês de junho totalizaram US\$ 8,910 bilhões, montante este que representa um aumento de 29,1% se comparado ao mesmo período do ano de 2010. Este resultado representa um superávit de US\$ 5,854 bilhões para o agronegócio brasileiro.

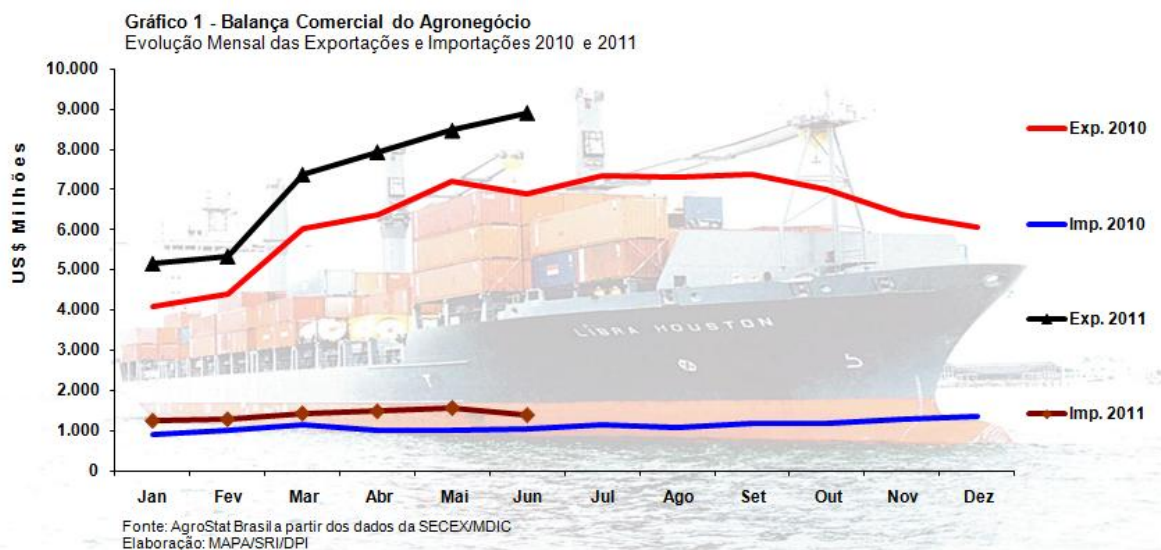


Figura 3.1. Balança Comercial do Agronegócio.

Os países de destino dos produtos de exportação do agronegócio brasileiro apresentaram taxas de crescimento: Espanha (148,4%), Rússia (110,3%), Japão (64,3%), Alemanha (58,3%) e China (33,7%).

Revisão Bibliográfica

Este resultado positivo é devido ao aumento das exportações dos seguintes setores: complexo soja (+33,0%); carnes (+18,%); complexo sucroalcooleiro (+11,5%); produtos florestais (+5,5%) e café (+74,3%).

O Brasil só poderá se manter e expandir suas exportações sendo competitivo e adequando o produto nacional às exigências do mercado internacional.

Sendo assim, a importância da utilização e desenvolvimento de novos materiais de referência e materiais de referência certificados fica claramente comprovada.

A ABNT ISO/GUIA 34 é diretamente dirigida aos produtores de materiais de referência.

Em seu conteúdo são abordadas práticas de garantia da qualidade e rastreabilidade do material preparado.

É fortemente recomendado que o sistema de qualidade adotada pelo produtor de material de referência apresente:

- a) medidas adequadas aos resultados gerados (exemplo: faixa linear da curva de calibração, estudo de tamanho de partícula);
- b) seja feita uma preparação do material;
- c) sejam conduzidos estudos de homogeneidade e estabilidade do material;
- d) a caracterização do material candidato seja realizada de forma adequada;
- e) seja estabelecida a rastreabilidade dos padrões utilizados;
- d) seja feita a atribuição de valores de propriedade ou preparação de certificados ou declarações, quando for o caso;
- e) condições adequadas para o armazenamento do material;

f) todo o procedimento para a obtenção do material seja pautado pelas ABNT ISO GUIA 34, ABNT ISO GUIA 30, ABNT ISO GUIA 31, e ABNT ISO GUIA 35.

Segundo a ABNT ISO/IEC 17025, todo o laboratório deve ter estratégias para garantir a qualidade de seus resultados.

Pode-se citar como algumas ações que levam a este controle de qualidade: a) uso de materiais de referência; b) análise de amostras cegas; c) análise de amostras fortificadas; d) participação de programas de ensaio de proficiência.(SIMONET 2005, QUEVAUVILLER, et al 1998).

Através da participação em ensaios de proficiência, o laboratório participante pode ser avaliado com relação à qualidade dos resultados que gera (THOMPSON et al, 2006, QUEVAUVILLER, et al 1998).

Para os produtores de materiais de referência, a promoção de programas colaborativos é muito útil na determinação do valor verdadeiro de uma grandeza. Tal valor pode ser obtido, entre outras formas, através dos valores do consenso dos participantes do ensaio de proficiência.(THOMPSON et al, 2006).

Desta forma, o conjunto destas ações visa garantir a confiabilidade e qualidade das medidas que serão obtidas nos laboratórios de medição.

3.2 Suplementação Mineral

Detentor do segundo maior rebanho efetivo do mundo, o Brasil possui cerca de 200 milhões de cabeças que proporcionam o desenvolvimento de duas cadeias produtivas: a de carne e a de leite. Juntos, estes segmentos respondem por uma produção bruta estimada de R\$ 67 bilhões.

O Brasil se destaca como o maior exportador de carnes bovina no mundo e, segundo os dados do Ministério da Agricultura, até 2020, a produção nacional deverá responder por 44,5% do mercado mundial.

Com relação à produção de leite, o Brasil ocupa a sexta posição mundial como exportador, tendo comercializado cerca de 27 milhões de toneladas em 2009. (http://www.cileite.com.br/sites/default/files/2011_06_indicadores_leite.pdf)

A presença do produto brasileiro no mercado externo faz com que este se sujeite a um rígido controle de qualidade e segurança sanitária. (<http://www.agricultura.gov.br/animal/exportacao>).

A própria extensão territorial e o clima tropical do Brasil são favoráveis à obtenção destes resultados, uma vez que permite que os animais sejam criados em sistemas extensivos.

Pensando no início da cadeia produtiva, o bem estar do animal tem conseqüências diretas na qualidade da carne e do leite.

Situações de estresse, falta de manejo e condições higiênicas, dieta desbalanceada e sofrimento alteram a coloração, o pH, a maciez e o tempo de prateleira da carne. (<http://www.agricultura.gov.br/animal/bem-estar-animal>)

Os produtos destinados à alimentação animal tem sua fiscalização e regulamentação realizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Este garante que os processos de fabricação dos produtos sejam conduzidos de forma a manter os padrões higiênico sanitários, ditados pela legislação vigente. (<http://www.agricultura.gov.br/animal/bem-estar-animal>).

Com relação à dieta animal, geralmente as fontes de nutrientes são provenientes de forrageiras, rações concentradas e suplementos minerais.

Revisão Bibliográfica

Alguns problemas com a dieta do animal são originados devido à não observância da espécie, idade, sexo e produção. Os nutrientes devem, então, ser administrados ao animal na proporção correta, de forma que tenha a utilidade máxima. (ANDRIGUETTO, 1985)

Uma vez no organismo, os minerais desempenham importantes funções: funções estruturais, promotores do equilíbrio ácido-básico, osmótico e permeabilidade das membranas celulares, quando na forma de eletrólitos nos fluidos corporais, e ativadores de processos enzimáticos.(TOKARNIA, 2000)

O organismo animal tem aproximadamente 50 tipos diferentes de minerais; destes, somente 15 deles são considerados essenciais, tais como: os macronutrientes Ca, P, Mg, K, Na, Cl, S e os micronutrientes Fe, Co, Cu, I, Mn, Zn, Se e Mo. (TOKARNIA, 2000).

A tabela 3.1 mostra alguns dos macro e micronutrientes presentes na alimentação, bem como sua função no organismo animal e fontes utilizadas para a formulação das misturas minerais.

Tabela 3.1 – Macro e micronutrientes essenciais para as espécies domésticas e suas funções.

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

FONTE: McDowell, 1999.

Segundo o Centro de Inteligência do Leite da Embrapa Gado de leite, a produção brasileira de leite tem acumulado no primeiro semestre de 2011 uma variação positiva de 11,26%.

Revisão Bibliográfica

A maior variação foi devido à administração na dieta de sal mineral, com uma variação positiva de 28,38%. O motivo foi a alta no preço do fosfato.

Existe uma preocupação muito grande com a qualidade da matéria prima utilizada para a produção da mistura mineral.

Se esta não apresentar uma procedência confiável, outros constituintes inorgânicos serão incorporados à dieta do animal, podendo causar doenças e conseqüente diminuição da produção.(ANDRIGUETTO, 1985).

Chumbo, arsênio, cádmio e flúor são exemplos de constituintes inorgânicos aos quais o animal pode ter acesso através da alimentação e que só trazem danos à saúde e à produção.

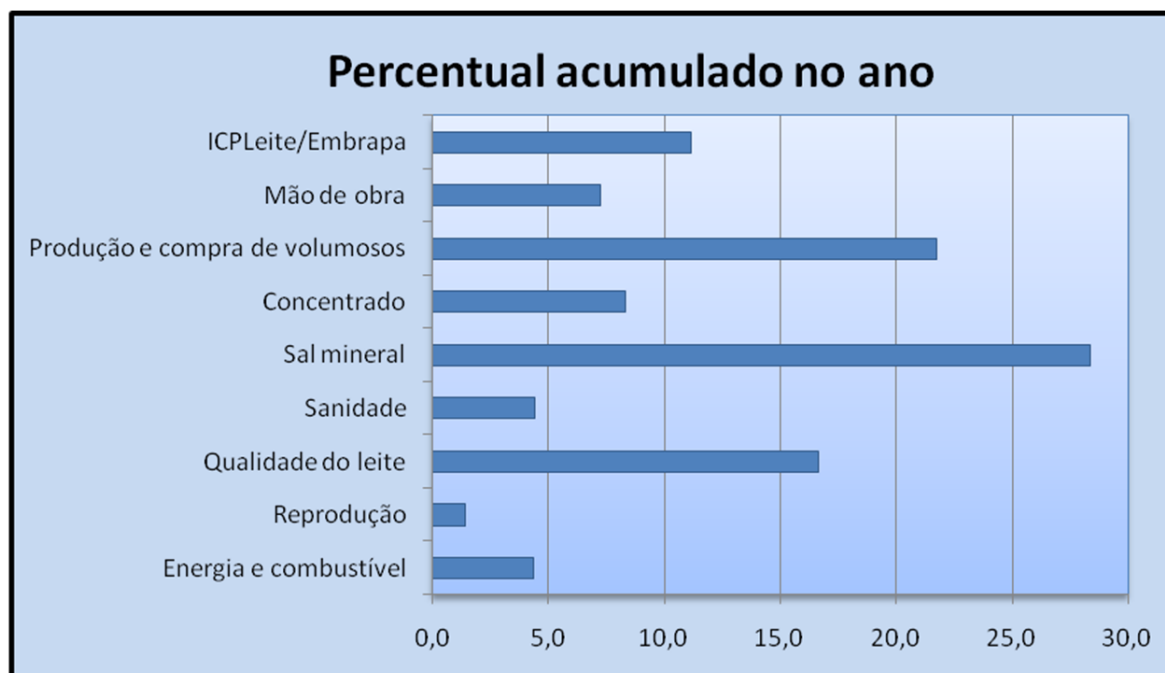


Figura 3.2 Variações percentuais do índice de custo de produção de leite acumulado em 2011.

FONTE:<http://www.cileite.com.br/content/httpwwwcileitecombrcontentcileite-panorama-do-leite-nc2b056-julho-de-2011>.

MARÇAL e colaboradores (2000) investigaram a presença de chumbo em misturas minerais para alimentação bovina no estado do Paraná e no estado de São Paulo. Das 30 amostras analisadas, 9 apresentaram concentrações de chumbo acima de 30 mg.kg^{-1} , máxima concentração permitida pelo National Research Council.

3.3 Preparo de Amostra

Freqüentemente nos deparamos com a necessidade de converter amostras sólidas em uma solução aquosa para a posterior determinação de constituintes de interesse.

Esta etapa da seqüência analítica costuma ser a mais demorada e também a mais importante pois nela, podem ser introduzidos constituintes estranhos à amostras (contaminação) ou ainda, nesta etapa, pode ocorrer a volatilização do analito de interesse.

Desta forma, um prévio estudo das características da amostra pode ser bastante útil no sentido de evitar ações que comprometam a qualidade dos resultados obtidos.

Basicamente, é desejável a um procedimento de dissolução que ele dissolva totalmente a amostra, seja rápido, os reagentes utilizados não interfiram na determinação da espécie e esteja disponíveis com alto grau de pureza, a perda de espécies por adsorção ou volatilização seja desprezível, o procedimento seja seguro e ao final, pode-se garantir que todos os constituintes de interesse estão presentes na solução final.(COSTA et al, 2008).

Em laboratórios de nutrição animal é muito comum o preparo das amostras por meio de sistema aberto, em bloco digestor.

Este procedimento se utiliza de mistura de ácidos, geralmente HNO_3 e HClO_4 aliada a temperatura, que é lentamente levada a 210°C .

Outro procedimento bastante utilizado, porém mais rápido e com menor risco de volatilização e contaminação é a decomposição assistida por radiação microondas. (KINGSTON & HASWELL, 1997).

Neste tipo de preparo, a mistura absorve a radiação microondas e, devido à interação da radiação eletromagnética com os íons dissolvidos e com o solvente, há um aumento da temperatura dentro do frasco. (KINGSTON & HASWELL, 1997).

O uso de ácidos diluídos foi investigado e é permitido neste tipo de preparo, diminuindo o risco ao analista e evitando a possibilidade de contaminação da amostra. (ARAÚJO et al, 2002).

Uma compilação dos procedimentos disponíveis na literatura sobre a digestão de amostras orgânicas e inorgânicas foi elaborada pelo Grupo de Análise Instrumental Aplicada (GAIA). Nele, são apresentados por volta de 500 artigos publicados entre os anos de 1975 e 2005 e que versam sobre a digestão de amostras nas mais diversas matrizes: águas, alimentos, bebidas, plantas, material biológico, sedimento, solo e cosméticos, entre outros.

3.4 Quimiometria

O modelo de aquisição de dados para área da química analítica aumentou nos últimos 20 anos devido à interface existente entre instrumentos e computadores. Neste novo contexto, uma quantidade expressiva de dados é rapidamente gerada e passível de ser interpretada explorando diferentes enfoques.(FERREIRA et al, 1999). Diante deste novo quadro, a busca por

ferramentas que consigam dar um tratamento adequado e rápido a estas novas informações é desejável.

Neste panorama, a Quimiometria, que é uma área da química, se propõe a resolver tais questões, utilizando-se de ferramentas principalmente da matemática, computação e estatística. (FERREIRA et al, 1999).

Ao iniciar um experimento, é importante fazer uma triagem sobre quais variáveis são realmente importantes e podem afetar de maneira positiva ou não a quantificação.

Assim, a coleta de dados se torna mais consciente e evita-se a realização de experimentos que sejam equivalentes.

Neste intuito, o planejamento fatorial se mostra adequado, pois através dele são investigadas duas ou mais variáveis em dois níveis, um mais baixo (-), e um mais alto (+). Como exemplos do nível mais alto, pode-se citar uma concentração mais alta ou volume maior da variável em estudo. O mesmo raciocínio se aplica aos experimentos realizados em nível mais baixo.

Desta forma, todas as combinações possíveis, dentro dos dois níveis impostos para as variáveis em estudo podem ser investigados. (BARROS NETO, 1996).

Similar ao planejamento fatorial, outro tipo de planejamento pode ser utilizado para a triagem das variáveis.

No planejamento Doehlert o número de níveis para as variáveis em estudo não é sempre o mesmo. Por exemplo, uma variável pode ser estudada em cinco níveis diferentes, como a concentração ácida e outra variável, em apenas dois níveis, como o volume utilizado.

Desta forma, há uma liberdade maior em se escolher os níveis atribuídos a cada variável. (FERREIRA et al, 2004).

Revisão Bibliográfica

Em geral, busca-se escolher uma variável que poderá ter um efeito maior com um número maior de níveis, a fim de se obter mais informações

Outra ferramenta quimiométrica amplamente utilizada é a análise de Componentes Principais (PCA, do inglês, Principal Component Analysis).

Através dela, o conjunto de dados a serem analisados é disposto de forma bidimensional em uma matriz, onde as linhas podem ser amostras e as colunas variáveis.(MATOS et al, 2003)

Desta forma, ao fazer uma PCA, pode-se obter uma redução da dimensão dos dados gerados inicialmente, pode-se visualizar facilmente a presença de *outliers*, além de possibilitar o reconhecimento de variáveis que promovem maior influência à amostra. (WOLD et al, 1987, citado por MATOS, 2003).

CAPÍTULO 4

PREPARO DO MATERIAL CANDIDATO

4. Preparo do Material Candidato

O material de mistura mineral utilizado neste trabalho é um produto comercialmente adquirido pela Embrapa Pecuária Sudeste em São Carlos, SP, para fins de alimentação de gado de leite. Um total de 25 kg desse material foi separado, aerado e previamente homogeneizado em caixas plásticas.

Após esta etapa, o material foi moído em dois tipos de moinhos: um moinho de almofariz e pistilo da Marca Retch modelo RM 200 (Alemanha) e um moinho de copos de alta rotação da Marca Marconi modelo MA 630/1 (Piracicaba, SP, Brasil). Esse processo demandou por volta de dois meses, de forma a evitar o aquecimento dos moinhos (devido ao atrito) ato este que levaria a um aquecimento da amostra e conseqüente perda de elementos voláteis, como o arsênio.

Uma vez moído todo o material, o mesmo foi submetido a uma peneiradora vibratória da Marca Retch modelo AS 200 equipado com uma peneira de malha de diâmetro 150 μm . Ao passar pela peneira, se o material ficasse retido, uma nova etapa de moagem era feita até que todo material fosse peneirado de forma adequada.

A seguir o material foi separado em três caixas plásticas e homogeneizado em um homogeneizador tipo Y da Marca Marconi modelo MA 201/5MO (Piracicaba, SP, Brasil).

Para compor uma amostra a ser homogeneizada, foi utilizado aproximadamente 1 kg de cada uma das 3 caixas plásticas. Cada fração era mantida em homogeneização por 15 minutos. Este procedimento foi repetido até que todo o material das caixas fosse homogeneizado. Então, todo o

processo de separar em caixas e homogeneizar no homogeneizador em Y foi repetido mais duas vezes.

Após a moagem, uma porção de aproximadamente 20 g foi submetida a um ensaio de distribuição de partícula, conduzido pelo departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos, em um picnômetro de hélio (Micromeritics, modelo AccuPyc 1330).

O estudo mostrou que 100% das partículas apresentavam granulometria inferior a 80 μm .

Na figura 4.1 é apresentado o aspecto da amostra antes e após a moagem. É possível observar a heterogeneidade do material na etapa anterior a moagem.

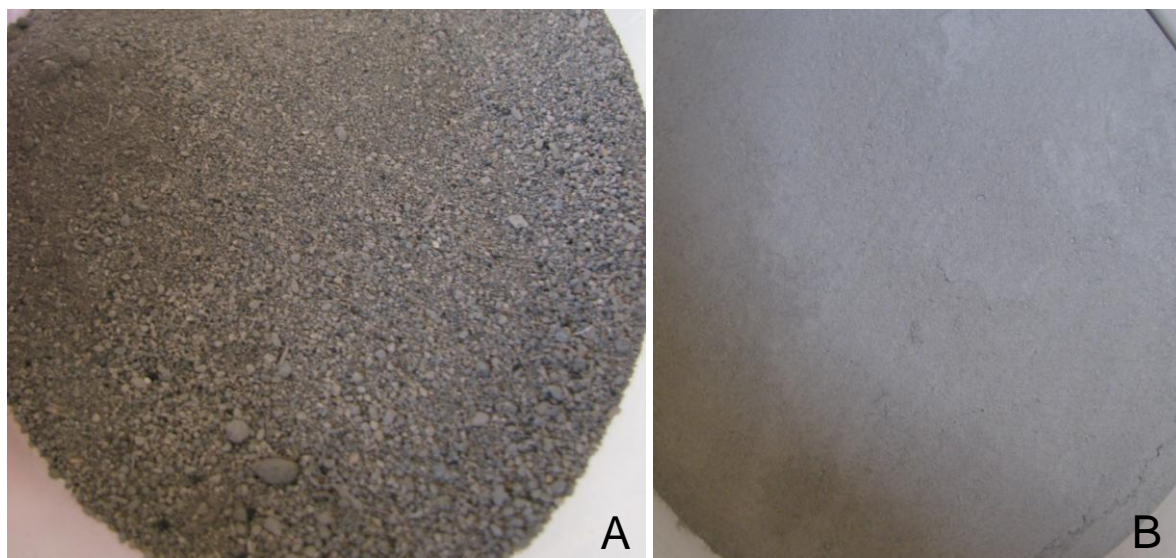


Figura 4.1 Aspecto do material candidato antes da moagem (A) e depois da moagem e peneiramento (B).

A próxima etapa foi o envase do material em frascos de polietileno com capacidade para 50 g. Ao todo, foram preparados 400 frascos. Destes 400 frascos, 100 frascos contendo 10 g foram destinados à distribuição a

laboratórios participantes de ensaio de proficiência, descrito no capítulo 9. O restante dos 300 frascos contendo 50 g foram destinados ao sorteio dos frascos participantes dos testes de homogeneidade, estabilidade e umidade e posterior distribuição aos laboratórios interessados.

4.1 Preparo da Amostra

Levando-se em conta que alguns dos analitos a serem determinados no material tinham caráter volátil, a digestão em sistema fechado se mostrou mais adequada se comparada com a digestão em sistema aberto, por minimizar ou eliminar a perda por volatilização.

Primeiramente, foi proposta uma digestão assistida por radiação micro-ondas em forno com cavidade da marca Anton Paar (Graz, Austria).

Foram propostos dois planejamentos experimentais: um planejamento fatorial 2^3 e um planejamento Doehlert.

Para a composição do planejamento fatorial, foram triadas as variáveis que poderiam ser importantes para a digestão da amostra.

As variáveis selecionadas foram três: concentração de ácido nítrico, volume de ácido nítrico e volume de peróxido de hidrogênio. Cada uma destas três variáveis foram estudadas em dois níveis: um baixo (-1) e um alto (+1).

Tabela 4.1. Variáveis e níveis do planejamento fatorial

| Nível | [HNO ₃] mol.L ⁻¹ | Volume de HNO ₃ mL ⁻¹ | Volume de H ₂ O ₂ mL ⁻¹ |
|-------|---|---|--|
| -1 | 3 | 1 | 1 |
| +1 | 7 | 3 | 2 |

No intuito de se explorar as variáveis em mais de dois níveis, foi elaborado também um planejamento Doehlert. Tal planejamento se mostra interessante pois nele há a possibilidade de se estudar uma variável em mais de dois níveis, além do mais baixo e do mais alto, como num planejamento fatorial.

Tabela 4.2 Variáveis e níveis do planejamento Doehlert.

| Experimento | Volume HNO ₃ MI ⁻¹ | | [HNO ₃] mol. L ⁻¹ | | Volume H ₂ O ₂ mL ⁻¹ | |
|-------------|--|------|--|--------|---|--------|
| | Real | Norm | Real | Norm | Real | Norm |
| 1 | 2 | 0 | 7,5 | 0 | 2 | 0 |
| 4 | 3 | 1 | 7,5 | 0 | 2 | 0 |
| 6 | 2,5 | 0,5 | 9,7 | 0,289 | 3 | 0,817 |
| 9 | 1,5 | -0,5 | 5,3 | -0,289 | 1 | -0,817 |
| 12 | 1,5 | -0,5 | 14 | 0,866 | 2 | 0 |
| Br1 | 1,5 | -0,5 | 1 | -0,866 | 2 | 0 |
| 2 | 2 | 0 | 7,5 | 0 | 2 | 0 |
| 5 | 2,5 | 0,5 | 14 | 0,866 | 2 | 0 |
| 7 | 1 | -1 | 7,5 | 0 | 2 | 0 |
| 10 | 2,5 | 0,5 | 1 | -0,866 | 2 | 0 |
| 13 | 2 | 0 | 11,8 | 0,577 | 1 | -0,817 |
| Br2 | 2 | 0 | 7,5 | 0 | 2 | 0 |
| 3 | 2 | 0 | 7,5 | 0 | 2 | 0 |
| 8 | 1,5 | -0,5 | 1 | -0,866 | 2 | 0 |
| 11 | 2,5 | 0,5 | 5,3 | -0,289 | 1 | -0,817 |
| 14 | 1,5 | -0,5 | 9,7 | 0,289 | 3 | 0,817 |
| 15 | 2 | 0 | 3,2 | -0,577 | 3 | 0,817 |

O material candidato foi submetido a estes dois planejamentos no forno de micro-ondas com cavidade e o programa de aquecimento utilizado esta mostrado na tabela a seguir.

Tabela 4.3 Programa de Aquecimento do Forno de Micro-ondas Anton Paar

| Etapa | Potência.W ⁻¹ | Tempo.min ⁻¹ |
|-------|--------------------------|-------------------------|
| 1 | 250 | 2 |
| 2 | 0 | 3 |
| 3 | 550 | 4 |
| 4 | 750 | 5 |
| 5 | 1000 | 5 |
| 6 | 0 | 15 |

Este programa de aquecimento foi proposto por CRISPINO, 2005 para a digestão de mistura mineral.

A última etapa deste programa de aquecimento é a de resfriamento. A inclusão desta etapa possibilita uma queda no tempo de abertura dos frascos de Teflon ao fim da digestão, sem a perda das espécies voláteis.

Também foi estudado um procedimento de digestão do material candidato em um bloco digestor da marca Tecnal modelo 40/25 com quatro soluções digestoras diferentes: solução de ácido nítrico / ácido perclórico na proporção 4:1 v/v, solução de água-régia (ácido clorídrico / ácido nítrico na proporção 3:1 v/v), solução de água-régia invertida (ácido nítrico / ácido clorídrico na proporção 3:1 v/v) e solução de ácido nítrico concentrado / peróxido de hidrogênio na proporção 4:1 v/v.

O intuito deste estudo foi avaliar o comportamento da digestão do material candidato em situações em que o laboratório não disponha de digestão assistida por radiação micro-ondas.

Todos os procedimentos de digestão avaliados foram realizados em triplicata, com exceção do planejamento Doehlert, pois este visa a seleção de experimentos promissores.

Ao fim, um último procedimento de digestão foi conduzido em chapa aquecedora, utilizando-se 1 g da amostra moída, 50 mL de solução de ácido clorídrico 4 mol L^{-1} e aquecimento a $50^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ até secagem de aproximadamente $2/3$ do volume inicial. (COMPÊNDIO BRASILEIRO DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 2009). Este procedimento é utilizado em laboratórios de indústrias de rações.

CAPÍTULO 5

METODOLOGIAS

5. Metodologias

Após o preparo do material e do estudo dos procedimentos de digestão da amostra, os analitos foram determinados por duas técnicas instrumentais diferentes. Este estudo teve como objetivo avaliar a técnica mais adequada para as determinações segundo as características da amostra e avaliar quais as técnicas estariam comumente presentes na rotina dos laboratórios que participariam do ensaio de proficiência.

Na tabela 5.1 estão descritas as técnicas utilizadas e os respectivos analitos determinados.

Tabela 5.1. Técnica utilizada e analitos determinados

| Técnica | Analitos |
|------------------------------------|-------------------------------------|
| ICP OES | Na, K, Mg, Mn, Fe, Zn, P, Ca, Cu, P |
| FAAS | Mg, Fe, Zn, Ca, Cu, Pb, Mn |
| GFAAS | Cd, As |
| HGAAS | As |
| TS FF AAS | Pb, Cd |
| STAT FF AAS | PB |
| Espectrofotometria em fluxo | P |
| Espectroscopia de emissão de chama | Na, K |

*Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES), espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS), espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS), espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HG AAS), espectrometria de absorção atômica com termospray e tubo na chama (TS FF AAS) e espectrometria de absorção atômica com tubo na chama STAT FF AAS.

Para as determinações por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente utilizou-se um equipamento da VARIAN, modelo Vista RL, visão radial (Mulgrave, Australia), cujos parâmetros empregados estão descritos na tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Parâmetros empregados na análise por ICP OES

| Parâmetros Instrumentais | ICP OES (visão radial) |
|---------------------------------|-------------------------------|
| Potência da rádio frequência | 1,2 kW |
| Vazão do nebulizador | 0,90 L min ⁻¹ |
| Vazão do gás do plasma | 15 L min ⁻¹ |
| Vazão do gás auxiliar | 2,25 L min ⁻¹ |
| Nebulizador | V-Groove |
| Câmara de nebulização | Sturman-Masters |
| Comprimento de onda nm | Ca 393,366 |
| | Ca 396,847 |
| | Na 588,995 |
| | Na 589,592 |
| | Cu 324,754 |
| | Cu 327,395 |
| | Fe 238,204 |
| | Fe 259,940 |
| | K 766,491 |
| | K 769,897 |
| | Mg 279,553 |
| | Mg 280,270 |
| | Mn 257,610 |
| | Mn 259,372 |
| P 177,434 | |
| P 178,222 | |
| P 213,618 | |

Zn 202,548

Zn 213,857

Para as determinações por espectrometria de absorção atômica com chama utilizou-se um equipamento da VARIAN, Modelo SpectrAA , uma chama composta por ar-acetileno e os parâmetros descritos na tabela 5.3.

Tabela 5.3 Parâmetros utilizados nas determinações por espectrometria de absorção atômica com chama.

| Elemento | Ca | Cu | Fe | Zn | Mg | Mn |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Comp. onda nm | 422,7 | 324,7 | 248,3 | 213,9 | 202,6 | 249,5 |
| Corrente Lâmpada mA | 10 | 4 | 5 | 5 | 4 | 5 |
| Abertura da fenda nm | 0,5 | 0,5 | 0,2 | 1,0 | 1,0 | 0,2 |
| Faixa de Trabalho ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | 0,01 – 3 | 0,03 – 10 | 0,06 - 15 | 0,01 - 2 | 0,15 - 20 | 0,02 – 5 |

Para as determinações de Ca e Mg foi utilizada uma solução de óxido de lantânio 0,5 % no intuito de diminuir a formação de compostos estáveis com silício ou fosfato.

Para as determinações de cádmio por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite utilizou-se um equipamento da VARIAN (SpectrAA 800), com corretor de background tipo ZEEMAN. Segundo LOPES (2002), o melhor modificador químico a ser utilizado seria o fosfato de amônio monobásico $5000 \mu\text{g. mL}^{-1}$ para Cd.

Na tabela 5.4 estão descritos os parâmetros utilizados nas determinações por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite para cádmio.

Tabela 5.4 Parâmetros utilizados nas determinações por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite para cádmio

| | |
|-------------------------------|------------------|
| Comprimento de onda | 228,8 nm |
| Abertura da Fenda | 0,5 nm |
| Volume da Amostra | 20 μL |
| Volume do modificador químico | 5 μL |

Para as determinações de cádmio por espectrometria de absorção atômica com termospray e forno tubular na chama (GÁSPÁR & BERNDT,2000) foi utilizado um tubo de níquel com 8 mm de diâmetro interno e 6 furos inferiores. Os parâmetros empregados na análise são descritos a na tabela 5.5.

Tabela 5.5 Parâmetros utilizados nas determinações por espectrometria de absorção atômica com termospray e forno tubular na chama.

| | |
|------------------------------|---|
| Comprimento de onda | 228,8 nm |
| Volume da alça de amostragem | 100 μL |
| Vazão do carregador | 0,5 mL. min ⁻¹ |
| Solução carregadora | 0,5% (m/v) de EDTA e 0,1% (v/v) de Triton X-100 |

Para as determinações de fósforo foi utilizada a espectrofotometria em fluxo, que trata-se de um método colorimétrico automatizado (NOGUEIRA et al, 1997). Foi utilizado um espectrofotômetro Marca Femto, uma bomba peristáltica modelo 352 (São Paulo, Brasil) e um banho maria termostático com temperatura ajustada em 37°C marca Solab modelo 150/15/A, além de uma alça de amostragem de 100 μL e bobina de reação de 100 cm . Como

reagentes foram utilizados molibdato de amônio (R1) e metavanadato de amônio (R2) e como carregador, água ultra pura. O produto da reação foi monitorado no comprimento de onda de 420 nm.

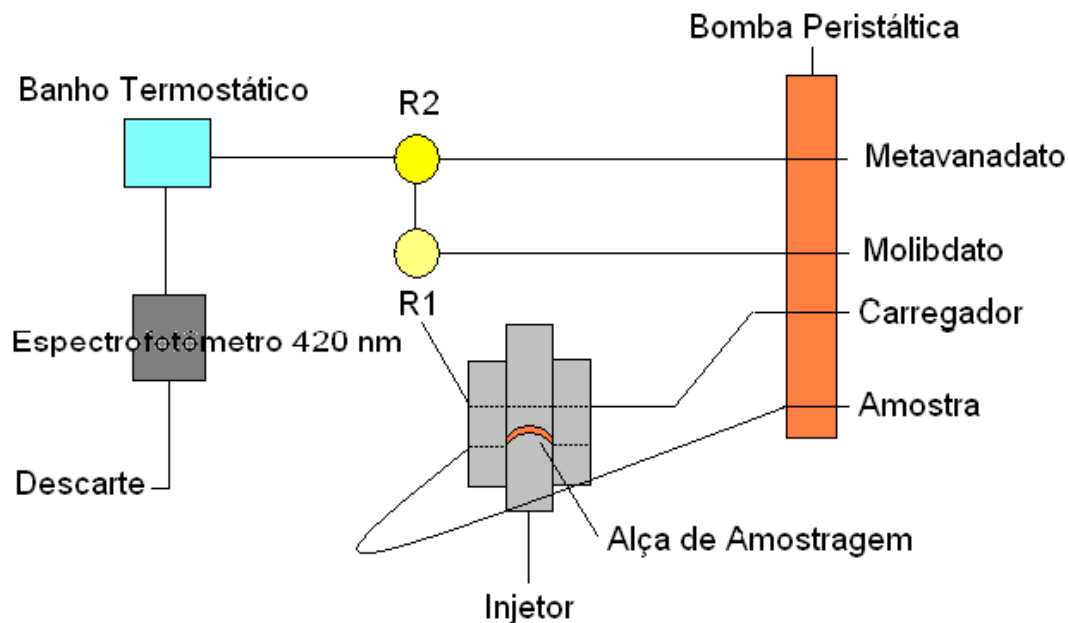


Figura 5.1 Sistema para análise por injeção em fluxo para determinação de fósforo

Para as determinações de chumbo por espectrometria de absorção atômica com tubo na chama STAT FF AAS (WATLING, 1978) foi utilizado um equipamento VARIAN modelo SpectrAA 640 e os parâmetros descrito na tabela 5.6.

Tabela 5.6 Parâmetros utilizados nas determinações por espectrometria de absorção atômica com tubo na chama.

| | |
|---------------------|----------------|
| Comprimento de onda | 283,3 nm |
| Abertura da fenda | 0,5 nm |
| Fenda do tubo | 5,0 cm |
| Chama | Ar – acetileno |

Para as determinações de arsênio pela espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (DEDINA & TSALEV,1995) foi utilizado um equipamento VARIAN, modelo SpectrAA-640, além do módulo para geração de hidretos da mesma marca e modelo VGA 77 e os parâmetros contidos na tabela 5.7.

Tabela 5.7 Parâmetros utilizados para a determinação de arsênio por espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos.

| | |
|-------------------------------|--------------------------------------|
| Comprimento de onda | 193,7 nm |
| Gás auxiliar | Argônio |
| Alça de amostragem | 60 cm |
| Solução pré redutora | KI 1% |
| Solução geradora de hidreto | NaBH ₄ 0,8 % e NaOH 0,5 % |
| Solução carregadora | HCl 5 mol. L ⁻¹ |
| Vazão da amostra | 6,8 mL. min ⁻¹ |
| Vazão do redutor e carregador | 1,1 mL. min ⁻¹ |
| Chama | Ar - acetileno |

Para as determinações de arsênio pela espectrometria de absorção atômica com forno de grafite foi utilizado um equipamento da Marca VARIAN, Modelo SpectrAA 800 com corretor de fundo ZEEMAN. O modificador químico utilizado foi uma solução de nitrato de paládio 500 µg. mL⁻¹ por diminuir a interferência sofrida devido a presença de fosfato (Husáková, L.; Cernohorský, T.; Srámková, J.; Vavrusová L.; 2007) e os parâmetros descritos na tabela 5.8

Tabela 5.8 Parâmetros utilizados nas determinações por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite para arsênio

| | |
|-------------------------------|----------|
| Comprimento de onda | 193,7 nm |
| Abertura da Fenda | 0,2 nm |
| Volume da Amostra | 20 µL |
| Volume do modificador químico | 5 µL |

Para as determinações de sódio e potássio por fotometria de chama foi utilizado um equipamento Marca Micronal, modelo B262 com filtros para Na, K e Li e gás butano como combustível para a chama.

Um vez selecionadas as técnicas e os analitos, a próxima etapa foi a pré-caracterização do material candidato, visando estudar a aplicabilidade de cada técnica de acordo com as características da matriz.

CAPÍTULO 6

PRÉ-CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL

6. Pré-caracterização do material

Para o início do estudo da digestão foi pesado 0,200 g +/- 0,001 g do material candidato e o volume final do digerido foi fixado em 50 mL +/- 0,50 mL.

Não houve digestão completa em nenhum dos experimentos realizados: planejamento fatorial 2^3 , planejamento Doehlert, bloco digestor e chapa aquecedora.

Sempre restava uma massa do material candidato precipitado ao fundo do frasco, aproximadamente 0,030 g.

É provável que a massa restante seja derivada de matrizes silicatadas presentes em misturas minerais que apresentam a rocha fosfática como fonte de fosfato. (ANDRIGUETTO, 1985)

Após a extração foi feita uma centrifugação para separar a massa restante do sobrenadante. Tal extrato foi analisado pelas diversas técnicas analíticas utilizadas no trabalho, mediante diluições adequadas para cada analito. Sempre que possível, foi avaliado mais de um comprimento de onda para cada elemento com o objetivo de utilizar o procedimento mais sensível.

Para as determinações foram construídas curvas de calibração com pelo menos cinco concentrações diferentes por meio da diluição de solução padrão do analito. Foram empregadas soluções comercializadas pela marca SpecSol em meio de solução HNO_3 1% v/v.

Os planejamentos fatorial 2^3 , Doehlert e experimentos em bloco digestor foram avaliados para os macronutrientes e micronutrientes do trabalho. Após definido o melhor procedimento para o preparo da amostra,

este foi utilizado para a determinação dos contaminantes cádmio, chumbo e arsênio.

6.1 Determinações

6.1.1 Sódio

As determinações de sódio nos extratos de cada experimento realizado foram feitas por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente e por fotometria de emissão em chama.

Para a curva analítica em fotometria de emissão de chama, obteve-se a reta de regressão $y = 1,0064x + 0,7922$ e um $r^2 = 0,9984$.

Para a curva analítica em espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente, obteve-se a reta de regressão $y = 6037,7x - 1725,2$ e um $r^2 = 0,9986$ para o comprimento de onda 588,995 nm e a reta de regressão $y = 2513,5x - 522,84$ e um $r^2 = 0,9991$ para o comprimento de onda 589,592 nm.

A linha escolhida para as quantificações foi a 588,995 nm por se tratar da mais sensível.

Na figura 6.1 é apresentada uma representação envolvendo a determinação de sódio pelas duas técnicas em avaliação.

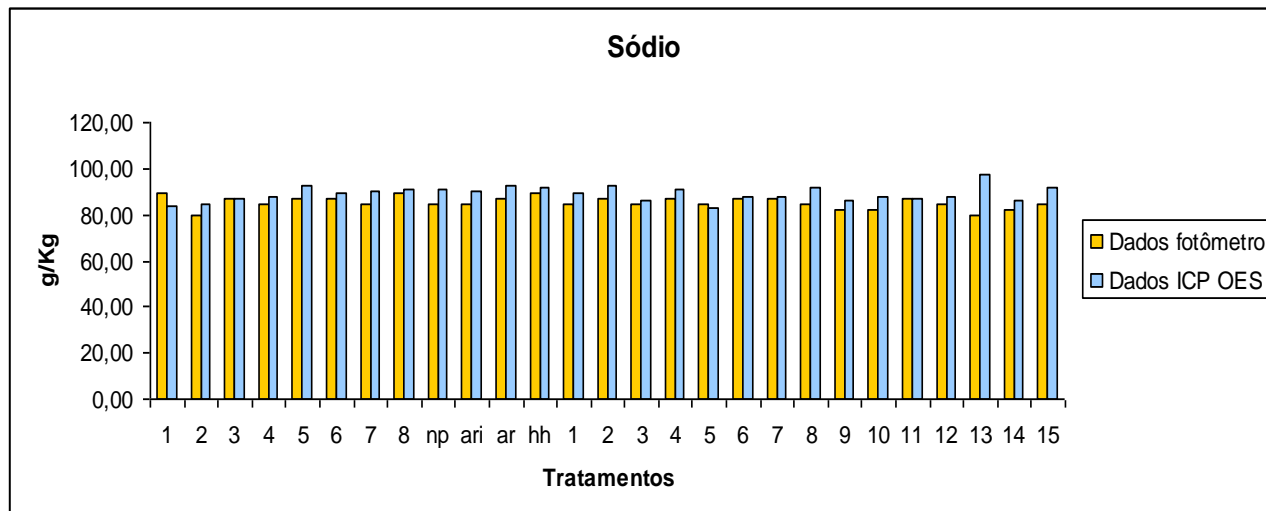


Figura 6.1 Comparações para a determinação de sódio

***Primeiro bloco de experimentos 1,2,3,4,5,6,7 e 8 referem-se ao planejamento fatorial, segundo bloco de experimentos np (nitríco-perclórica), ari (água-régia invertida), ar (água-régia), hh (ácido nítrico concentrado, peróxido de hidrogênio) referem-se aos experimentos do bloco digestor e terceiro bloco de experimentos experimentos 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14 e 15 referem-se aos experimentos do planejamento Doehlert.**

Ao avaliar os dados apresentados na Figura 6.1, percebe-se que há uma boa correlação entre os dados obtidos pelas duas técnicas avaliadas.

Contudo, há diferença entre os resultados obtidos pelas duas técnicas segundo o teste estatístico *t* de *Student*.

Com relação aos tratamentos aplicados, nenhum deles se mostrou preferível.

6.1.2 Potássio

As determinações de potássio nos extratos de cada experimento realizado foram feitas por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente e por fotometria de chama.

Para a curva analítica em fotometria de emissão de chama, obteve-se a reta de regressão $y = 1,0025x + 0,0858$ e um $r^2 = 0,9999$.

Para a curva analítica em espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente, obteve-se a reta de regressão $y = 288,7x + 1936,3$ e um $r^2 = 0,9993$ para o comprimento de onda 769,897 nm e a reta de regressão $y = 243,13x + 333,76$ e um $r^2 = 0,9989$ para o comprimento de onda 766,491 nm.

As duas linhas de emissão avaliadas se mostraram adequadas, mas a escolhida foi a 769,491 nm por ser a mais intensa.

Na figura 6.2 é apresentada uma representação envolvendo a determinação de potássio pelas duas técnicas em avaliação.

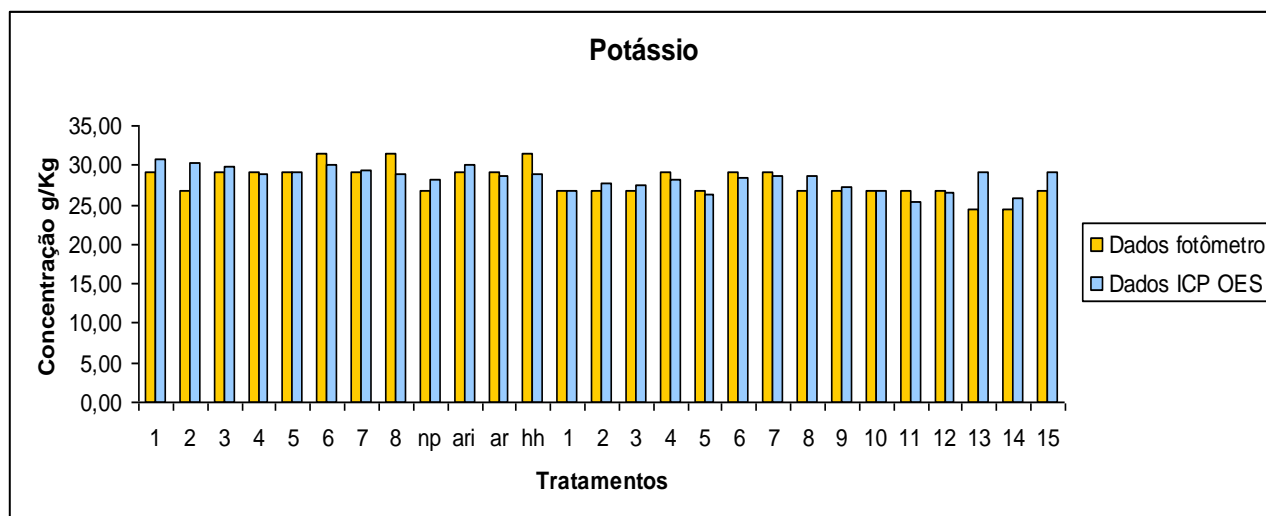


Figura 6.2 Comparações para a determinação de potássio

A discussão apresentada para as determinações de sódio são válidas para a determinação de potássio: embora os dados estejam próximos, há diferença significativa a 95% de intervalo de confiança.

Nenhum experimento se destacou.

6.1.3 Cobre

As determinações de cobre nos extratos de cada experimento realizado foram feitas por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente e por espectrometria de absorção atômica com chama.

Para a curva analítica em espectrometria de absorção atômica com chama obteve-se a reta de regressão $y = 0,205x - 0,0196$ e um $r^2 = 0,999$.

Para a curva analítica em espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente, obteve-se a reta de regressão $y = 234,74x + 1,4673$ e um $r^2 = 0,999$ para o comprimento de onda 213,598 nm, a reta de regressão $y = 2683,9x + 33,042$ e um $r^2 = 0,9995$ para o comprimento de onda 327,395 nm e a reta de regressão $y = 4517,2x + 93,335$ e um $r^2 = 0,9993$ para o comprimento de onda 324,754 nm .

A linha escolhida para as determinações de cobre foi a 324,754 nm por ser a mais sensível.

Na figura 6.3 é apresentada uma representação envolvendo a determinação de cobre pelas duas técnicas em avaliação

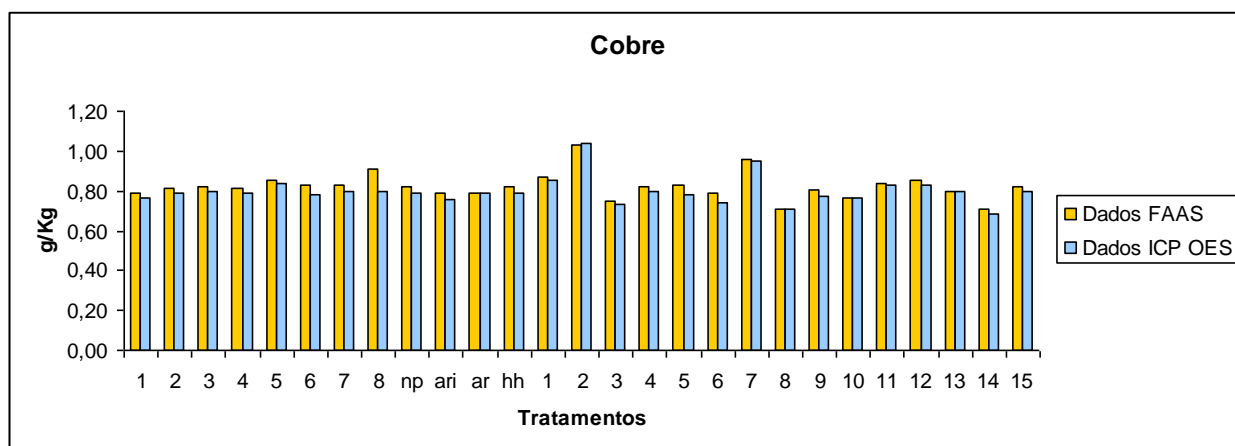


Figura 6.3 Comparações para a determinação de cobre

Novamente, as determinações assumem valores próximos, porém diferem significativamente.

Os experimentos 2 e 7 do planejamento Doehlert apresentam valores para a determinação de cobre ligeiramente maiores que os demais experimentos.

Nestes experimentos, a concentração ácida é intermediária ($7,5 \text{ mol.L}^{-1}$) o que difere é o volume do ácido (2,0 mL e 1,0 mL para os experimentos 2 e 7 respectivamente).

6.1.4 Zinco

As determinações de zinco nos extratos de cada experimento realizado foram feitas por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente e por espectrometria de absorção atômica com chama.

Para a curva analítica em espectrometria de absorção atômica com chama obteve-se a reta de regressão $y = 2,5574 + 0,0021x$ e um $r^2 = 0,9985$.

Para a curva analítica em espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente, obteve-se a reta de regressão $y = 90,361x + 19,792$ e um $r^2 = 0,9912$ para o comprimento de onda 202,548 nm, a reta de regressão $y = 464,48x + 19,375$ e um $r^2 = 0,9994$ para o comprimento de onda 206,2 nm e a reta de regressão $y = 1253,6x + 32,48$ e um $r^2 = 0,9995$ para o comprimento de onda 213,857 nm .

A linha escolhida para as determinações de zinco foi a 213,857 nm por ser a mais sensível.

Na figura 6.4 é apresentada uma representação envolvendo a determinação de zinco pelas duas técnicas em avaliação.

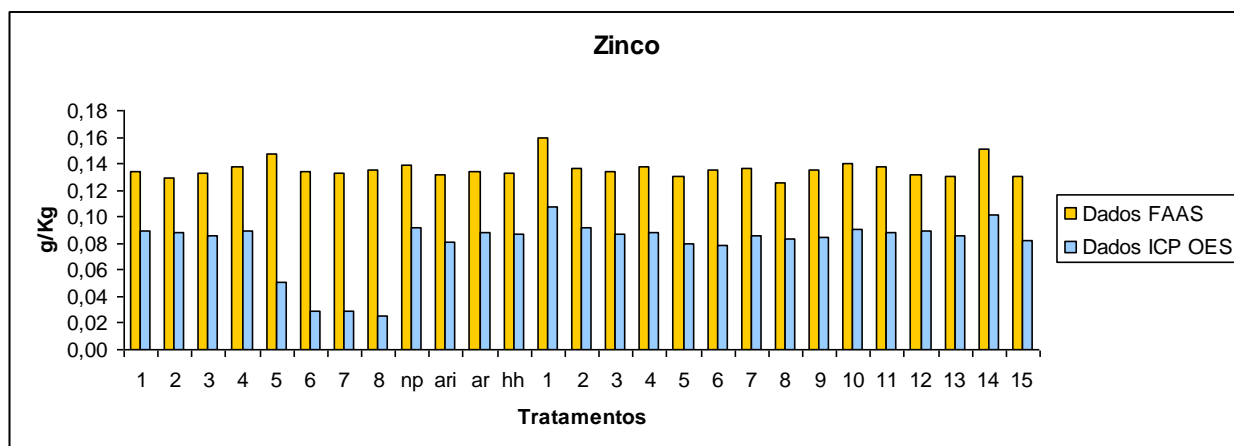


Figura 6.4 Comparações para a determinação de zinco

Percebe-se que os dados obtidos para determinação por espectrometria óptica com plasma acoplado indutivamente apresentam valores bem mais baixos do que as determinações realizadas pela espectrofotometria de absorção atômica com chama.

Essa diferença pode ser um indicativo de que o extrato solubilizado seja instável, pois as determinações não foram realizadas no mesmo dia em todas as técnicas.

6.1.5 Ferro

As determinações de ferro nos extratos de cada experimento realizado foram feitas por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente e por espectrometria de absorção atômica com chama.

Para a curva analítica em espectrometria de absorção atômica com chama obteve-se a reta de regressão $y = 0,2802x + 0,1402$ e um $r^2 = 0,9861$.

Para a curva analítica em espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente, obteve-se a reta de regressão $y = 264,87x + 16,495$ e um $r^2 = 0,9992$ para o comprimento de onda 259,94 nm, a reta de regressão y

= $372,63x + 47,344$ e um $r^2 = 0,9992$ para o comprimento de onda 234,35 nm e a reta de regressão $y = 1048,4x - 53,046$ e um $r^2 = 0,9992$ para o comprimento de onda 238,204 nm .

A linha escolhida para as determinações de ferro foi a 238,204 nm por ser a mais sensível.

Na figura 6.5 é apresentada uma representação envolvendo a determinação de ferro pelas duas técnicas em avaliação.

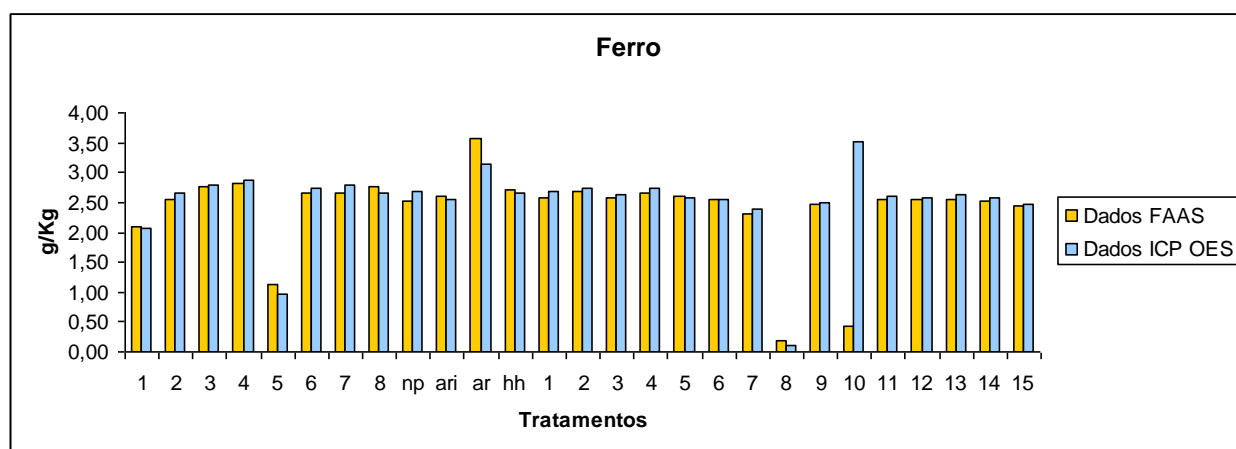


Figura 6.5 Comparações para a determinação de ferro

Os dados sugerem que, nos experimentos 5 do planejamento fatorial e 8 de planejamento Doehlert há um queda na determinação de ferro no extrato.

Nos experimentos 8 do planejamento Doehlert e 5 do planejamento fatorial a variável concentração de HNO_3 está em seu nível mais alto.

Nestes experimentos, a variável concentração de HNO_3 está no nível mais alto, indicando que a concentração ácida parece influenciar na digestão da amostra.

Contudo, nos experimentos 8 do planejamento fatorial e 5 do planejamento Doehlert a variável concentração de HNO_3 está em seu nível

mais baixo e a quantificação de ferro é muito diferente dos outros experimentos intermediários.

6.1.6 Manganês

As determinações de manganês nos extratos de cada experimento realizado foram feitas por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente e por espectrometria de absorção atômica com chama.

Para a curva analítica em espectrometria de absorção atômica com chama obteve-se a reta de regressão $y = 0,144x + 0,0086$ e um $r^2 = 0,9932$.

Para a curva analítica em espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente, obteve-se a reta de regressão $y = 570,96x + 39,118$ e um $r^2 = 0,9993$ para o comprimento de onda 259,372 nm, a reta de regressão $y = 2477,5x - 101,24$ e um $r^2 = 0,9994$ para o comprimento de onda 260,568 nm e a reta de regressão $y = 17564x - 326,07$ e um $r^2 = 0,9997$ para o comprimento de onda 257,61 nm .

A linha escolhida para as determinações de manganês foi a 257,61 por ser a mais sensível.

Na figura 6.6 é apresentada uma representação envolvendo a determinação de manganês pelas duas técnicas em avaliação.

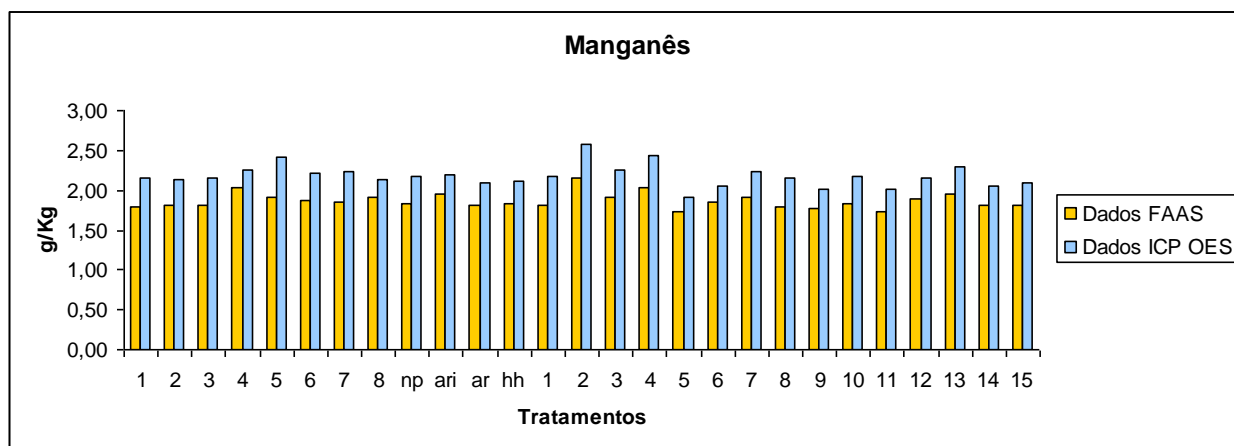


Figura 6.6 Comparações para a determinação de manganês

As quantificações para manganês pelas duas técnicas estudadas diferem significativamente e nenhum experimento se mostra preferível.

Similarmente às determinações para zinco, os dados obtidos pela espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente se mostram mais baixas.

Novamente, o tempo entre o preparo da amostra e a sua determinação pode ser importante.

6.1.7 Magnésio

As determinações de magnésio nos extratos de cada experimento realizado foram feitas por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente e por espectrometria de absorção atômica com chama.

Para a curva analítica em espectrometria de absorção atômica com chama obteve-se a reta de regressão $y = 0,0427x - 0,0025$ e um $r^2 = 0,9971$.

Para a curva analítica em espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente, obteve-se a reta de regressão $y = 577,14x - 19,783$ e

um $r^2 = 0,9962$ para o comprimento de onda 285,213 nm, a reta de regressão $y = 2549,2x - 154,51$ e um $r^2 = 0,9964$ para o comprimento de onda 280,27 nm e a reta de regressão $y = 16708x - 922,35$ e um $r^2 = 0,9975$ para o comprimento de onda 279,553 nm.

A linha escolhida para as determinações de magnésio foi a 279,553nm por ser a mais sensível.

Na figura 6.7 é apresentada uma representação envolvendo a determinação de magnésio pelas duas técnicas em avaliação.

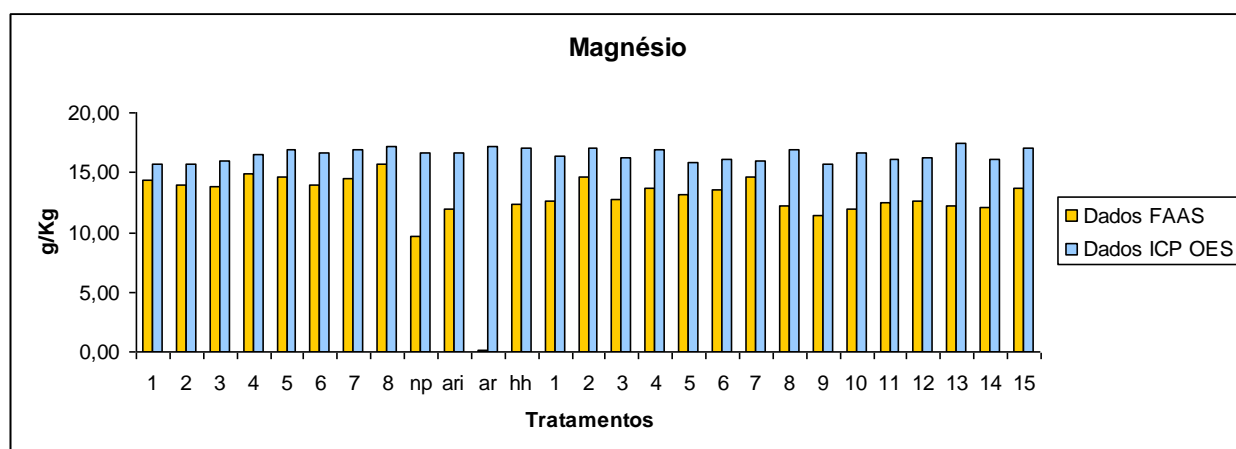


Figura 6.7 Comparações para a determinação de magnésio

Desta vez observa-se uma inversão nas quantificações: os dados obtidos pela espectrofotometria de absorção atômica com chama são mais altos que os obtidos pela espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente.

Os dados para o experimento referente à água-régia (ar) em FAAS foram excluídos, pois apresentaram um valor muito discrepante com relação aos outros experimentos, sugerindo uma possível contaminação das amostras.

Novamente, o tempo entre o preparo da amostra e sua determinação pode explicar esta diferença.

Levando-se em consideração os dados obtidos por FAAS, nenhum experimento parece ser preferível.

6.1.8 Cálcio

As determinações de cálcio nos extratos de cada experimento realizado foram feitas por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente e por espectrometria de absorção atômica com chama.

Para a curva analítica em espectrometria de absorção atômica com chama obteve-se a reta de regressão $y = 0,0396x + 0,0035$ e um $r^2 = 0,9996$.

Para a curva analítica em espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente, obteve-se a reta de regressão $y = 70109x + 36505$ e um $r^2 = 0,9994$ para o comprimento de onda 393,366 nm, a reta de regressão $y = 181821x + 69361$ e um $r^2 = 0,9995$ para o comprimento de onda 396,847 nm.

A linha escolhida para as determinações de cálcio foi a 396,847 nm por ser a mais sensível.

Na figura 6.8 é apresentada uma representação envolvendo a determinação de cálcio pelas duas técnicas em avaliação.

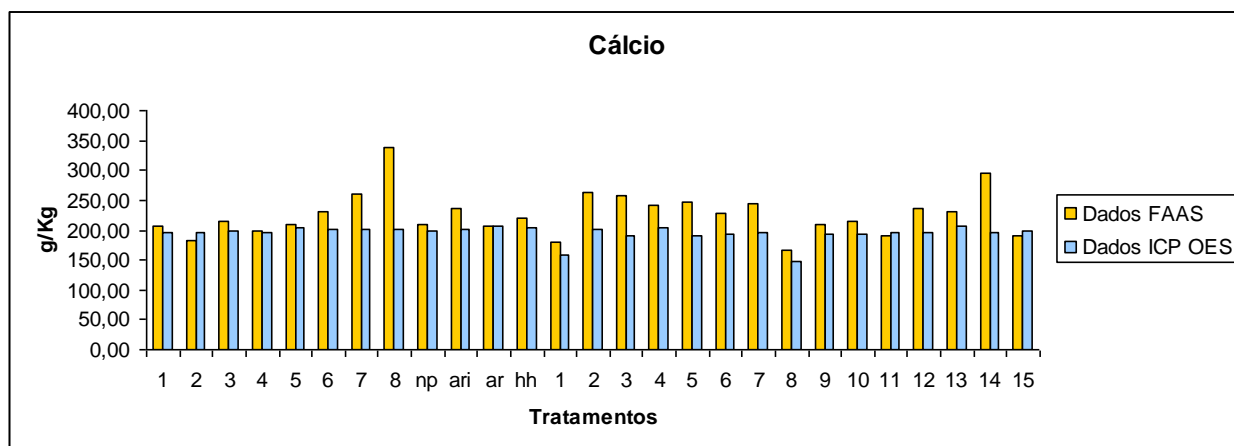


Figura 6.8 Comparações para a determinação de cálcio

As determinações realizadas para as duas técnicas diferem significativamente e valores ligeiramente maiores são obtidos pela espectrofotometria de absorção atômica com chama.

O experimento 8 do planejamento fatorial indica uma possível contaminação da amostra na determinação por FAAS.

6.1.9 Fósforo

As determinações de fósforo nos extratos de cada experimento realizado foram feitas por espectrofotometria em fluxo e por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente.

Para a curva analítica em espectrometria em fluxo a reta de regressão $y = 0,0032x + 0,041$.

Para a curva analítica em espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente, obteve-se a reta de regressão $y = 49,403x + 4,5204$ e um $r^2 = 0,9989$ para o comprimento de onda 213,618 nm, a reta de regressão $y = 5,2314x + 4,6066$ e um $r^2 = 0,9927$ para o comprimento de onda 177,434 nm.

A linha escolhida para as determinações de fósforo foi a 213,618 nm por ser a mais sensível.

Na figura 6.9 é apresentada uma representação envolvendo a determinação de fósforo pelas duas técnicas em avaliação.

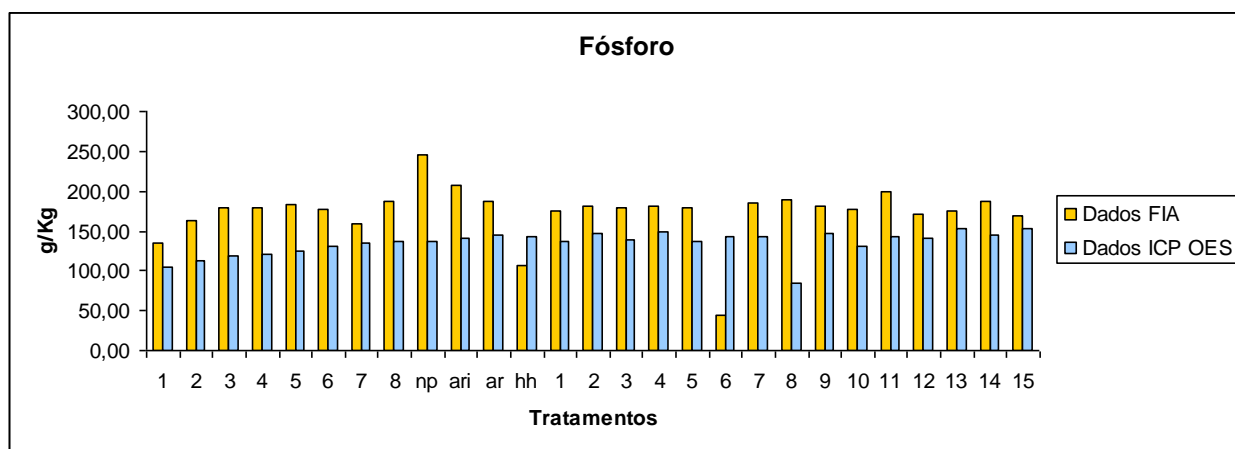


Figura 6.9 Comparações para a determinação de fósforo

Ao analisar os dados da figura 6.9, percebe-se que há a quantificação realizada pela análise em fluxo é maior do que a obtida pela espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente.

Neste tipo de amostra, o fósforo está em sua forma inorgânica, como fosfato, devido a complexidade de sais que compõem a mistura mineral. Uma vez nesta forma, sua mineralização se torna desnecessária, pois a formação do composto amarelo do sistema vanadomolibdofosfórico em meio ácido se torna favorável (NOGUEIRA et al, 1987).

6.1.10 Arsênio

As determinações de arsênio nos extratos de cada experimento realizado foram feitas por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite e espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos.

Para a curva analítica em espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos obteve-se a reta de regressão $y = 0,0071x + 0,0011$ e um $r^2 = 0,9938$.

Para a curva analítica em espectrometria de absorção atômica com forno de grafite obteve-se a reta de regressão $y = 0,0024x + 0,0061$ e um $r^2 = 0,9969$.

Na figura 6.10 é apresentada uma representação envolvendo a determinação de arsênio pelas duas técnicas em avaliação.

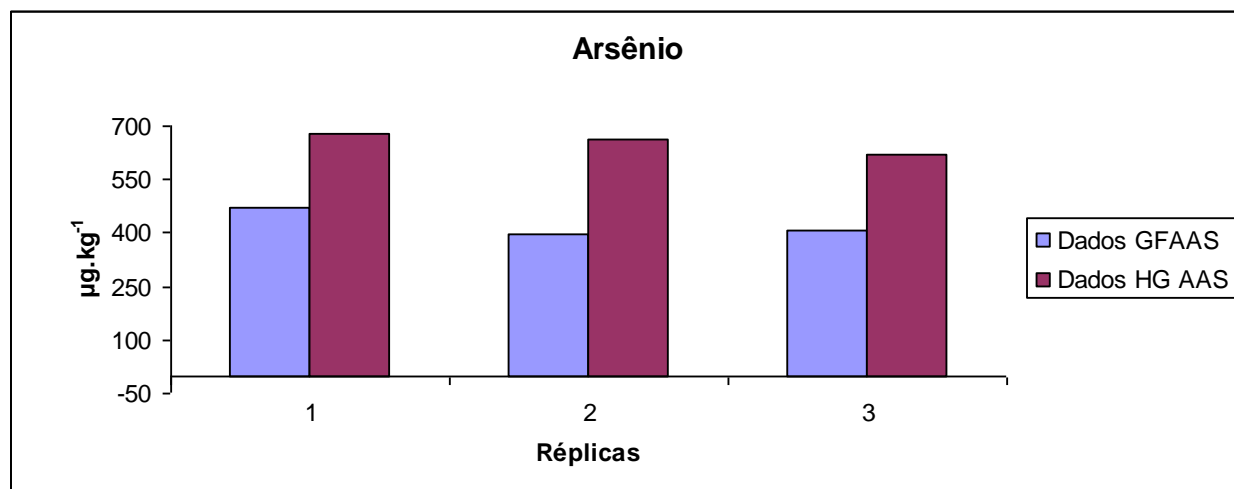


Figura 6.10 Comparações para a determinação de arsênio

Observa-se que as determinações obtidas pela espectrofotometria de absorção atômica com forno de grafite são menores se comparadas ao com as determinações pela espectrofotometria de absorção atômica com geração de hidretos.

Na primeira, a presença de cloretos forma compostos voláteis com o analito, no caso o arsênio, e este pode ter sido perdido na etapa de pirólise.(VOLYNSKII, 2003)

6.1.11 Cádmi

As determinações de cádmio nos extratos de cada experimento realizado foram feitas por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite e espectrometria de absorção atômica com forno tubular na chama.

Para a curva analítica em espectrometria de absorção atômica com forno de grafite obteve-se a reta de regressão $y = 0,0782x + 0,0253$ e um $r^2 = 0,9952$.

Para a curva analítica em espectrometria de absorção atômica com forno tubular na chama, obteve-se a reta de regressão $y = 0,0996x + 0,0915$ e um $r^2 = 0,9945$.

Na figura 6.11 é apresentada uma representação envolvendo a determinação de cádmio pelas duas técnicas em avaliação.

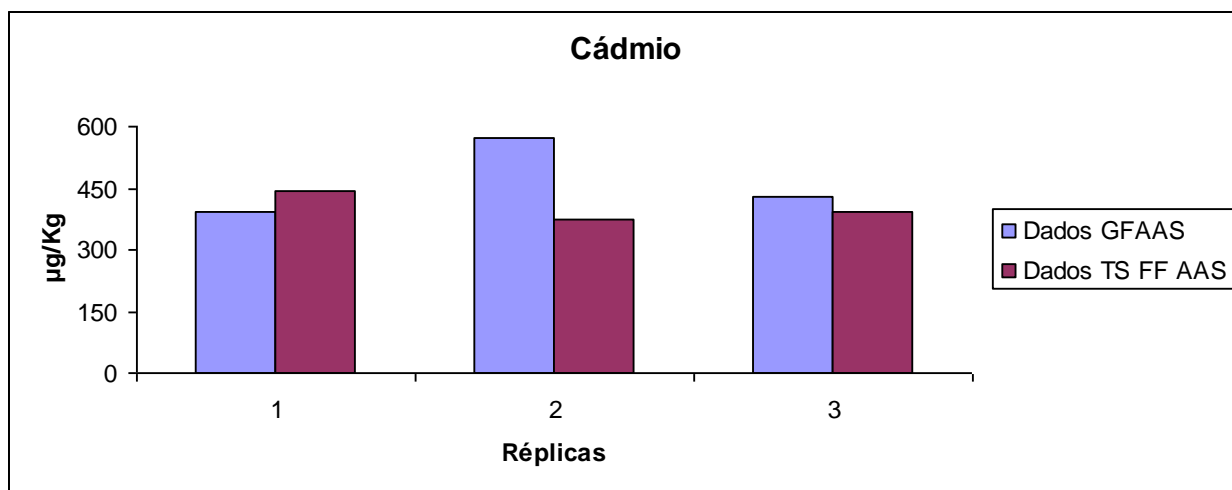


Figura 6.11 Comparações para a determinação de cádmio

A análise da figura 6.11 mostra que as determinações realizadas pela espectrofotometria de absorção atômica com forno tubular na chama são mais baixas que as determinações feitas por GFAAS.

Este fato ocorreu pois, nas determinações feitas pela espectrofotometria de absorção atômica com forno tubular na chama ocorria um entupimento do capilar que conduzia a solução até o tubo no interior da chama, devido à grande massa de sólidos dissolvidos na amostra.

Esta situação impossibilitou o uso desta técnica nas quantificações.

6.1.12 Chumbo

As determinações de chumbo nos extratos de cada experimento realizado foram feitas por espectrometria de absorção atômica com tubo na chama e por espectrometria de absorção atômica com chama.

Para a curva analítica em espectrometria de absorção atômica com tubo na chama obteve-se a reta de regressão $y = 0,0479x - 0,0006$ e um $r^2 = 0,9981$.

Para a curva analítica em espectrometria de absorção atômica com chama, obteve-se a reta de regressão $y = 0,0548x + 0,0038$ e um $r^2 = 0,9916$.

Na figura 6.12 é apresentada uma representação envolvendo a determinação de chumbo pelas duas técnicas em avaliação.

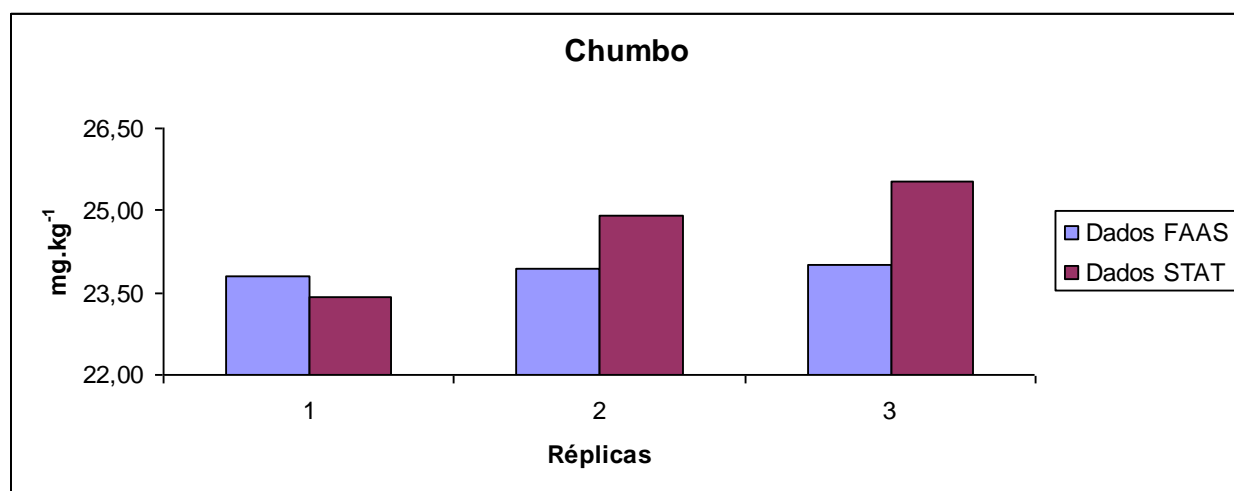


Figura 6.12 Comparações para a determinação de chumbo

As determinações pela espectrometria de absorção atômica com tubo na chama se mostraram mais adequadas, pois a nuvem atômica é aprisionada dentro do tubo, aumentando a sensibilidade da técnica (SOUZA et al, 2009).

6.2 Conclusões Parciais

O estudo de vários procedimentos de extração mostrou que nenhum deles foi eficaz para a digestão completa da amostra. Sendo assim, o procedimento a ser utilizado deveria ser escolhido de forma a minimizar a perda de espécies voláteis, reduzir a concentração da espécie ácida utilizada visando diminuir custos e periculosidade do analista e evitar a adição de constituintes inorgânicos ao extrato final.

A figura 6.13 mostra a análise de componentes principais realizada para verificar se algum experimento poderia ser priorizado.

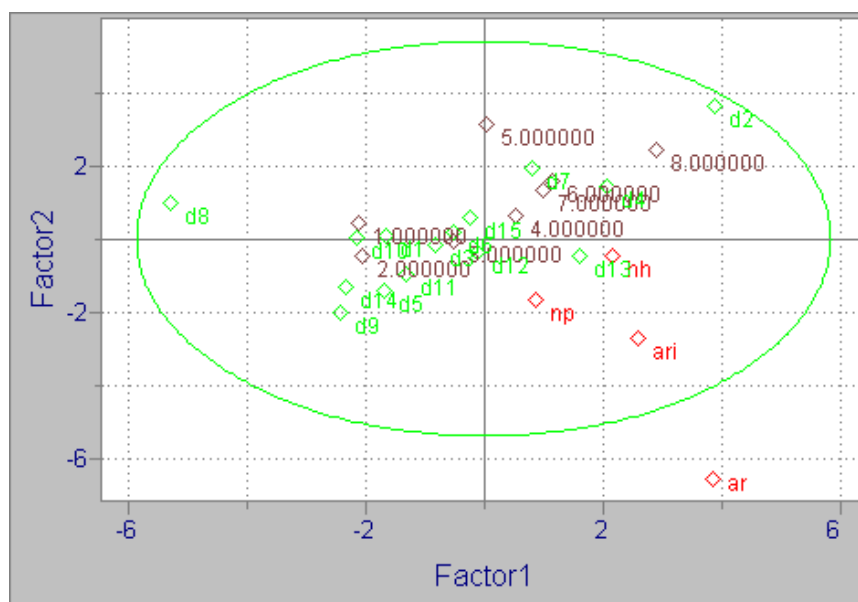


Figura 6.13 Análise de componentes principais

***Experimentos em verde são referentes ao planejamento Doehlert, os experimentos em marron, referentes ao planejamento fatorial e os experimentos em vermelho foram realizados em sistema aberto com as soluções digestoras água-régia, nítrico-perclórica, água-água régia invertida e somente ácido nítrico concentrado e peróxido de hidrogênio.**

A distribuição dos experimentos ao longo da PC1 e PC2 se mostrou aleatório, não sugerindo o favorecimento de nenhum deles em detrimento a outro realizado.

Desta forma, o procedimento de digestão selecionado foi o conduzido em sistema fechado, que fez uso de 3 mL de uma solução de HNO_3 3mol L^{-1} e 1 mL de H_2O_2 .

Após estudar cada um dos analitos nas técnicas mostradas, algumas foram selecionadas como adequadas para continuar os ensaios.

Foram selecionadas, então, as técnicas de acordo com a frequência analítica, disponibilidade e simplicidade de aplicação.

Para sódio, potássio, ferro, zinco, manganês, magnésio, cálcio, fósforo e cobre, a técnica selecionada foi a espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente. Esta técnica tem como atrativo ser multielementar, diminuindo o tempo das determinações e a facilidade de suportar curvas de calibração com uma ampla faixa linear, diminuindo a necessidade do emprego de várias diluições diferentes do extrato, uma vez que existe analitos na faixa de g kg^{-1} e mg kg^{-1} .

Para as determinações de cádmio foi selecionada a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, embora esta técnica tenha apresentado alguns problemas com relação à matriz salina do material, como a diminuição da vida útil do tubo de grafite.

A espectrometria de absorção atômica com forno tubular na chama não pode ser utilizada devido à presença da alta concentração de sólidos dissolvidos. O capilar se entupia com facilidade, tornando inviável seu uso para a realização de todos os testes necessários ao trabalho. Esta poderia ser uma alternativa interessante, podendo ser uma aplicação relativamente econômica e de fácil implantação nos laboratórios analíticos. Caso este procedimento viesse a se viabilizar, esta dissertação poderia propor a viabilização e operacionalização de uma proposta relativamente recente, simples sensível e de fácil implantação.

Para as determinações de arsênio, a espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos se mostrou bastante adequada por contornar o problema da matriz salina, presente na espectrometria de absorção atômica com forno de grafite.

Por fim, para as determinações de chumbo a técnica escolhida foi a espectrometria de absorção atômica com tubo na chama, por garantir maior sensibilidade à análise, uma vez que a nuvem atômica é aprisionada dentro do tubo sobre a chama, evitando que esta se disperse facilmente.

Uma vez determinadas as técnicas para a quantificação, curvas de calibração com adição de padrão na faixa de trabalho foram construídas e estas se apresentaram paralelas às curvas de calibração construídas em meio de HNO₃ 1%, indicando que o efeito de matriz seria desprezível.

6.3 Figuras de mérito

A tabela 6.1 apresenta os limites de detecção e quantificação obtidos para os analitos aplicando-se as técnicas selecionadas.

Para o cálculo do limite de detecção e quantificação para a espectrometria de absorção atômica foram utilizados as seguintes fórmulas:

$$LOD = \frac{3s}{a} \quad (6.1)$$

$$LOQ = \frac{10s}{a} \quad (6.2)$$

onde a é o coeficiente angular da curva de calibração e s é o desvio padrão de dez medidas do branco analítico.

Para os cálculos de limite de detecção e quantificação em espectrometria de emissão, foram utilizados os seguintes cálculos:

$$LOD = \frac{3xBECxs}{100} \quad (6.3) \text{ e } (6.4)$$

$$LOQ = \frac{10xBECxs}{100}$$

onde o BEC é calculado da seguinte forma:

$$BEC = \frac{Csr}{SBR} \quad (6.5)$$

e o SBR:

$$SBR = \frac{I_{sr} - I_{branco}}{I_{branco}} \quad (6.6)$$

onde C_{sr} refere-se à concentração da solução de referência multielementar,

SBR é a razão sinal analítico/sinal de fundo

I_{sr} e I_{branco} referem-se às intensidades de emissão do branco analítico

RSD é o desvio padrão de 10 medidas do branco analítico.

Após os cálculos, foi construída a tabela 6.1

Tabela 6.1 Limites de detecção e quantificação

| Analito | LOD | LOQ |
|---------|-------|-------|
| Cd | 0,32 | 1,06 |
| As | 0,39 | 1,3 |
| Pb | 0,022 | 0,073 |
| Cu | 0,008 | 0,026 |
| Mn | 0,004 | 0,015 |
| Fe | 0,014 | 0,047 |
| Zn | 0,003 | 0,01 |
| Na | 0,13 | 0,434 |
| Mg | 0,004 | 0,015 |
| Pb | 0,01 | 0,034 |
| Ca | 0,002 | 1,095 |

*Para os analitos Cd e As, a unidade referente é a de $\mu\text{g.kg}^{-1}$, para os demais, mg.kg^{-1}

6.4 Determinação da faixa de trabalho

A tabela 6.2 mostra as faixas de trabalho obtidas para os analitos em estudo, em cada uma das técnicas adotadas.

Tabela 6.2 Faixas de trabalho

| Analito | Faixa | Unidade |
|---------|----------|---------|
| Na | 2,5 - 45 | mg kg-1 |
| K | 5,0 - 36 | mg kg-1 |
| Cu | 1,0 - 10 | mg kg-1 |

| | | |
|----|------------|---------|
| Zn | 0,15 - 1,5 | mg kg-1 |
| Fe | 3,0 - 30 | mg kg-1 |
| Mn | 1,5 - 15 | mg kg-1 |
| Mg | 0,4 - 7,2 | mg kg-1 |
| Ca | 3,5 - 63 | mg kg-1 |
| P | 2,5 - 45 | mg kg-1 |
| As | 0,5 - 10 | µg kg-1 |
| Cd | 0,5 - 5 | µg kg-1 |
| Pb | 0,15 - 6 | µg kg-1 |

6.5 Adição de padrão

Para verificar se a matriz teria algum tipo de interferência na obtenção dos resultados, foram preparadas curvas na matriz do material candidato e comparadas às curvas preparadas em meio HNO₃ 1% v/v.

A tabela 6.3 apresenta estes dados.

Tabela 6.3 Curvas em meio HNO₃ 1% e matriz

| Analito | Curva em meio HNO ₃ 1% | Curva na matriz |
|---------|-----------------------------------|------------------------|
| Cu | $y = 0,2031x - 0,0164$ | $y = 0,2088x + 0,8179$ |
| MG | $y = 0,0427x - 0,0025$ | $y = 0,0476x + 0,0638$ |
| Mn | $y = 0,144x - 0,0086$ | $y = 0,1391x + 0,1299$ |
| Ca | $y = 0,0396x + 0,0035$ | $y = 0,0394x + 0,0703$ |
| P | $y = 0,00174x - 0,0017$ | $y = 0,0016x + 0,1483$ |
| As | $y = 0,0121x + 0,0069$ | $y = 0,0071x + 0,1065$ |
| Cd | $y = 0,0238x + 0,0081$ | $y = 0,0375x + 0,1451$ |
| Na | $y = 6037x - 1725,2$ | $y = 7012x + 4288,1$ |
| K | $y = 243,13x + 333,76$ | $y = 288,7x + 1936,3$ |
| Zn | $y = 14415x - 153,53$ | $y = 14520x + 819,63$ |
| Fe | $y = 20439x + 4042,4$ | $y = 21340x + 12867$ |
| PB | $y = 1462,7x - 24,634$ | $y = 1539,6x + 74,287$ |

CAPÍTULO 7

TESTES DE HOMOGENEIDADE

7. Teste de Homogeneidade

Os valores de consenso de cada parâmetro estudado neste material candidato foram obtidos através de um programa interlaboratorial de ensaio de proficiência. Sendo assim, tal material distribuído deveria ser o mais homogêneo possível para evitar erros decorrentes de problemas com amostragem.

Para verificar se o material apresentava-se realmente homogêneo, foram conduzidos dois testes de homogeneidade: o teste de homogeneidade intramostral e o de homogeneidade interamostral.

7.1 Teste de Homogeneidade intramostral

O teste de homogeneidade intramostral verifica se há diferença entre as porções amostradas dentro de um mesmo frasco.

Do grupo de 10 frascos sorteados para o teste de homogeneidade interamostral, um deles foi sorteado para a realização deste teste de homogeneidade intramostral. Para tanto, foram feitas 6 réplicas autênticas de 250 mg cada.

Os resultados das determinações estão apresentados na tabela 7.1.

Tabela 7.1. Resultados das repetições para o teste de homogeneidade intramostral.

| Analito | Repetição 1 | Repetição 2 | Repetição 3 | Repetição 4 | Repetição 5 | Repetição 6 |
|---------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Cu | 775,87 | 816,11 | 786,49 | 777,94 | 793,62 | 804,59 |
| Mn | 1748,19 | 1722,85 | 1552,27 | 1574,62 | 1567,79 | 1587,03 |

| | | | | | | |
|----|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Fe | 2556,16 | 2627,57 | 2445,45 | 2611,76 | 2580,16 | 2584,24 |
| Zn | 122,83 | 122,16 | 123,38 | 117,78 | 125,50 | 128,56 |
| Na | 77,91 | 78,71 | 82,22 | 79,64 | 81,44 | 79,98 |
| Mg | 11,15 | 11,19 | 11,14 | 11,32 | 11,29 | 11,28 |
| P | 83,64 | 83,68 | 84,30 | 83,72 | 84,76 | 85,12 |
| Ca | 188,28 | 193,33 | 193,37 | 190,50 | 197,85 | 194,15 |
| K | 31,84 | 33,91 | 33,01 | 33,25 | 33,21 | 33,50 |
| Cd | 413,20 | 326,70 | 359,10 | 357,30 | 352,40 | 361,80 |
| As | 505,16 | 514,55 | 677,93 | 664,79 | 617,84 | 661,08 |
| PB | 23,42 | 22,82 | 20,42 | 21,02 | 24,92 | 25,52 |

Para cada analito foi aplicado o teste de Grubbs para a exclusão de *outliers*. Contudo, a um nível de 95% de confiança, nenhum *outlier* foi encontrado, sugerindo que os dados estão homogêneos.

No teste de Grubbs, compara-se o valor da razão entre a diferença de cada resultado obtido (x_i) e a média de todos os resultados (\bar{X}) em relação ao desvio padrão (s). Caso o valor desta razão seja maior que o valor crítico tabelado, então a presença de um valor *outlier* é comprovada a um nível de significância de 95% (GRUBBS, 1969).

$$G = \frac{[x_i - \bar{X}]}{s} \quad (7.1)$$

7.2 Teste de Homogeneidade interamostral

O teste de homogeneidade interamostral verifica se todos os frascos preparados do material são realmente homogêneos. Para a realização deste teste foram sorteados 10 frascos do total de 400 frascos preparado e para cada frasco sorteado foram feitas 3 réplicas autênticas de 250 mg cada.

O teste de Cochran leva em consideração uma razão entre variâncias: a variância máxima obtida ($s^2_{m\acute{a}x}$) e a soma de todas as variâncias ($\sum_{i=1}^p s_i^2$).

Quando o valor obtido por esta razão for maior do que o valor crítico tabelado, está explícito a presença de um *outlier*, a um nível de 95% de confiança.

$$C = \frac{s_{m\acute{a}x}^2}{\sum_{i=1}^p s_i^2} \quad (7.2)$$

Para determinar a homogeneidade das amostras, primeiramente foi realizada uma análise de variância ANOVA *one-way* e o $F_{cr\acute{i}tico}$ foi comparado ao $F_{anal\acute{i}tico}$.

A hipótese nula H_0 era a de que não havia diferença significativa, com intervalo de confiança de 95% entre os valores das determinações em cada um dos frascos amostrados. A hipótese alternativa H_1 era a de que havia diferença significativa com um intervalo de confiança de 95% entre os frascos amostrados.

Quando o $F_{cr\acute{i}tico}$ é maior que o $F_{anal\acute{i}tico}$, aceita-se H_0 e o material é considerado homogêneo. Ao invés disso, quando $F_{cr\acute{i}tico}$ é menor que o $F_{anal\acute{i}tico}$, rejeita-se H_0 e o material não é considerado homogêneo.

A seguir são apresentados os gráficos de homogeneidade interamostral para cada parâmetro avaliado. Neles, tem-se as réplicas, os limites superiores e inferiores de alerta (LSA e LIA) e os limites superiores de inferiores de confiança a 95% (LSC e LIC).

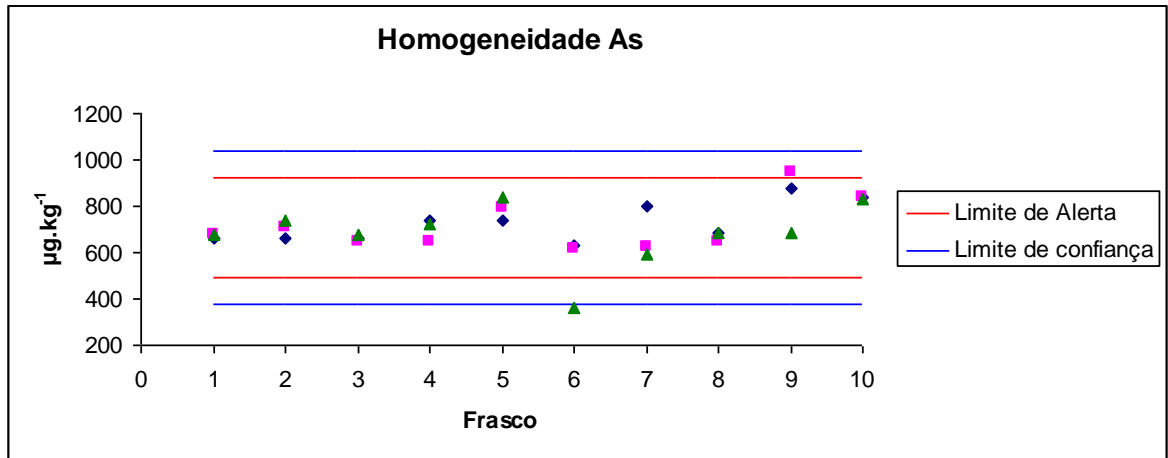


Figura 7.1 Homogeneidade interamostral para o arsênio

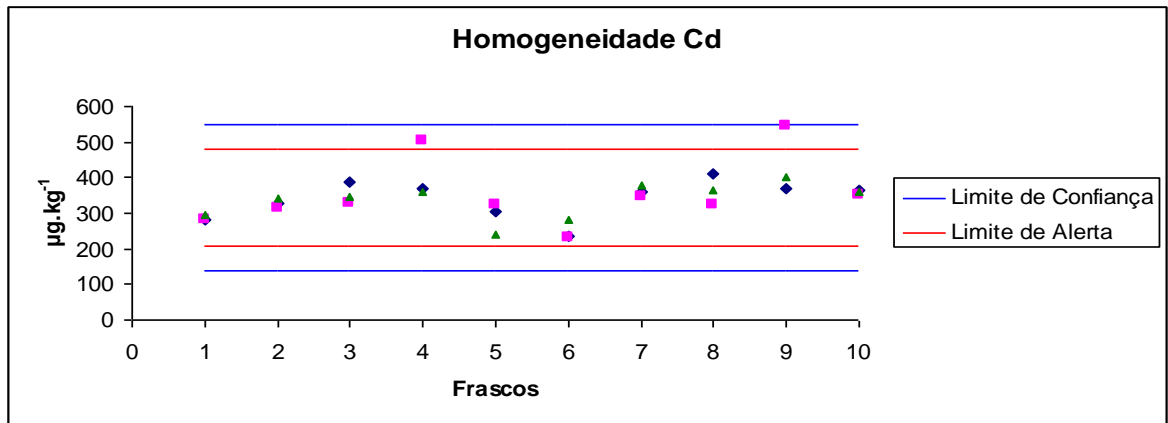


Figura 7.2 Homogeneidade interamostral para o cádmio

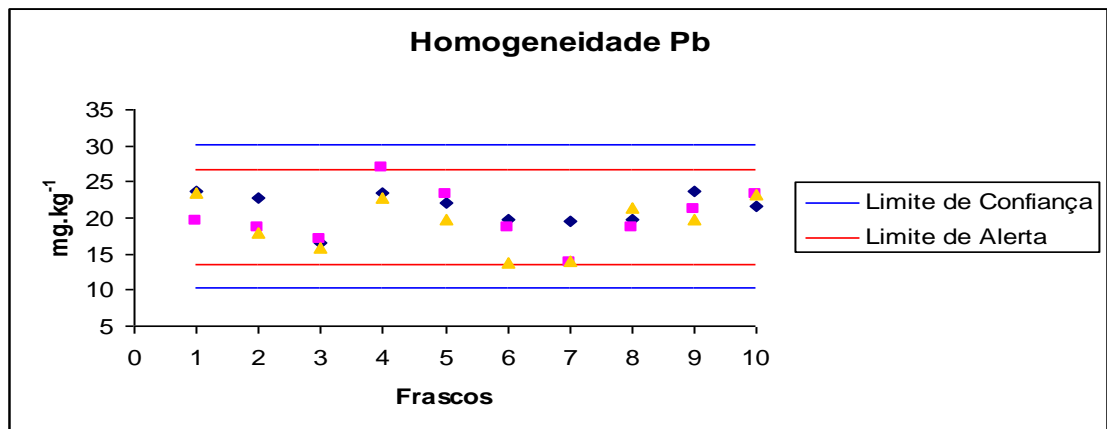


Figura 7.3 Homogeneidade interamostral para o chumbo

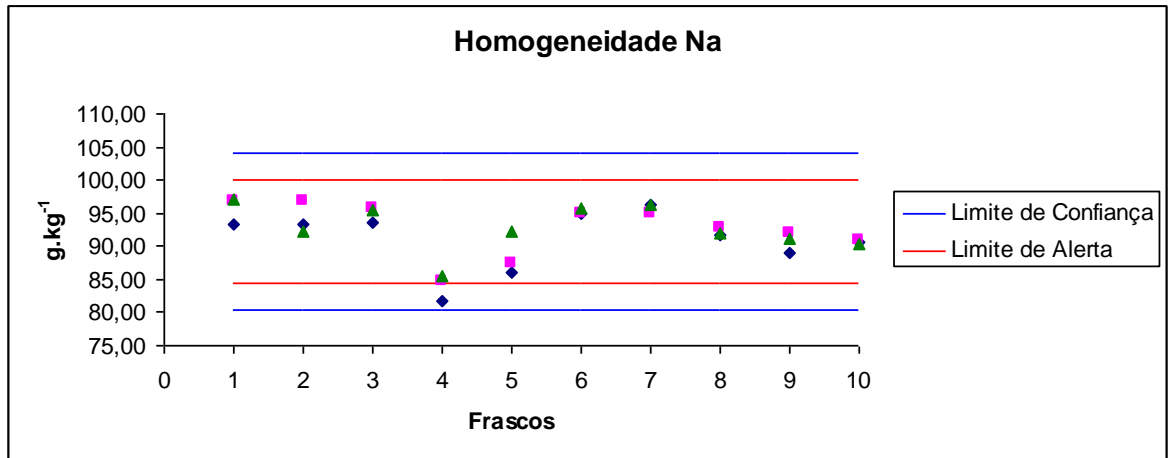


Figura 7.4 Homogeneidade interamostral para o sódio

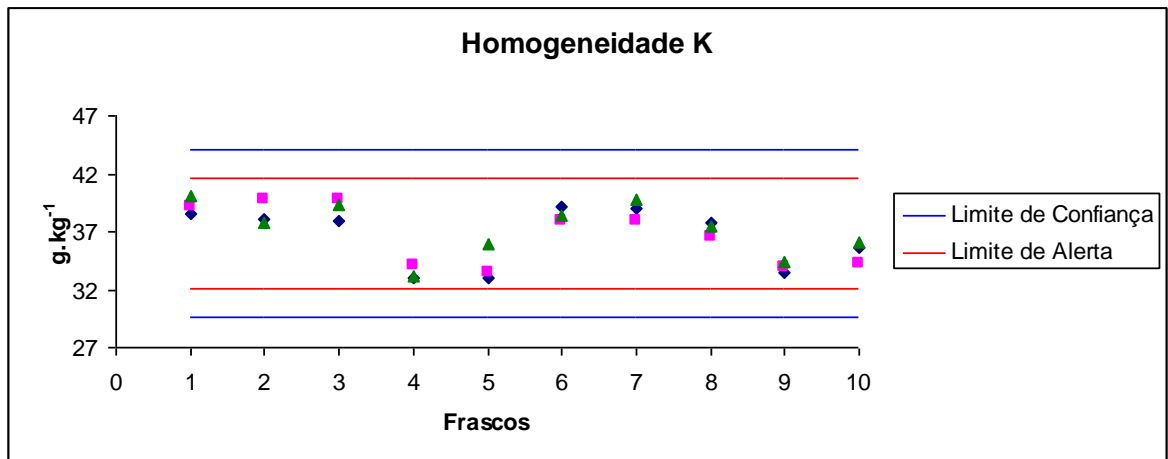


Figura 7.5 Homogeneidade interamostral para o potássio

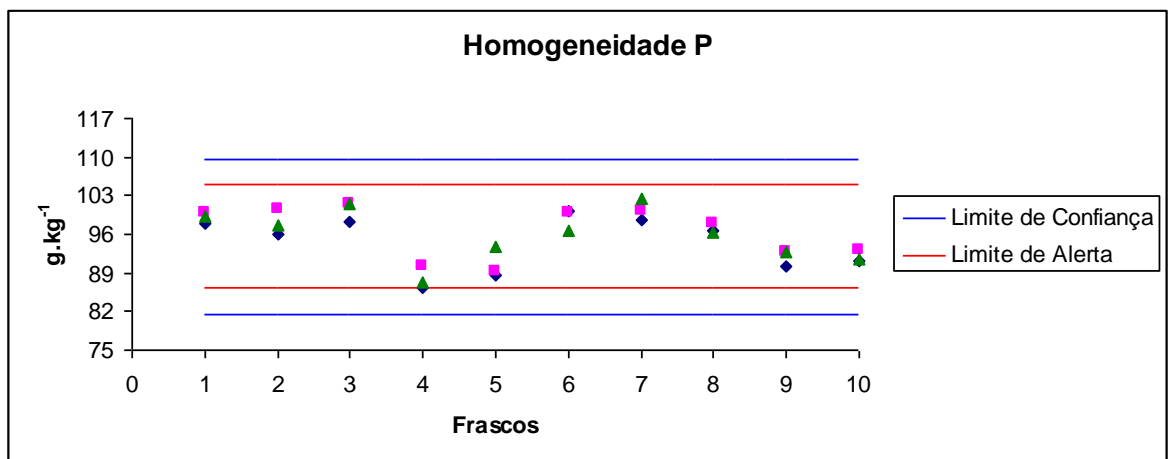


Figura 7.6 Homogeneidade interamostral para o fósforo

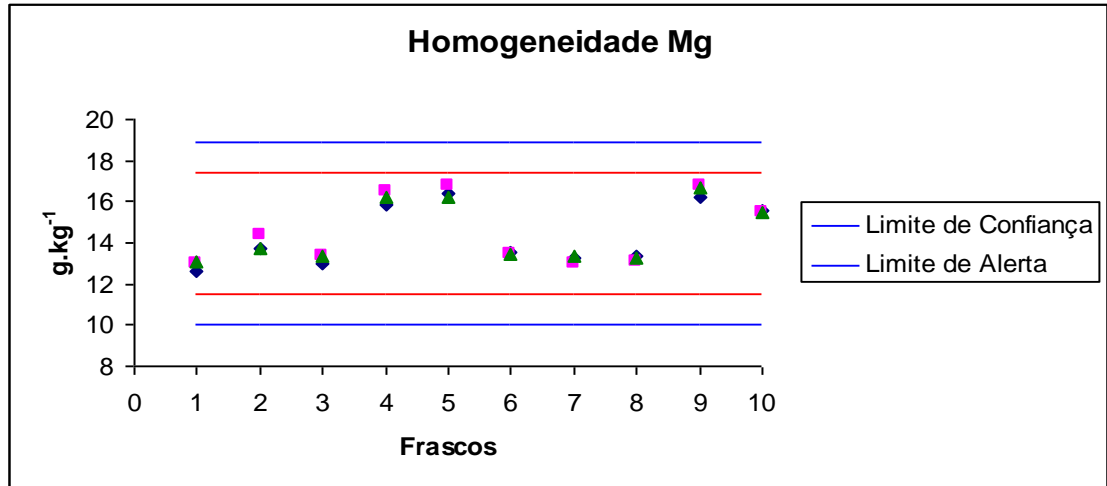


Figura 7.7 Homogeneidade interamostral para o magnésio

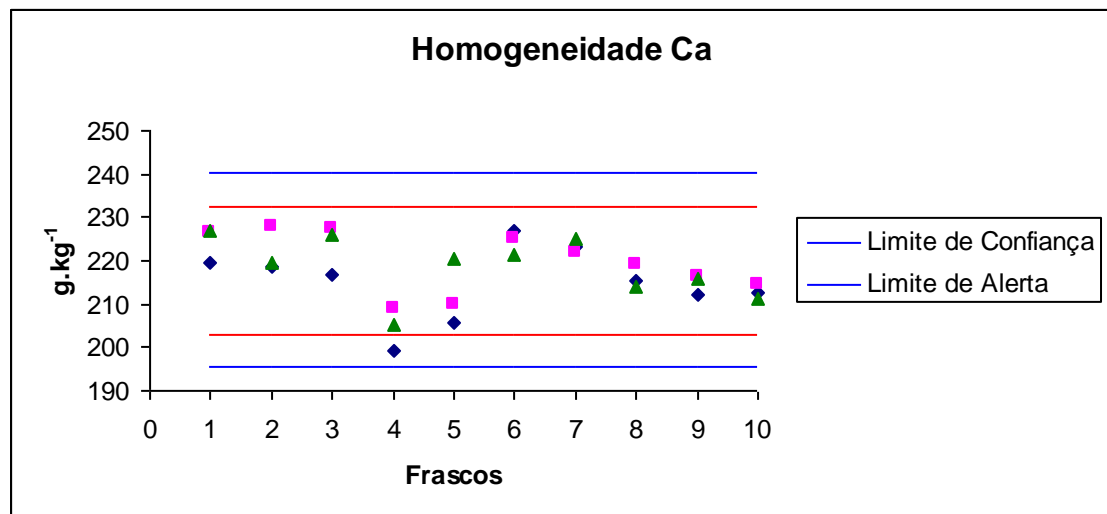


Figura 7.8 Homogeneidade interamostral para cálcio

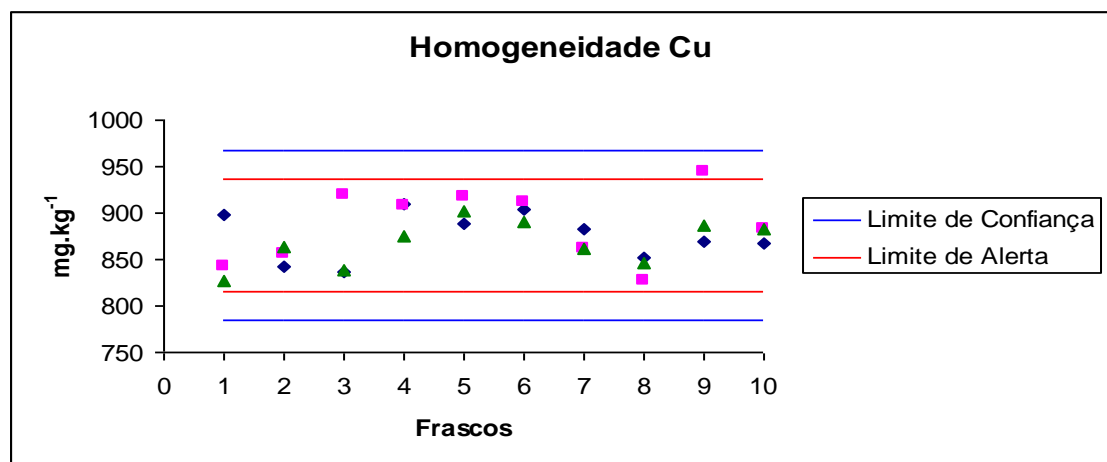


Figura 7.9 Homogeneidade interamostral para o cobre

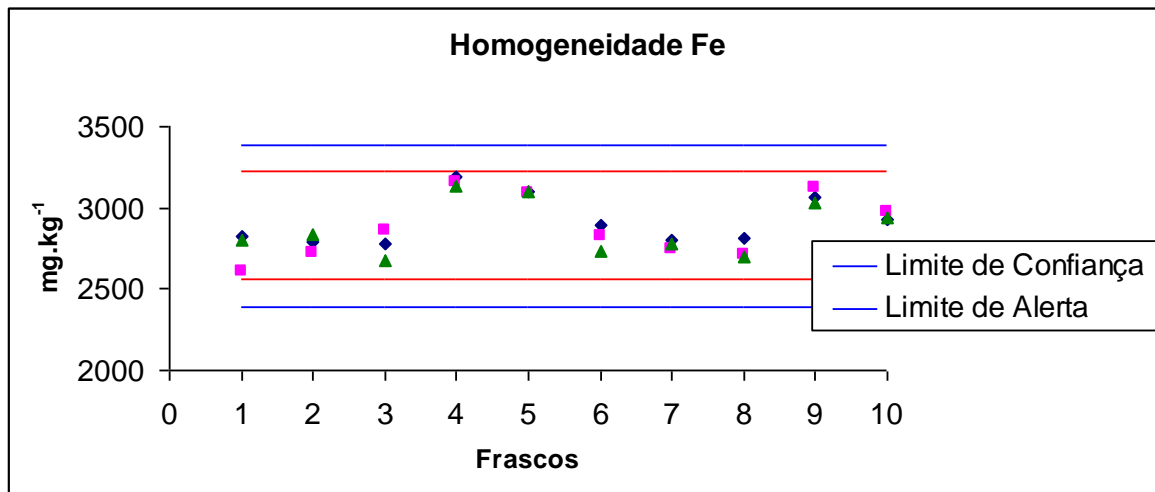


Figura 7.10 Homogeneidade interamostral para o ferro

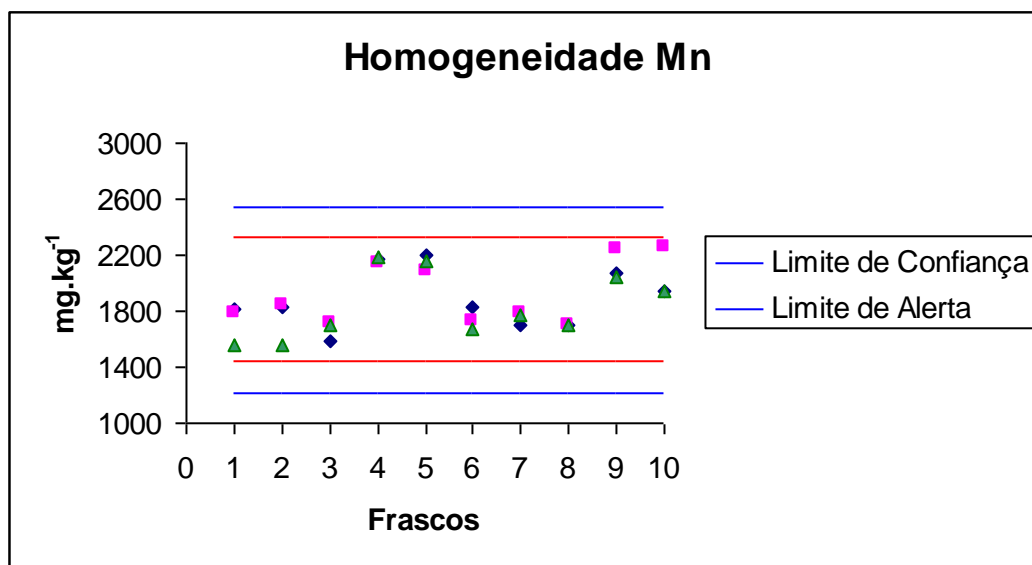


Figura 7.11 Homogeneidade interamostral para o manganês

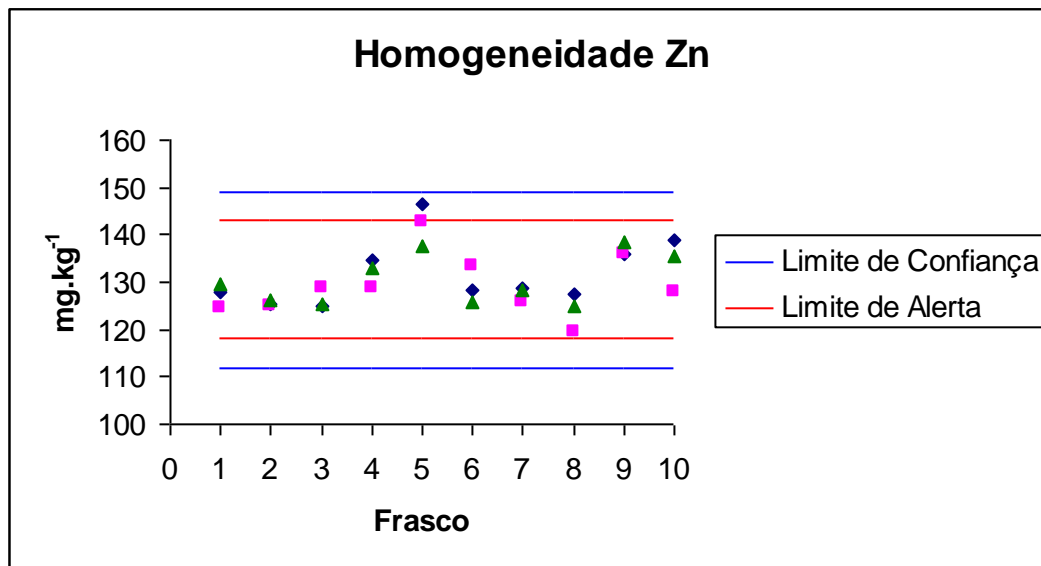


Figura 7.12 Homogeneidade interamostral para o zinco

Ao analisar os gráficos apresentados, percebe-se que, com exceção de uma réplica do frasco 9 para o contaminante Cd, todas as outras réplicas de todos os parâmetros estudados estão compreendidas no intervalo dos limites superiores e inferiores de confiança.

Desta forma, pode-se observar que os dados estão distribuídos ao redor da média de uma forma aleatória, não sugerindo a existência de tendência, fruto de erros sistemáticos.

A seguir, foram realizados os teste de Grubbs e Cochran.

Algumas réplicas foram excluídas, contudo, nenhum frasco foi retirado das avaliações.

A tabela 7.2 mostra os dados da ANOVA *one-way* obtidos para o teste de homogeneidade interamostral do material candidato.

Tabela 7.2 Dados da ANOVA *one- way* para o teste de homogeneidade interamostral.

| Analito | Fonte de Variação | <i>SQ</i> | <i>gl</i> | <i>MQ</i> | <i>Fan</i> | <i>Fcrit</i> |
|---------|-------------------|--------------|-----------|-------------|------------|--------------|
| Na | Entre grupos | 353,90 | 9 | 39,32 | 13,16 | 2,42 |
| | Dentro grupos | 56,75 | 19 | 2,99 | | |
| | Total | 410,66 | 28 | | | |
| P | Entre grupos | 614,86 | 9 | 68,32 | 29,85 | 2,59 |
| | Dentro grupos | 34,33 | 15 | 2,29 | | |
| | Total | 649,19 | 24 | | | |
| Ca | Entre grupos | 1276,67 | 9 | 141,85 | 16,27 | 2,49 |
| | Dentro grupos | 148,17 | 17 | 8,72 | | |
| | Total | 1424,84 | 26 | | | |
| K | Entre grupos | 128258159,87 | 9 | 14250906,65 | 72,27 | 2,46 |
| | Dentro grupos | 3549349,86 | 18 | 197186,10 | | |
| | Total | 131807509,73 | 27 | | | |
| Mg | Entre grupos | 49,18 | 9 | 5,46 | 89,63 | 2,42 |
| | Dentro grupos | 1,16 | 19 | 0,06 | | |
| | Total | 50,34 | 28 | | | |
| Mn | Entre grupos | 1265620,96 | 9 | 140624,55 | 19,30 | 2,54 |
| | Dentro grupos | 116609,46 | 16 | 7288,09 | | |
| | Total | 1382230,42 | 25 | | | |
| Cu | Entre grupos | 17215,48 | 9 | 1912,83 | 4,74 | 2,46 |
| | Dentro grupos | 7264,38 | 18 | 403,58 | | |
| | Total | 24479,86 | 27 | | | |
| Fe | Entre grupos | 735499,34 | 9 | 81722,15 | 91,95 | 2,46 |
| | Dentro grupos | 15998,25 | 18 | 888,79 | | |

| | | | | | | |
|----|---------------|--------------|----|-------------|-------|------|
| | Total | 751497,59 | 27 | | | |
| | Entre grupos | 1086,17 | 9 | 120,69 | 13,85 | 2,42 |
| Zn | Dentro grupos | 165,51 | 19 | 8,71 | | |
| | Total | 1251,68 | 28 | | | |
| | Entre grupos | 143389,64 | 9 | 15932,18 | 3,80 | 2,46 |
| As | Dentro grupos | 75399,67 | 18 | 4188,87 | | |
| | Total | 218789,31 | 27 | | | |
| | Entre grupos | 75825,26 | 9 | 8425,03 | 5,34 | 2,46 |
| Cd | Dentro grupos | 28393,08 | 18 | 1577,39 | | |
| | Total | 104218,35 | 27 | | | |
| | Entre grupos | 252243854,68 | 9 | 28027094,96 | 7,72 | 2,46 |
| Pb | Dentro grupos | 65361668,00 | 18 | 3631203,78 | | |
| | Total | 317605522,68 | 27 | | | |

Uma análise preliminar dos dados sugere que o material candidato não tem sua homogeneidade garantida, uma vez que nenhum dos analitos tem o $F_{crítico}$ menor do que o $F_{analítico}$.

Contudo, quando existe uma variabilidade muito grande em um conjunto de dados, a ANOVA pode ser muito restritiva para a tomada de uma decisão, isto é, rejeitar um material como não homogêneo quando este pode ser considerado na realidade como homogêneo.

Desta forma, foram utilizadas as recomendações do novo procedimento estatístico proposto no Protocolo Internacional Harmonizado para Ensaio de Proficiência para rever a homogeneidade do material.

Neste novo procedimento, o desvio padrão da amostragem S_{sam} é comparado com o desvio padrão crítico $\sigma_{crít}$, obtido através dos dados de um ensaio interlaboratorial.

O desvio padrão de amostragem refere-se à equação 7.3:

$$S_{sam} = \frac{\left(\frac{V_s}{2} - S_{an}\right)}{2} \quad (7.3)$$

onde $\frac{V_s}{2}$ é a soma de quadrados entre grupos e S_{an} é a soma de quadrados dentro grupos, obtidos da tabela ANOVA.

O desvio padrão crítico σ_{crit} é obtido através da equação 7.4.

$$\sigma_{crit.} = F_1 \sigma_{all}^2 + F_2 s_{an}^2 \quad (7.4)$$

onde o desvio padrão total (σ_{all}) é dado por $\sigma_{all}^2 = (0,3 \sigma_p)^2$.

O desvio padrão alvo (σ_p) é obtido por meio da equação de Horwitz modificada por Thompson.

Esta possui duas versões.

A primeira se aplica a concentrações entre 120 µg/L e 13,8% :

$$\sigma_p = 0,02.c^{0,8495}/mr \quad (7.5)$$

A segunda versão se aplica a concentrações maiores que 13,8% :

$$\sigma_p = 0,01.c^{0,5}/mr \quad (7.6)$$

Para ambas as versões tem-se que σ_p = desvio padrão alvo; c = concentração média; mr = razão adimensional da massa; % = 10^{-2} .

Os valores de F1 e F2 são obtidos através da equação 7.7.

$$F_1 = \frac{\chi_{m-1,0,95}^2}{(m-1)} \quad (7.7)$$

onde $\chi_{m-1,0,95}^2$ é o valor excedido com probabilidade 0,05 de uma variação aleatória *chi-quadrado* com m-1 graus de liberdade.

$$F_2 = \frac{(F_{m-1,0,95} - 1)}{3} \tag{7.8}$$

onde $F_{m-1,0,95}$ é o valor excedido com probabilidade de 0,05 de uma distribuição aleatória em uma distribuição F e m-1 e m graus de liberdade .

Ao final, compara-se o valor de S_{sam}^2 e $\sigma_{crít}$.

Quando $S_{sam}^2 > \sigma_{crít}$ há evidências que o desvio padrão da amostragem excede o desvio permitido para garantir a homogeneidade do material.

Em contrapartida, quando tem-se a situação $S_{sam}^2 < \sigma_{crít}$ a homogeneidade do material está garantida.

A tabela 7.3 mostra os valores obtidos para o teste de homogeneidade interamostral.

Tabela 7.3 Parâmetros utilizados no teste de homogeneidade interamostral

| Analito | M | σ | σ_{all}^2 | F1 | F2 | s^2_{sam} | s^2_{an} | $\sigma_{crít}$ |
|---------|----------|----------|------------------|------|------|-------------|------------|-----------------|
| Ca | 187,77 | 1,37029 | 0,168993 | 1,88 | 1,01 | 564,25 | 21955,24 | 22175,11 |
| Cu | 803,79 | 11,75 | 12,42055 | 1,88 | 1,01 | 4975,55 | 52771214 | 53298949 |
| Fe | 2725,00 | 33,14 | 98,85291 | 1,88 | 1,01 | 359750,55 | 2,56E+08 | 2,59E+08 |
| K | 35650,00 | 0,60 | 0,0324 | 1,88 | 1,01 | 62354405,01 | 1,26E+13 | 1,27E+13 |
| Mg | 10,78 | 0,30 | 0,008176 | 1,88 | 1,01 | 24,01 | 1,341846 | 1,370635 |
| Mn | 1566,71 | 20,71 | 38,60025 | 1,88 | 1,01 | 574505,75 | 1,36E+10 | 1,37E+10 |
| Na | 80,10 | 0,89 | 0,0729 | 1,88 | 1,01 | 148,57 | 3221,107 | 3253,455 |
| P | 84,52 | 0,92 | 0,0784 | 1,88 | 1,01 | 290,27 | 1178,507 | 1190,44 |
| Zn | 134,50 | 2,57 | 0,595644 | 1,88 | 1,01 | 460,33 | 27392,04 | 27667,08 |
| As | 483,65 | 7,63 | 5,239892 | 1,88 | 1,01 | 33994,98 | 5,69E+09 | 5,74E+09 |
| Cd | 425,35 | 6,84 | 4,212428 | 1,88 | 1,01 | 23716,09 | 8,06E+08 | 8,14E+08 |
| Pb | 18555,00 | 169,08 | 2572,866 | 1,88 | 1,01 | 93441093,34 | 4,27E+15 | 4,31E+15 |

***: M: mediana dos dados obtidos no ensaio colaborativo interlaboratorial, σ : desvio padrão obtido pela equação de Horwitz modificada por Thompson, σ_{all}^2 : quadrado da variância da amostragem, F1 e F2 parâmetros obtidos através da**

distribuição *chi-quadrado* e distribuição F, s^2_{sam} : quadrado do desvio padrão de amostragem, s^2_{an} : quadrado do desvio analítico, σ_{crit} desvio padrão crítico.

Desta vez, ao analisar a tabela verifica-se que somente para o Mg não foi possível ter a homogeneidade garantida.

Esta situação reflete a dificuldade encontrada no preparo da amostra.

Uma vez que a solubilização da amostra não foi total, tem-se uma diferença entre as quantificações obtidas e, ao realizar a análise de variância, o resultado aponta para um material não homogêneo.

Num segundo momento, compara-se os resultados obtidos por todos os laboratórios participantes do ensaio colaborativo.

As quantificações reportadas refletem a mesma dificuldade.

Contudo, ao comparar os desvios obtidos percebe-se que, com exceção do Mg, todos os desvios de amostragem se mostraram menores que o desvio máximo permitido para o ensaio colaborativo.

CAPÍTULO 8

TESTES DE ESTABILIDADE

8. Testes de Estabilidade

Existem dois tipos de estabilidade a serem considerados em materiais de referência: a estabilidade a curto prazo e a estabilidade a longo prazo.

8.1 Teste de estabilidade a curto prazo

No teste de estabilidade a curto prazo, o foco do estudo é verificar se existe alguma alteração nas características do material sobre condições de armazenamento que não sejam as ideais, por exemplo, uma situação de transporte.

Este teste pode ser conduzido por até quatro semanas em temperaturas que podem variar de 70°C a -50°C (ABNT ISO/GUIDE 35, 2006).

Para este estudo, 3 frascos do material candidato foram sorteados e acomodados dentro de um aparato no qual a temperatura e a umidade eram controlados.

Este aparato era composto por um recipiente de vidro com tampa de aproximadamente 40 cm de altura. Dentro deste, foi adicionado 2 L de água e 3 copos de 250 mL, contendo água também.

Sobre os copos, foi fixada uma peneira, que serviria de suporte para apoiar os 3 frascos sorteados para o teste. Desta maneira, pode-se obter um ambiente com 100% de umidade.

A temperatura foi fixada em 37°C, inserindo-se todo o aparato dentro de uma estufa com temperatura controlada.

Este sistema foi mantido durante 1 mês e, diariamente era feita a verificação da temperatura e da umidade.



Figura 8.1.1 Aparato utilizado para a realização de teste de estabilidade a curto prazo.

Após o período de um mês, foi feita a quantificação em triplicata dos analitos de interesse nos frascos sorteados.

A seguir, são mostrados os gráficos referente às réplicas de cada frasco por analito.

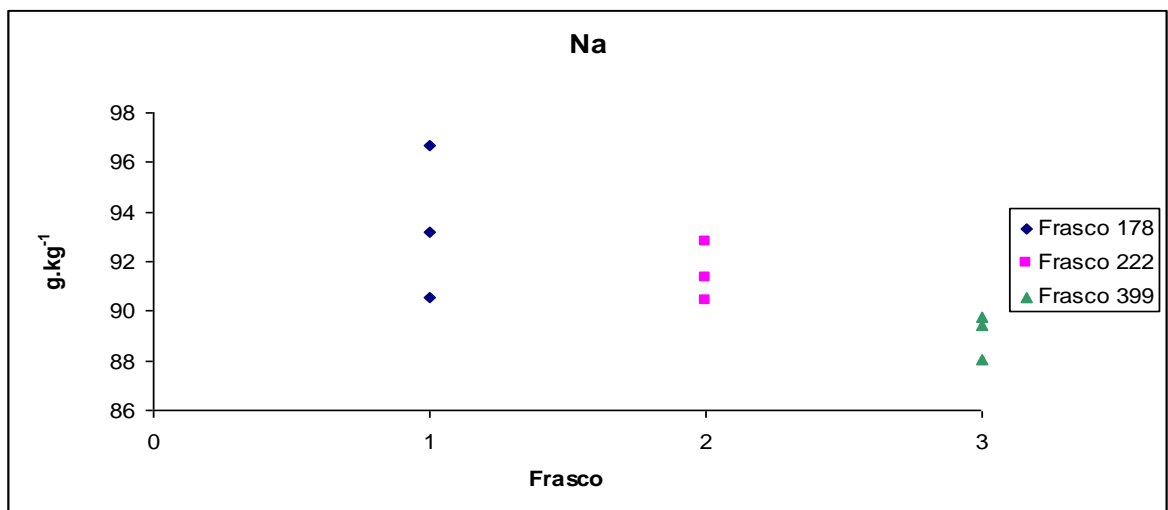


Figura 8.1 Réplicas para as quantificações de sódio após 1 mês.

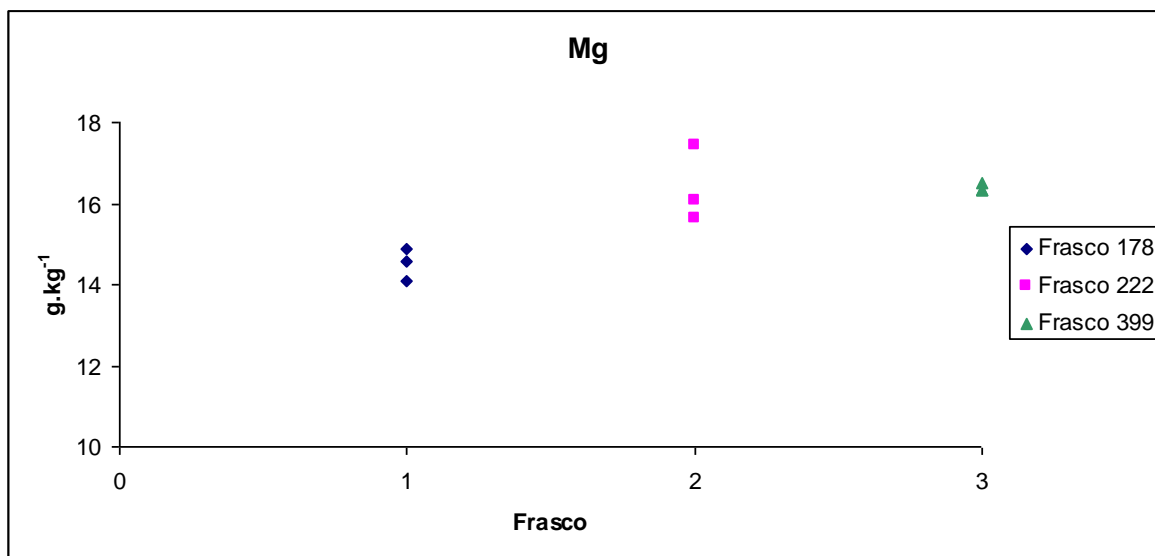


Figura 8.2 Réplicas para as quantificações de magnésio após 1 mês.

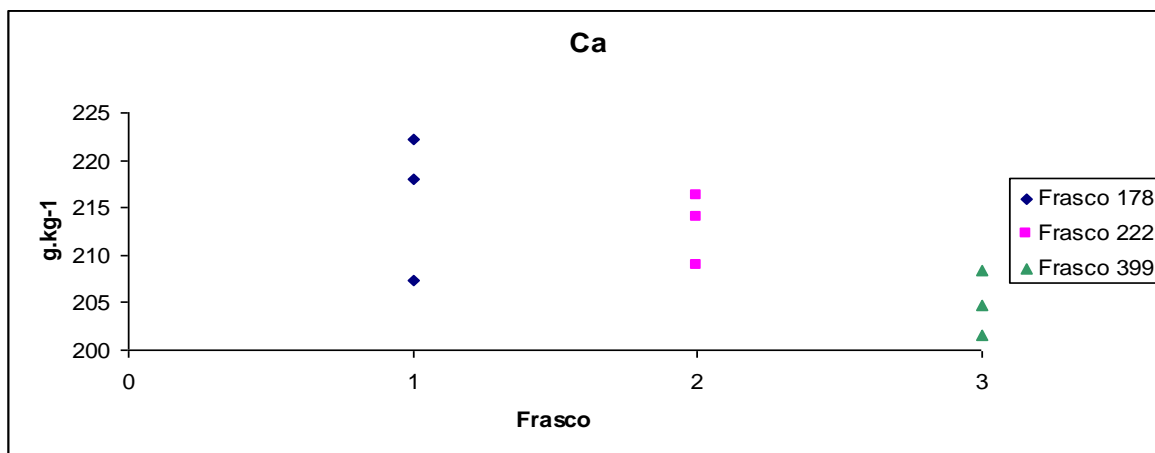


Figura 8.3 Réplicas para as quantificações de cálcio após 1 mês.

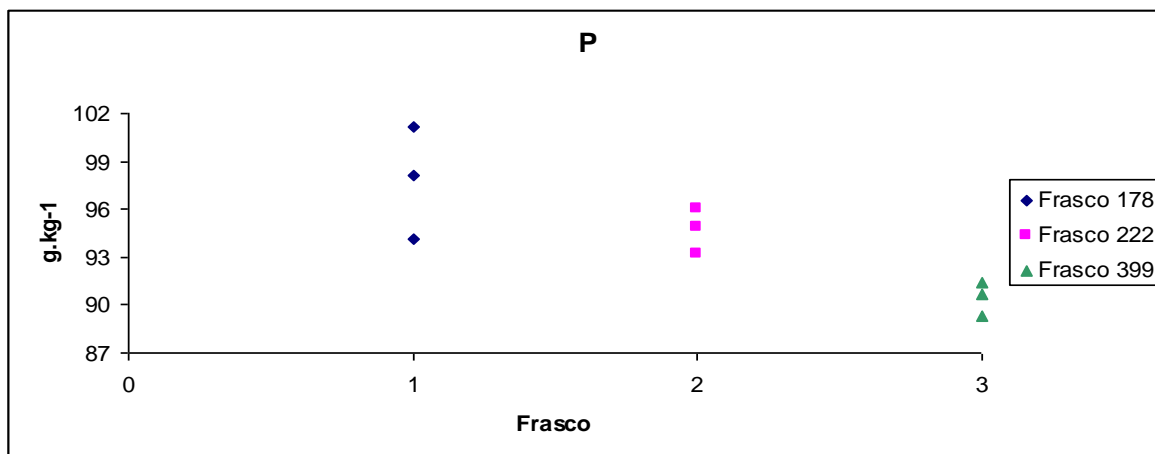


Figura 8.4 Réplicas para as quantificações de fósforo após 1 mês.

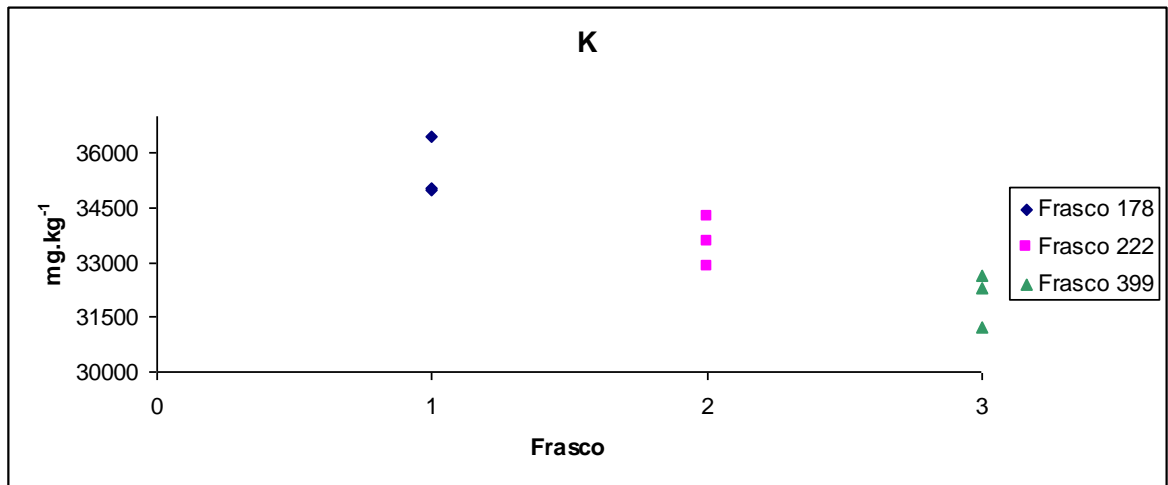


Figura 8.5 Repetições para as quantificações de potássio após 1 mês.

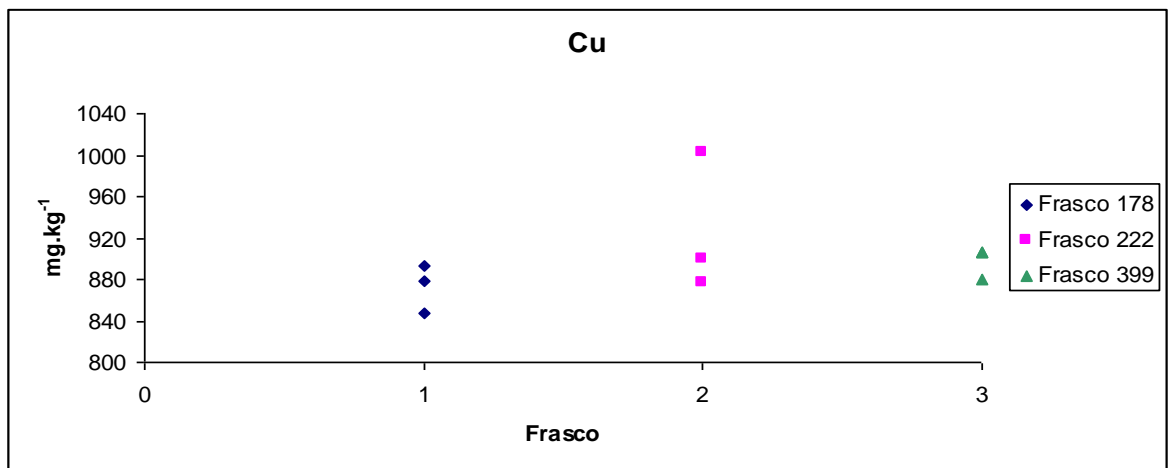


Figura 8.6 Réplicas para as quantificações de cobre após 1 mês.

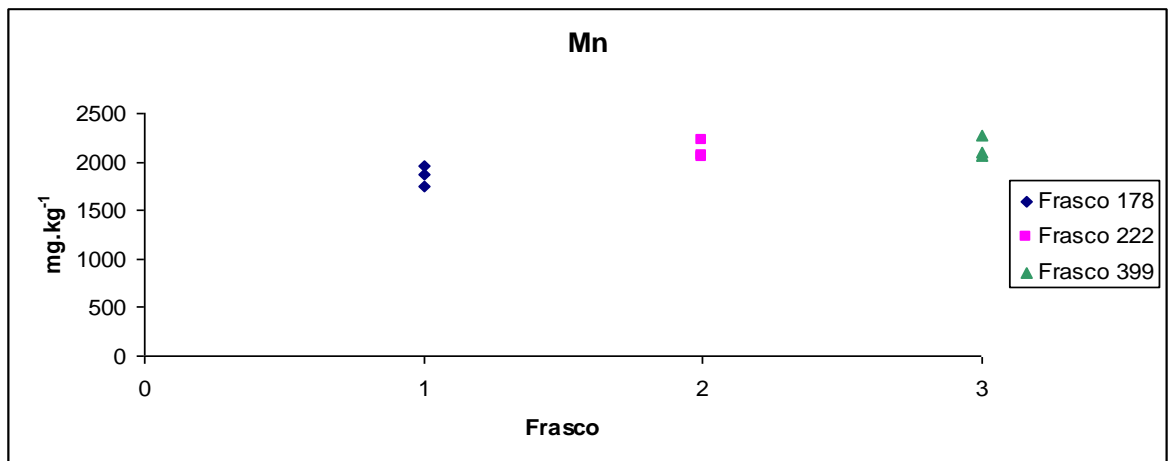


Figura 8.7 Réplicas para as quantificações de manganês após 1 mês.

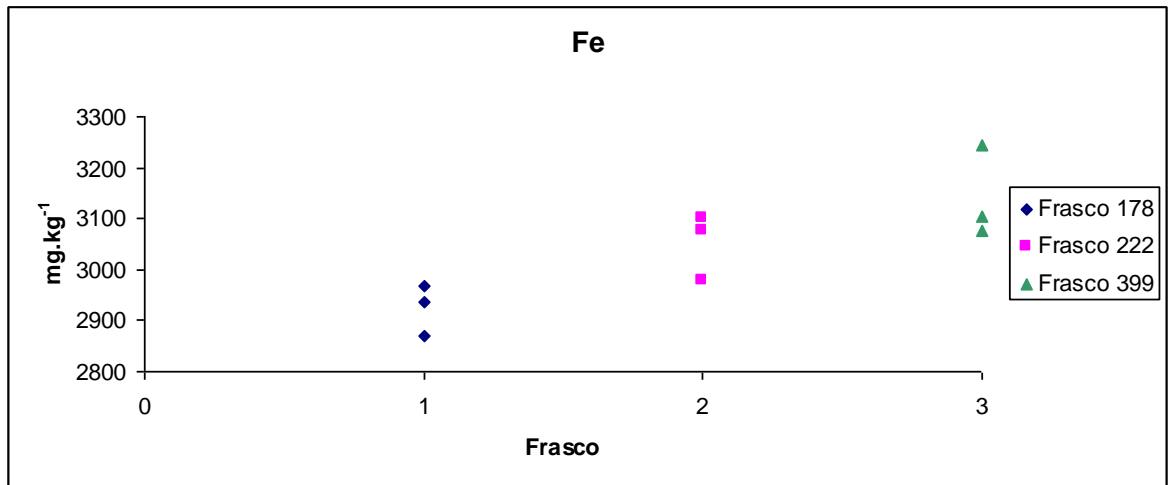


Figura 8.8 Réplicas para as quantificações de ferro após 1 mês.

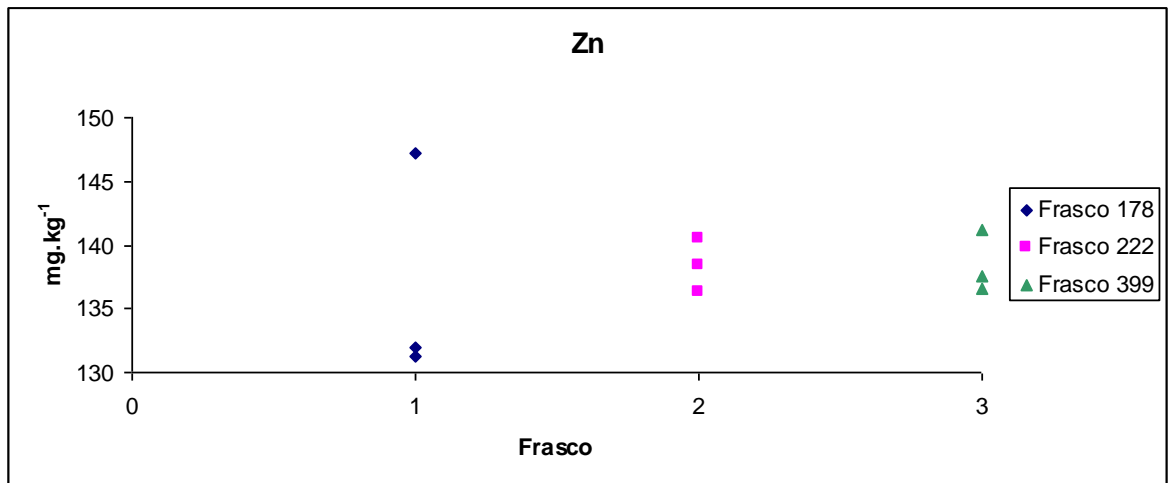


Figura 8.9 Réplicas para as quantificações de zinco após 1 mês.

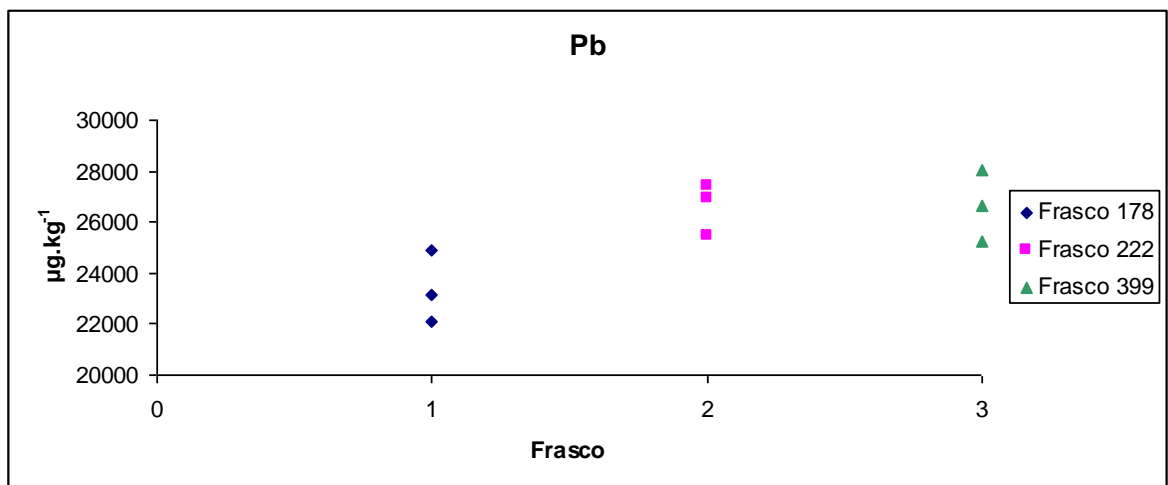


Figura 8.10 Réplicas para as quantificações de chumbo após 1 mês.

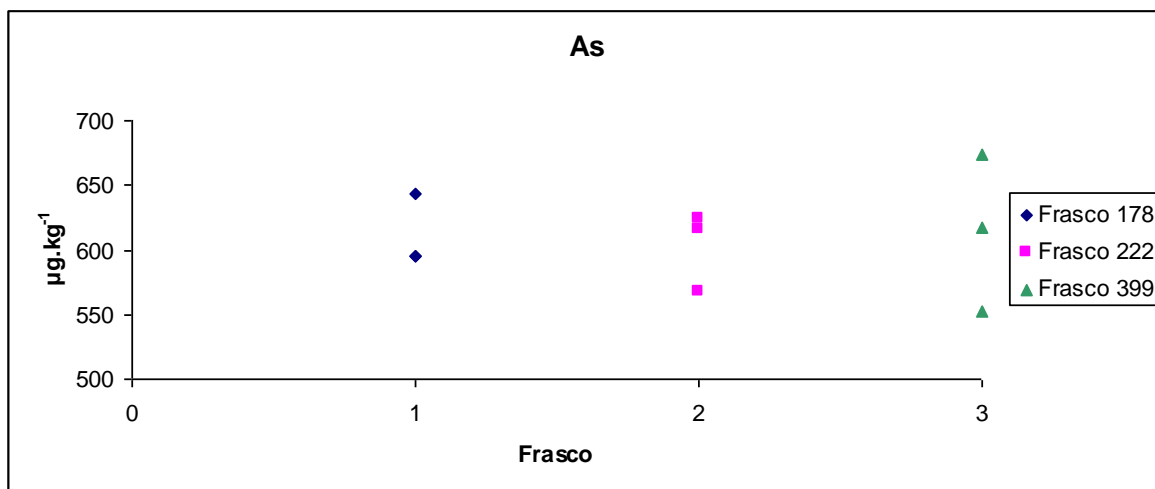


Figura 8.11 Réplicas para as quantificações de arsênio após 1 mês.

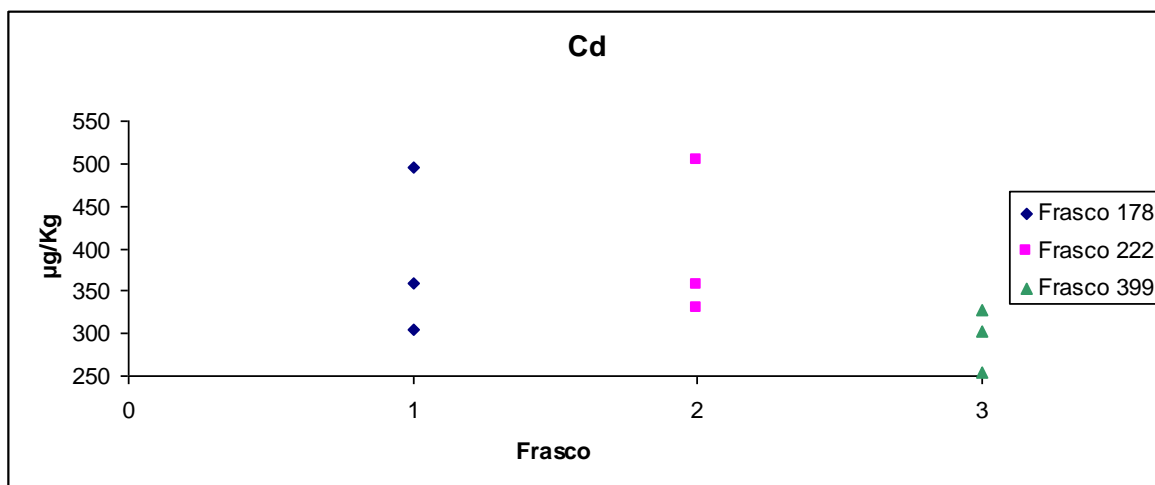


Figura 8.12 Réplicas para as quantificações de cádmio após 1 mês.

Para verificar se a estabilidade do material é adequada, o desvio encontrado na mudança de concentração dos analitos deve ser da ordem de $0,1\sigma_p$ (THOMPSON et al, 2006). A tabela 8.1 mostra os valores encontrados para analisar os resultados obtidos.

Foi calculada a mediana (M) de todas as repetições dos três frascos do teste, o desvio padrão (s) dessas determinações e o σ_p que se refere ao desvio obtido pela equação de Horwitz modificada por Thompson.

Tabela 8.1 Parâmetros utilizados para o teste de estabilidade a curto prazo.

| | Na | Mg | P | Ca | K | Cu | Mn | Fe | Zn | Pb | As | Cd |
|---------------|------|------|------|------|-------|------|------|------|------|-------|------|------|
| M | 91 | 16 | 94 | 209 | 33584 | 893 | 2063 | 3075 | 137 | 25420 | 616 | 330 |
| S | 2,57 | 1,07 | 3,74 | 6,72 | 1625 | 43 | 160 | 112 | 5 | 1962 | 37 | 86 |
| Σ_p | 0,89 | 0,30 | 0,92 | 1,37 | 0,60 | 12 | 21 | 33 | 2,57 | 169 | 7,63 | 6,84 |
| $0,1\sigma_p$ | 0,09 | 0,03 | 0,09 | 0,14 | 0,06 | 1,17 | 2,07 | 3,31 | 0,26 | 16,91 | 0,76 | 0,68 |

Ao analisar os dados da tabela, percebe-se que, para nenhum analito o desvio proposto σ_p como aceitável é obtido. Todos os desvios calculados são superiores a $0,1\sigma_p$.

É possível que o desvio decorrente da abertura da amostra esteja projetado neste teste também, assim como no teste de homogeneidade.

8.2 Teste de estabilidade a longo prazo

Assim como a homogeneidade, a estabilidade é uma característica fundamental do material de referência.

Por este estudo pode-se determinar o chamado “tempo de prateleira” ou seja, qual o período para o qual os valores certificados estão garantidos.

Para realizar este teste, 3 frascos foram sorteados e a cada 4 meses foi feita uma quantificação dos analitos em estudo, em triplicata, durante o período de 1 ano para os macro e micronutrientes e 8 meses para contaminantes.

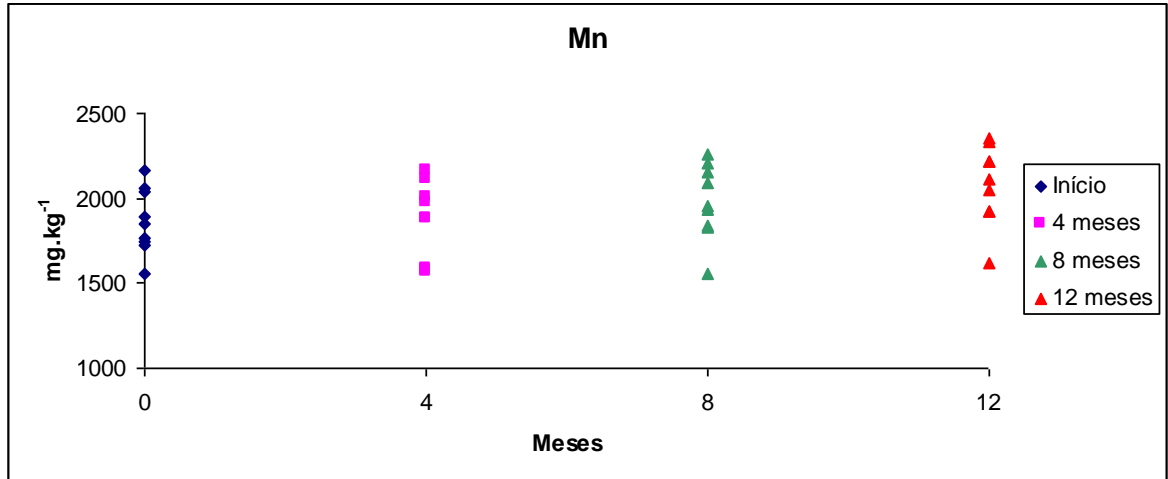


Figura 8.13 Estabilidade longo prazo para o manganês

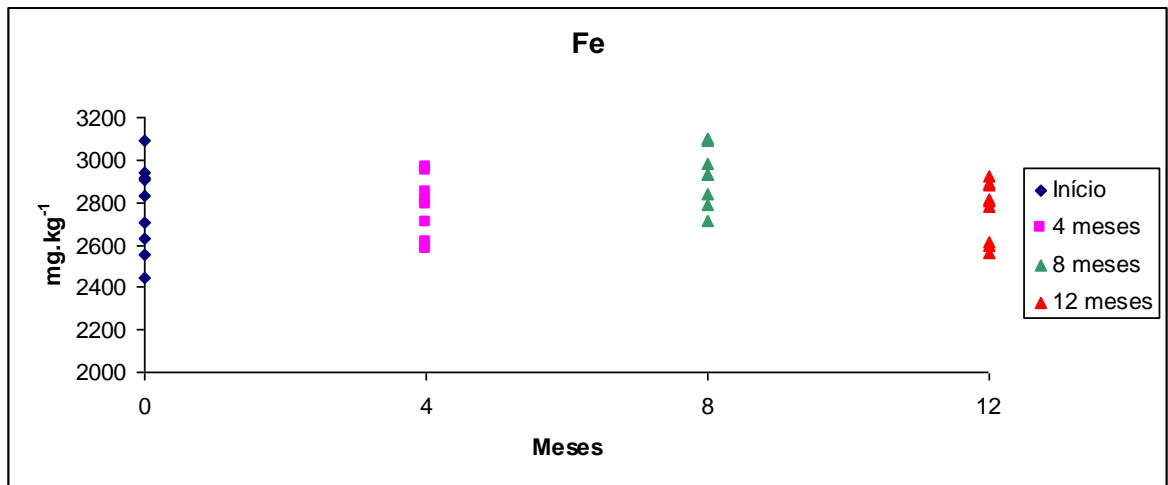


Figura 8.14 Estabilidade longo prazo para ferro

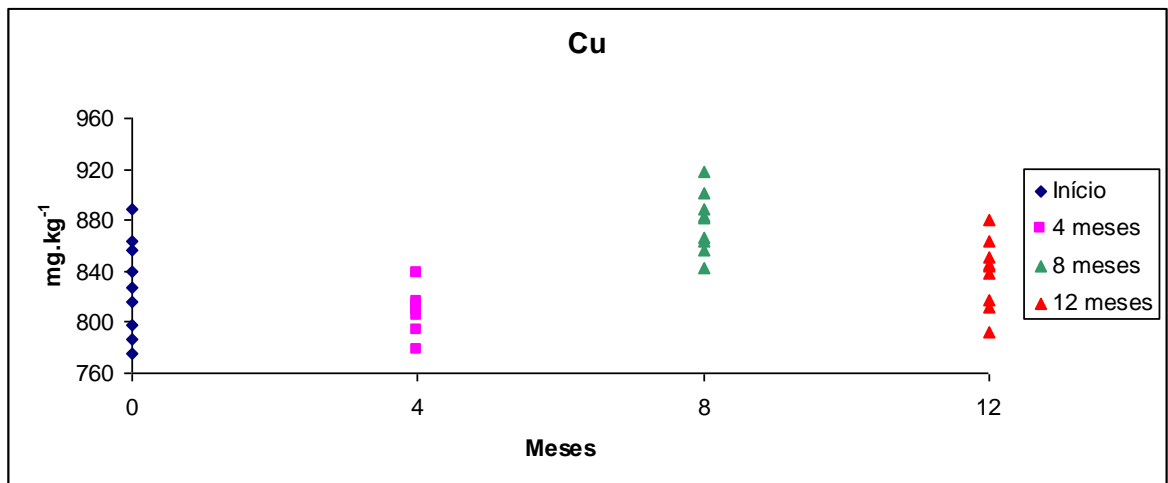


Figura 8.15 Estabilidade longo prazo para cobre

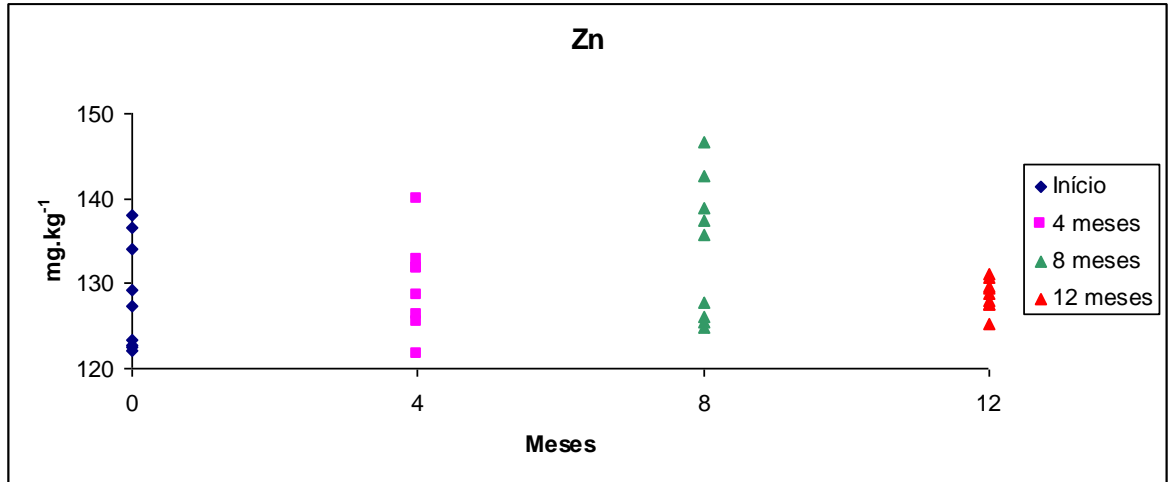


Figura 8.16 Estabilidade longo prazo para zinco.

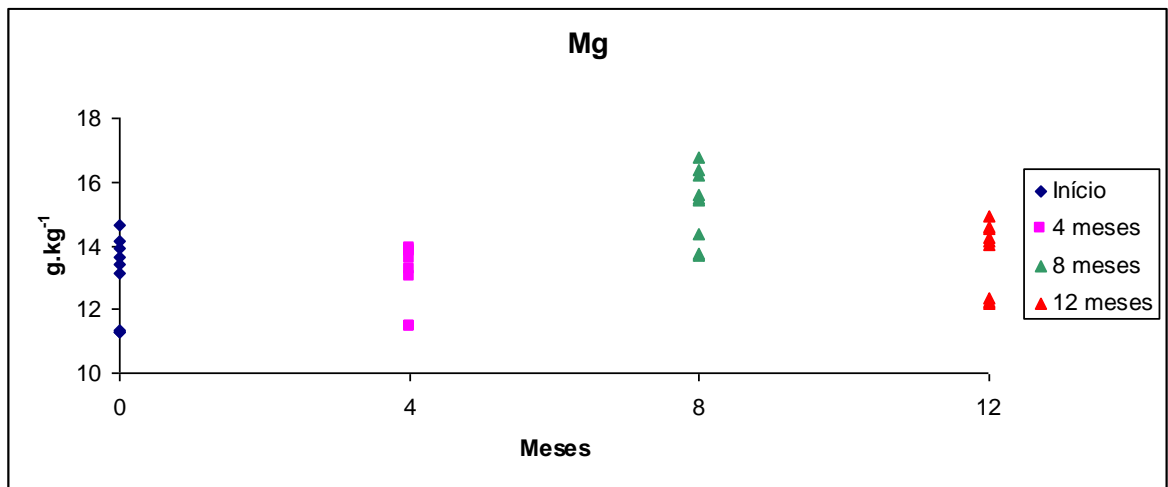


Figura 8.17 Estabilidade longo prazo para magnésio

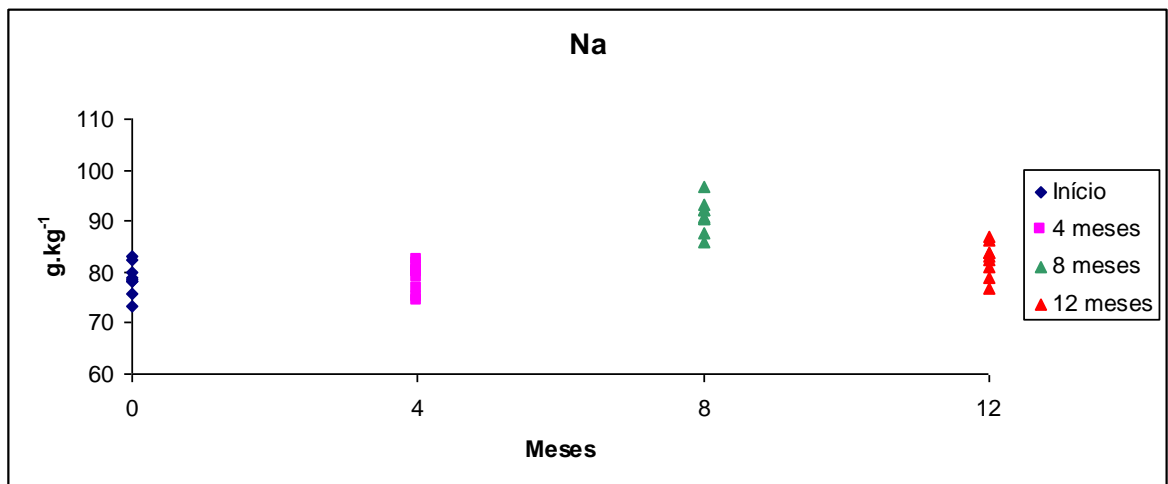


Figura 8.18 Estabilidade longo prazo para sódio

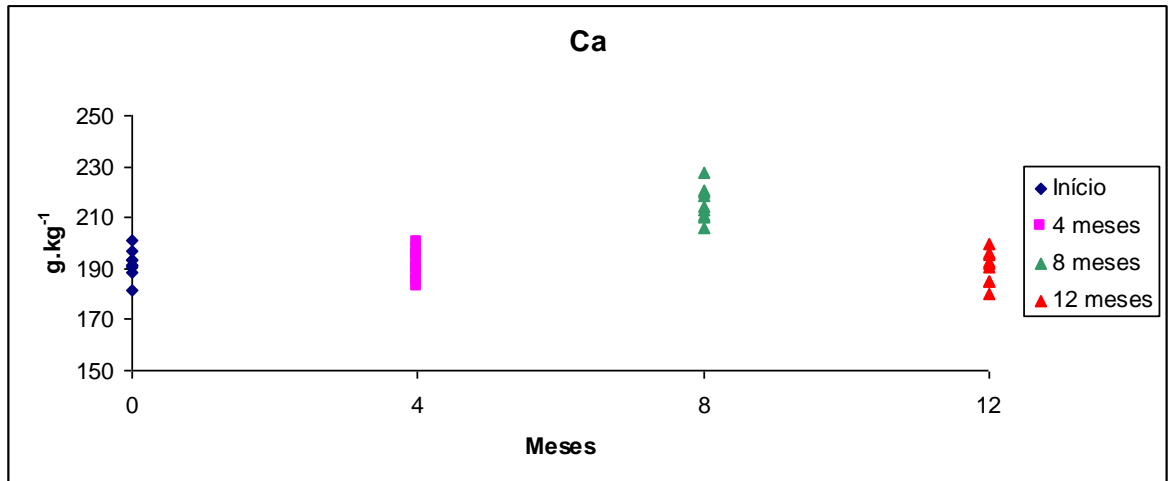


Figura 8.19 Estabilidade longo prazo para cálcio

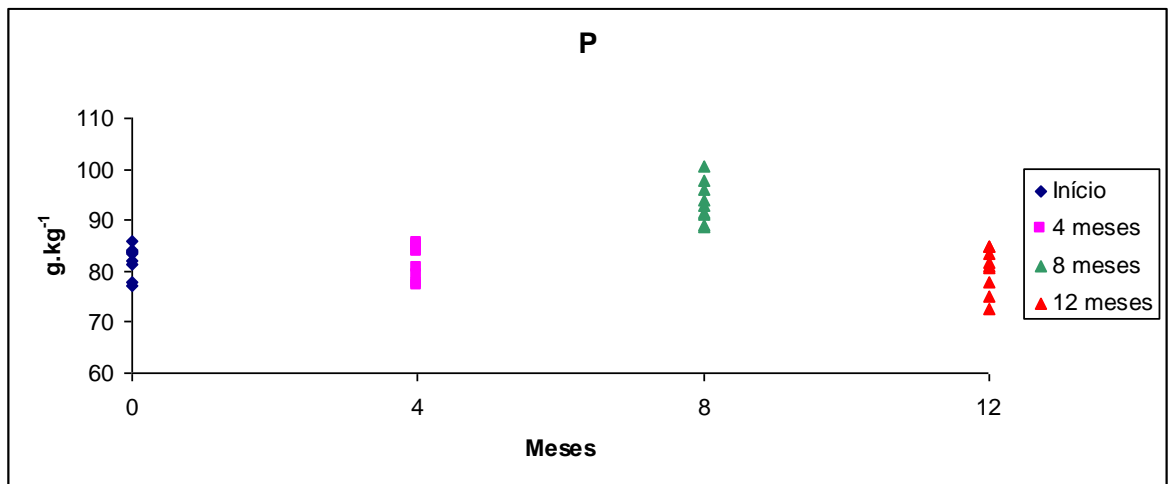


Figura 8.20 Estabilidade longo prazo para fósforo

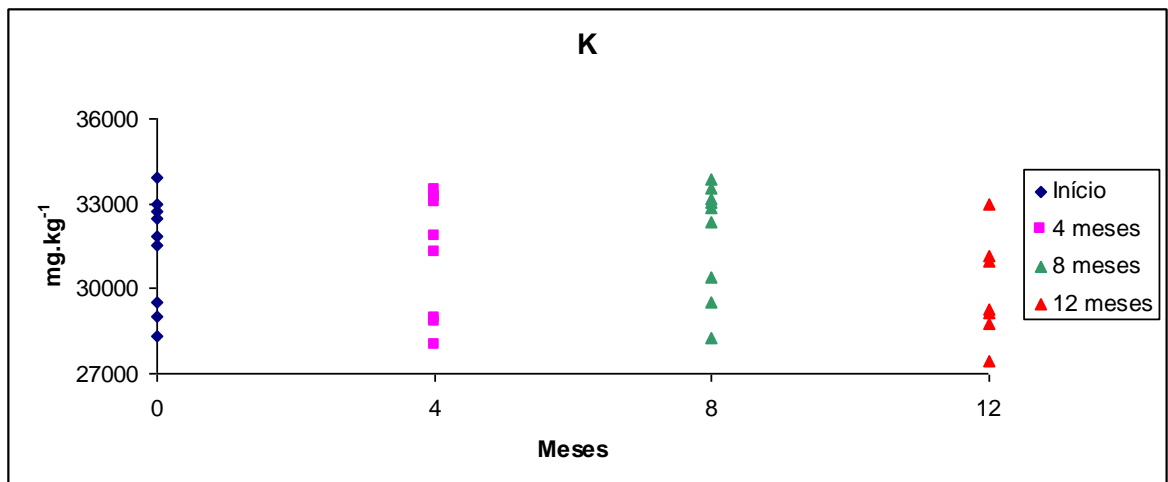


Figura 8.21 Estabilidade longo prazo para potássio

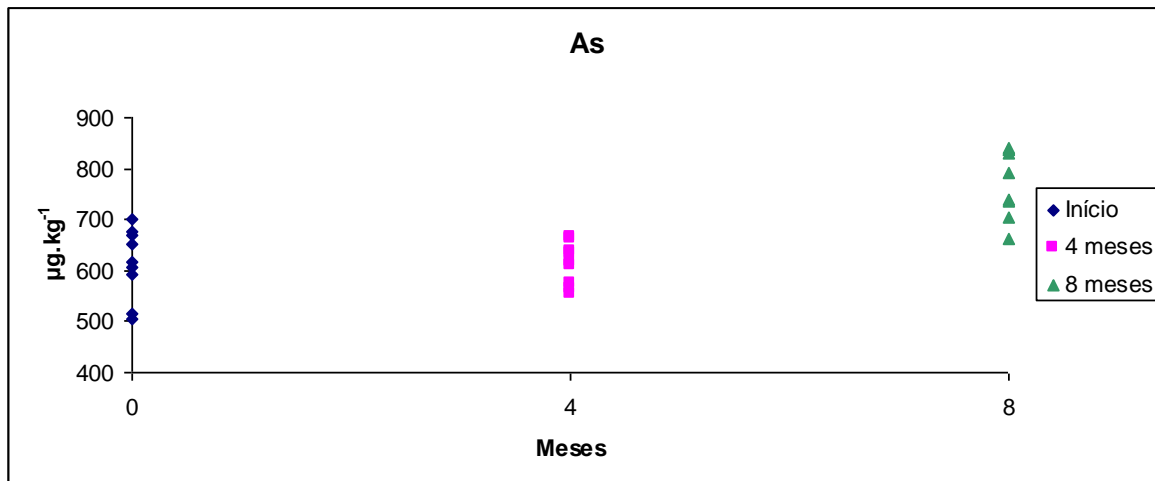


Figura 8.22 Estabilidade longo prazo para arsênio

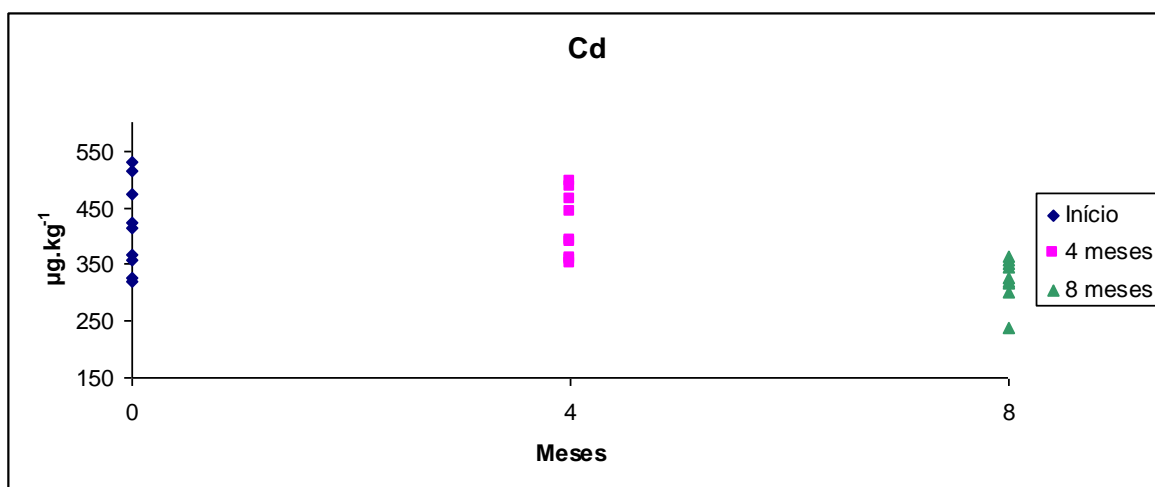


Figura 8.23 Estabilidade longo prazo para cádmio

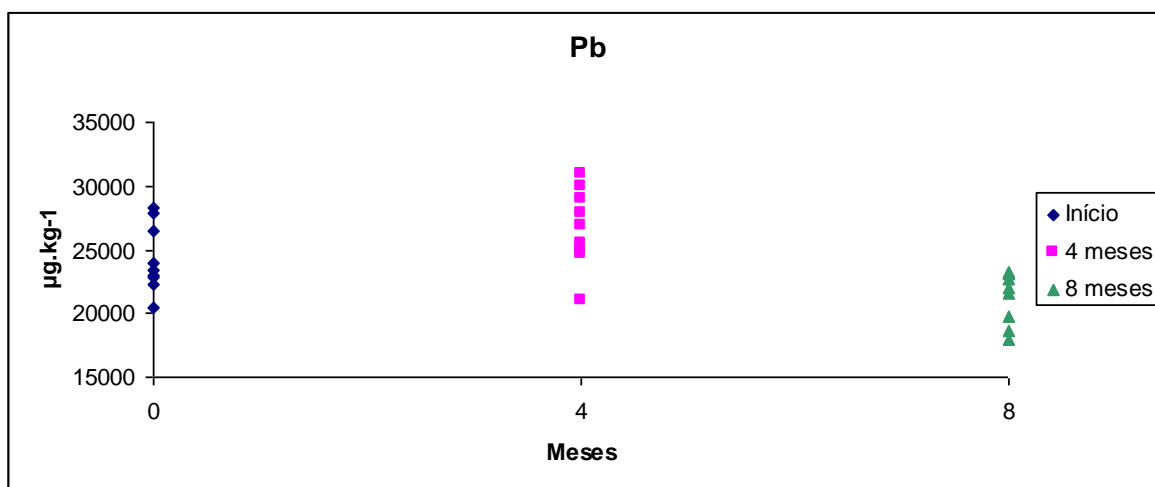


Figura 8.24 Estabilidade longo prazo para chumbo

Foi feita uma análise de variância ANOVA para estes dados distribuídos ao longo dos meses e os resultados são mostrados na tabela 8.2.

Tabela 8.2 Dados ANOVA para o teste de estabilidade a longo prazo.

| Analito | <i>F analítico</i> | valor - P | <i>F crítico</i> |
|---------|--------------------|-----------|------------------|
| Mn | 0,218 | 0,883 | 2,866 |
| Fe | 0,077 | 0,972 | 2,866 |
| Zn | 0,037 | 0,990 | 2,866 |
| Na | 0,428 | 0,734 | 2,866 |
| Mg | 0,847 | 0,477 | 2,866 |
| P | 0,444 | 0,723 | 2,866 |
| Ca | 0,311 | 0,817 | 2,866 |
| K | 0,119 | 0,948 | 2,866 |
| Cu | 0,093 | 0,964 | 2,866 |
| Cd | 1,210 | 0,314 | 3,354 |
| As | 1,469 | 0,248 | 3,354 |
| Pb | 0,908 | 0,415 | 3,354 |

Desta vez, diferente dos resultados obtidos para o teste de homogeneidade, os dados obtidos para esta análise de variância indicam que, para todos os analitos, não há diferença significativa ao nível de 95% para as concentrações ao longo dos meses.

Estes resultados podem sugerir que, como o desvio entre as medidas é alto devido ao preparo das amostras, quando se obtém um número maior de medidas o efeito pode ser compensado.

Mesmo para o Mg que apresentou um desvio crítico para a homogeneidade maior do que o tolerado, os dados desta nova análise não questionam sua estabilidade ao longo de 1 ano de estudo.

CAPÍTULO 9

ENSAIO COLABORATIVO

9. Ensaio colaborativo

O programa colaborativo de ensaio de proficiência realizado contou com a participação de empresas da iniciativa privada, instituições de pesquisa estatais e de ensino superior, num total de 14 participantes.

A tabela 9.1 apresenta os participantes do ensaio colaborativo

Tabela 9.1. Participantes do ensaio colaborativo

| Nome do Participante |
|---|
| CBO Assessoria e Análises |
| Embrapa Agropecuária Oeste |
| Embrapa Gado de Leite |
| Embrapa Pecuária Sudeste |
| Evalis do Brasil Nutrição Animal Ltda |
| HIDROCEPE Serviços de Qualidade |
| IAPAR/Londrina |
| IPEN – CNEN/SP |
| Laboratórios Exata |
| LANAGRO/GO |
| LANAGRO RS |
| Rodes Análises Químicas Ltda |
| Universidade Federal do Ceará |
| Vitagri Indústria, Comércio e Serviços Ltda |

O material candidato foi distribuído a cada um dos participantes, os quais deveriam determinar tantos quantos analitos tivesse interesse de acordo

com os métodos utilizados na rotina de seus próprios laboratórios, com seis repetições.

Os resultados reportados foram organizados em uma tabela com o número do laboratório e as quantificações das seis repetições dos analitos.

Inicialmente, os resultados que excederam 50% da média de todos os resultados obtidos para o ensaio foram descartados.

A tabela 9.2 mostra os dados obtidos ao final desta primeira análise.

Tabela 9.2 Dados obtidos a partir do ensaio colaborativo

| Lab | Ca | Cu | Fe | K | MG | Mn | Na | P | Zn | As | Cd | Pb |
|-----|-------|--------|------|-------|------|------|------|------|-------|----|----|----|
| 1 | 185,7 | 801,33 | | | 10,9 | | | | 147,2 | | | |
| 1 | 195,4 | 884,85 | | | 10,5 | | | | 148,8 | | | |
| 1 | 191,9 | 855,47 | | | 11,0 | | | | 155,7 | | | |
| 1 | 178,1 | 801,92 | | | 10,1 | | | | 147,4 | | | |
| 1 | 184,2 | 849,49 | | | 10,6 | | | | 144,0 | | | |
| 1 | 187,0 | 838,61 | | | 10,6 | | | | 148,6 | | | |
| 2 | 196,5 | | | | | | | 81,3 | | | | |
| 2 | 196,6 | | | | | | | 87,2 | | | | |
| 2 | 225,5 | | | | | | | 97,5 | | | | |
| 2 | 219,9 | | | | | | | 98,1 | | | | |
| 2 | 203,2 | | | | | | | 83,2 | | | | |
| 2 | 203,2 | | | | | | | 83,4 | | | | |
| 3 | 188,8 | | 3259 | | | 1623 | 93,3 | | 139,1 | | | |
| 3 | 199,3 | | 3798 | | | 1270 | 89,5 | | 136,1 | | | |
| 3 | 174,6 | | 2951 | | | 1098 | 85,8 | | 120,9 | | | |
| 3 | 185,6 | | 3486 | | | 1722 | 90,1 | | 133,1 | | | |
| 3 | 187,8 | | 3534 | | | 1563 | 86,0 | | 119,2 | | | |
| 3 | 185,9 | | 3101 | | | 1836 | 78,8 | | 123,1 | | | |
| 4 | 203,1 | 771 | 2766 | | 10,8 | 1758 | 74,3 | 86,6 | 140,0 | | | |
| 4 | 205,1 | 788 | 2759 | | 10,6 | 1728 | 73,4 | 86,9 | 139,0 | | | |
| 4 | 195,4 | 817 | 2895 | | 10,7 | 1737 | 81,2 | 87,0 | 135,0 | | | |
| 4 | 194,3 | 817 | 2811 | | 10,6 | 1693 | 74,7 | 87,0 | 133,0 | | | |
| 4 | 193,2 | 762 | 2724 | | 10,4 | 1731 | 88,0 | 86,5 | 137,0 | | | |
| 4 | 195,4 | 771 | 2726 | | 10,2 | 1807 | 88,4 | 86,6 | 138,0 | | | |
| 5 | 200,8 | 700 | 2770 | | 11,5 | 1640 | 80,2 | 78,2 | | | | |
| 5 | 211,7 | 720 | 2680 | | 12,1 | 1680 | 82,0 | 78,3 | | | | |
| 5 | 208,3 | 800 | 3550 | | 12,7 | 1690 | 85,4 | 86,9 | | | | |
| 5 | 197,7 | 750 | 3030 | | 11,2 | 1530 | 79,8 | 80,8 | | | | |
| 5 | 186,1 | 877 | 3355 | | 10,9 | 1609 | 76,2 | 79,8 | | | | |
| 5 | 188,3 | 814 | 3168 | | 10,8 | 1627 | 78,3 | 81,4 | | | | |
| 6 | 153,9 | 874 | 2963 | 35600 | 10,4 | 1706 | 81,6 | 81,6 | 146,0 | | | |
| 6 | 157,7 | 861 | 2973 | 36900 | 10,5 | 1658 | 85,7 | 84,7 | 143,0 | | | |
| 6 | 151,8 | 803 | 2791 | 34500 | 10,7 | 1528 | 81,9 | 81,7 | 134,0 | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-------|-----|------|-------|------|------|------|-------|-------|--------|--------|-------|--|--|--|--|--|--|--|
| 6 | 156,4 | 829 | 2970 | 35200 | 10,5 | 1683 | 81,9 | 81,7 | 143,0 | | | | | | | | | | |
| 6 | 156,0 | 857 | 2965 | 35700 | 10,8 | 1635 | 83,8 | 83,2 | 143,0 | | | | | | | | | | |
| 6 | 155,5 | 837 | 3024 | 35800 | 10,4 | 1583 | 84,7 | 82,9 | 149,0 | | | | | | | | | | |
| 7 | 163,3 | 818 | 2430 | | 10,1 | 1434 | | 110,2 | 121,0 | | | | | | | | | | |
| 7 | 159,7 | 769 | 2296 | | 9,9 | 1456 | | 109,0 | 117,2 | | | | | | | | | | |
| 7 | 170,1 | 856 | 2497 | | 10,6 | 1553 | | 117,2 | 127,4 | | | | | | | | | | |
| 7 | 162,0 | 821 | 2450 | | 10,0 | 1440 | | 118,1 | 122,0 | | | | | | | | | | |
| 7 | 164,1 | 799 | 2300 | | 10,2 | 1499 | | 110,1 | 125,0 | | | | | | | | | | |
| 7 | 169,0 | 830 | 2410 | | 10,0 | 1433 | | 115,1 | 121,0 | | | | | | | | | | |
| 8 | 189,7 | 798 | 2605 | | 11,2 | 1507 | 82,0 | 83,8 | 137,4 | | | | | | | | | | |
| 8 | 187,9 | 809 | 2547 | | 11,1 | 1581 | 82,0 | 84,4 | 128,6 | | | | | | | | | | |
| 8 | 187,7 | 802 | 2512 | | 11,2 | 1605 | 80,0 | 84,6 | 131,5 | | | | | | | | | | |
| 8 | 187,3 | 819 | 2518 | | 11,3 | 1575 | 80,0 | 84,3 | 131,3 | | | | | | | | | | |
| 8 | 185,1 | 833 | 2723 | | 11,0 | 1647 | 79,0 | 84,0 | 145,0 | | | | | | | | | | |
| 8 | 186,4 | 796 | 2577 | | 11,0 | 1494 | 78,0 | 85,1 | 135,7 | | | | | | | | | | |
| 9 | | 753 | 2727 | | | 1532 | | | 128,2 | | | | | | | | | | |
| 9 | | 735 | 2549 | | | 1498 | | | 126,7 | | | | | | | | | | |
| 9 | | 771 | 2903 | | | 1566 | | | 129,7 | | | | | | | | | | |
| 9 | | 771 | 2678 | | | 1561 | | | 128,0 | | | | | | | | | | |
| 9 | | 741 | 2678 | | | 1506 | | | 128,2 | | | | | | | | | | |
| 9 | | 757 | 2712 | | | 1523 | | | 126,8 | | | | | | | | | | |
| 10 | 179,3 | 790 | | | | 1287 | | 79,1 | 147,9 | | | | | | | | | | |
| 10 | 179,4 | 799 | | | | 1337 | | 79,5 | 147,7 | | | | | | | | | | |
| 10 | 181,3 | 795 | | | | 1360 | | 80,2 | 148,9 | | | | | | | | | | |
| 10 | 181,1 | 789 | | | | 1350 | | 81,0 | 148,5 | | | | | | | | | | |
| 10 | 181,2 | 805 | | | | 1369 | | 81,2 | 149,8 | | | | | | | | | | |
| 10 | 181,2 | 810 | | | | 1367 | | 81,4 | 149,9 | | | | | | | | | | |
| 11 | | 755 | 1236 | 45005 | | 1484 | 65,7 | 99,6 | 63,67 | | | | | | | | | | |
| 11 | | 761 | 1563 | 49640 | | 1321 | 65,0 | 97,1 | 62,56 | | | | | | | | | | |
| 11 | | 876 | 1844 | 54915 | | 1573 | 67,5 | 101,5 | 64,78 | | | | | | | | | | |
| 11 | | 825 | 1498 | 45386 | | 1596 | 65,9 | 98,8 | 65,38 | | | | | | | | | | |
| 11 | | 770 | 1368 | 57857 | | 1641 | 64,5 | 99,2 | 61,58 | | | | | | | | | | |
| 11 | | 913 | 1466 | 46175 | | 1592 | 71,6 | 99,0 | 63,34 | | | | | | | | | | |
| 12 | | 824 | 3518 | | | 1465 | | | 156,2 | | | | | | | | | | |
| 12 | | 835 | 3590 | | | 1445 | | | 156,3 | | | | | | | | | | |
| 12 | | 843 | 3586 | | | 1497 | | | 138,5 | | | | | | | | | | |
| 12 | | 880 | 4853 | | | 1575 | | | 164,1 | | | | | | | | | | |
| 12 | | 875 | 4690 | | | 1483 | | | 173,7 | | | | | | | | | | |
| 12 | | 886 | 3923 | | | 1500 | | | 172,1 | | | | | | | | | | |
| 13 | | | | | | | | | | 462,14 | 562,13 | 12655 | | | | | | | |
| 13 | | | | | | | | | | 453,32 | 610,12 | 13434 | | | | | | | |
| 13 | | | | | | | | | | 410,51 | 608,91 | 16690 | | | | | | | |
| 13 | | | | | | | | | | 445,64 | 543,82 | 12203 | | | | | | | |
| 13 | | | | | | | | | | 415,42 | 522,00 | 11022 | | | | | | | |
| 13 | | | | | | | | | | 402,33 | 437,50 | 8315 | | | | | | | |
| 14 | 188,3 | 776 | 2556 | 31836 | 11,2 | 1748 | 77,9 | 83,6 | 122,8 | 505,16 | 413,20 | 23420 | | | | | | | |
| 14 | 193,3 | 816 | 2628 | 33914 | 11,2 | 1723 | 78,7 | 83,7 | 122,2 | 514,55 | 326,70 | 22820 | | | | | | | |
| 14 | 193,4 | 786 | 2445 | 33007 | 11,1 | 1552 | 82,2 | 84,3 | 123,4 | 677,93 | 359,10 | 20420 | | | | | | | |
| 14 | 190,5 | 778 | 2612 | 33253 | 11,3 | 1575 | 79,6 | 83,7 | 117,8 | 664,79 | 357,30 | 21020 | | | | | | | |
| 14 | 197,8 | 794 | 2580 | 33205 | 11,3 | 1568 | 81,4 | 84,8 | 125,5 | 617,84 | 352,40 | 24920 | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | |
|------------|-------|-------|-------|--------|------|-------|------|------|-------|--------|--------|--------|
| 14 | 194,1 | 805 | 2584 | 33501 | 11,3 | 1587 | 80,0 | 85,1 | 128,6 | 661,08 | 361,80 | 25520 |
| Mediana | 187,8 | 804 | 2725 | 35650 | 10,8 | 1567 | 80,1 | 84,5 | 134,5 | 483,65 | 425,35 | 18555 |
| Σp | 1,37 | 11,75 | 33,14 | 294,45 | 0,30 | 20,71 | 1,66 | 1,73 | 2,57 | 7,63 | 6,84 | 169,08 |

***Grandezas dos analitos: g.kg⁻¹ - Ca, Mg, Na, P; mg.kg⁻¹ - Cu, Fe, K, Mn, Zn; $\mu\text{g.kg}^{-1}$ - As, Cd e Pb**

Com os dados obtidos, foi calculada a mediana e o desvio padrão alvo σ_p .

Analisando-se os dados, percebe-se que, embora cada laboratório tenha feito as quantificações de acordo com os métodos utilizados em sua rotina, há uma convergência dos resultados obtidos.

A estes dados, foi aplicada a estatística baseada no índice z.

Este índice é utilizado em programas interlaboratoriais para avaliar o desempenho dos participantes.(THOMPSON et al, 2006).

É possível calcular o índice z através da equação 9.1.

$$z = \frac{(x_i - \bar{X})}{\sigma_p} \quad (9.1)$$

onde x_i é o resultado reportado pelo ; \bar{X} o valor designado ou a melhor estimativa dele e σ_p é o desvio padrão alvo, obtido pela equação de Horwitz modificada por Thompson, que se refere a uma estimativa variabilidade. (THOMPSON et al, 2006).

O termo $(x_i - \bar{X})$ reflete o erro cometido na quantificação reportada do laboratório participante com relação ao valor designado.

O desvio padrão alvo σ_p já se refere à incerteza padrão.

Como critério de avaliação, quanto mais próximo o valor de z zero, mais correto é o resultado reportado pelo laboratório.

Para um intervalo de $z \pm 2$, o desempenho do laboratório é considerado aceitável e para resultados de $z > \pm 3$, os desempenho é considerado insatisfatório ou inaceitável. (THOMPSON, 2006).

Para este estudo, o programa colaborativo não tinha o objetivo de avaliar o desempenho dos laboratórios, mas sim o de obter o valor designado para o material candidato através da mediana dos resultados reportados e o desvio padrão alvo.

A seguir é mostrado o gráfico obtido para o índice z para os dados reportados do ensaio colaborativo.

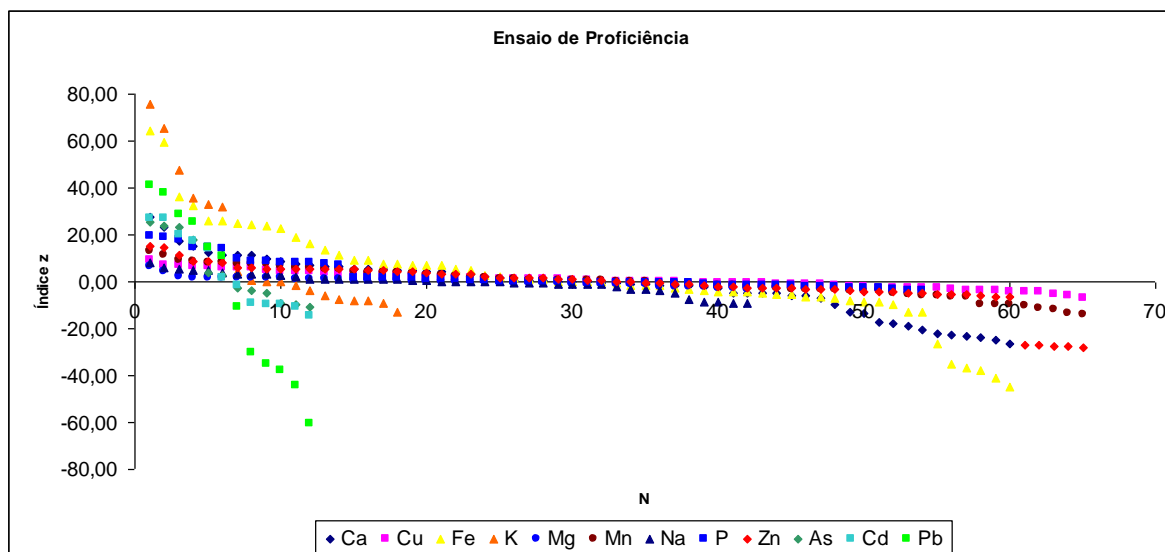


Figura 9.1. Gráfico de índice z para o ensaio colaborativo

Percebe-se que, para alguns analitos, há uma variabilidade maior do índice z do que para outros.

Por exemplo, os dados reportados para Pb, Cd e As possuem uma variabilidade muito maior do que os dados reportados para Cu e Zn.

Esses dados refletem a dificuldade dos laboratórios em conseguir obter medidas de consenso para elementos traço e que requerem algum tipo de tratamento diferenciado.

CAPÍTULO 10

DETERMINAÇÃO DAS INCERTEZAS

10.1 Descrição dos cálculos

De acordo com o VIM, Vocabulário Internacional de Temos Básicos e Genéricos em Metrologia, a incerteza é “um parâmetro associado ao resultado de uma mediação que caracteriza a dispersão de valores que poderiam ser razoavelmente atribuídas ao mensurando”. Seu conhecimento implica em delimitar o intervalo onde o resultado verdadeiro pode estar inserido.

Desta forma, a determinação da incerteza implica em uma maior confiança na validade do resultado da medição.(GUIA EURACHEM, 2002).

A determinação da incerteza de uma medição é uma tarefa morosa e exige uma análise minuciosa de todas as variáveis que podem ter contribuição na determinação da incerteza final.

Contudo, uma visão preliminar pode identificar quais as contribuições mais significativas, uma vez que o valor obtido da incerteza é governado por valores majoritários (THOMPSON et al, 2006).

A incerteza expandida de um material de referência certificado é obtida pela combinação das contribuições referentes à caracterização (u_{char}), homogeneidade (u_{bb}), estabilidade a curto prazo (u_{sts}) e estabilidade a longo prazo (u_{lts}), através da relação:

$$U_{CRM} = k \sqrt{u_{char}^2 + u_{bb}^2 + u_{sts}^2 + u_{lts}^2} \quad (10.1)$$

O fator de abrangência k pode assumir valor 2 ou 3. Para $k=2$, o intervalo de confiança é de 95% e para $k=3$, o intervalo é de 99%.

Neste trabalho adotou-se $k=2$.

O valor designado foi obtido através da mediana dos valores de consenso reportados pelos laboratórios participantes do ensaio colaborativo.

Através do uso da Equação de Horwitz modificada por Thompson obteve-se o desvio padrão alvo σ_p . Este, por sua vez, ao ser dividido pela raiz quadrado do número de laboratórios participantes do ensaio k , compõe a incerteza da caracterização u_{char} . (VEEN et al, 2001).

$$u_{char} = \frac{\sigma_p}{\sqrt{k}} \quad (10.2)$$

Para o cálculo das incertezas de homogeneidade e estabilidade foram seguidas as instruções do ABNT ISO GUIDE 35, 2006.

Para o teste de homogeneidade, primeiramente foi calculado o desvio padrão interamostral através da equação:

$$s_{bb}^2 = \frac{MQ_{entre} - MQ_{dentro}}{n_o} \quad (10.3)$$

onde MQ_{dentro} e MQ_{entre} são obtidos da tabela de análise de variância e n_o é o número de réplicas.

Em seguida, foi calculado o desvio padrão da repetibilidade pela equação:

$$s_r = \sqrt{MQ_{dentro}} \quad (10.4)$$

Ao fim, obtém-se a incerteza referente à homogeneidade através da equação seguinte:

$$u_{bb} = \sqrt{\frac{MQ_{dentro}}{n}} \sqrt[4]{\frac{2}{vMQ_{dentro}}} \quad (10.5)$$

onde v é o número de graus de liberdade para fonte de variação dentro do grupo, da tabela ANOVA.

A próxima incerteza calculada foi a relacionada à estabilidade a longo prazo.

Com os dados provenientes do estudo de homogeneidade a longo prazo foi construído um gráfico.

Através deste gráfico foram obtidos os parâmetros b_1 e b_0 de acordo com as equações 10.6 e 10.7.

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} \quad (10.6)$$

$$b_0 = \bar{Y} - b_1 \bar{X} \quad (10.7)$$

onde X está relacionado aos meses de duração do teste e Y à concentração do analito.

O desvio padrão das medidas ao longo dos meses foi obtido pela equação 10.8:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - b_0 - b_1 X_i)^2}{n - 2} \quad (10.8)$$

e a incerteza associada à inclinação da reta pela equação 10.9:

$$s(b_1) = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}} \quad (10.9)$$

Para verificar se a inclinação da curva era ou não significativa aplicou-se a inequação 10.10.

Satisfeita a condição da inequação, nenhuma instabilidade deveria ser comprovada para um intervalo de confiança de 95%.

$$|b_1| \leq t_{0,95;n-2} \cdot s(b_1) \quad (10.10)$$

onde o fator t de Student's é igual a 4,30.

Da equação 10.11 vem, então, a incerteza associada à estabilidade a longo prazo:

$$u_{lts} = s b_1 \cdot t \quad (10.11)$$

onde t é o número de meses em que o teste foi conduzido.

Para a u_{sts} , foi considerado o valor 0, pois as condições de transporte devem ser tais que não causem alteração no material candidato (ABNT/ISO GUIDE 35, 2006).

10.2 Incertezas obtidas

Após os cálculos, a tabela 10.1 demonstra as incertezas de cada analito.

Tabela 10.1. Incertezas para cada analito

| Analito | U_{char} | U_{bb} | U_{lts} |
|---------|------------|----------|-----------|
| Ca | 0,37 | 0,98 | 18,13 |
| Cu | 3,14 | 6,70 | 42,59 |
| Fe | 8,86 | 9,94 | 105,9 |
| K | 0,16 | 148 | 2138 |
| Mg | 0,08 | 0,08 | 1,360 |
| Mn | 5,53 | 28,5 | 64,42 |
| Na | 0,24 | 0,58 | 7,49 |
| P | 0,25 | 0,50 | 8,65 |
| Zn | 0,69 | 0,98 | 5,66 |
| As | 2,04 | 21,6 | 100,0 |
| Cd | 1,83 | 13,2 | 35,74 |
| Pb | 45,2 | 635 | 4750 |

Para os elementos Mn, Fe, K, Cd, As e Pb, o valor encontrado para o desvio padrão da inclinação da curva referente às medidas ao longo dos meses excedeu o valor crítico de 4,30. Isso sugere que a inclinação da reta é significativa, e que o material pode ser instável.

O estudo da estabilidade por tempos mais longos poderá mostrar se este efeito na inclinação da reta realmente confirma uma instabilidade do material.

Tendo por base o valor designado para cada analito, obtido pela mediana dos dados do ensaio colaborativo, foi feita uma relação sobre quanto representava a contribuição de cada incerteza em porcentagem. A tabela 10.2 retrata estes dados.

Tabela 10.2. Incertezas representadas em porcentagem

| Analito | $uchar$ % | ubb % | $ults$ % |
|---------|-----------|---------|----------|
| Ca | 0,2 | 0,5 | 9,7 |
| Cu | 0,4 | 0,8 | 5,3 |
| Fe | 0,3 | 0,4 | 3,9 |
| K | 0,0 | 0,4 | 6,0 |
| Mg | 0,7 | 0,8 | 12 |
| Mn | 0,4 | 1,8 | 4,1 |

| | | | |
|----|-----|-----|------|
| Na | 0,3 | 0,7 | 9,3 |
| P | 0,3 | 0,6 | 10 |
| Zn | 0,5 | 0,7 | 4,2 |
| As | 0,4 | 4,5 | 20,7 |
| Cd | 0,4 | 3,1 | 8,4 |
| Pb | 0,2 | 3,4 | 26 |

Uma análise da tabela 10.2 fornece a informação de que, a maior contribuição para a incerteza do material provém do teste de estabilidade a longo prazo.

Esta situação se deve ao fato de que o desvio padrão da inclinação da curva é multiplicado pelo número de meses do estudo do teste.

Quanto mais longo o teste, maior o valor a ser multiplicado e, conseqüentemente, maior a incerteza associada.

Para cada analito foi obtido a porcentagem relacionada à soma dos quadrados das incertezas e utilizando-se a equação 10.1, obteve-se a incerteza expandida.

Tabela 10.3 Valor designado acompanhado da incerteza expandida para cada analito

| Analito | Valor designado | Incerteza | Unidade |
|---------|-----------------|-----------|---------------------|
| Ca | 187,8 | 36,3 | g kg ⁻¹ |
| Cu | 803,8 | 86,5 | mg kg ⁻¹ |
| Fe | 2725 | 213,4 | mg kg ⁻¹ |
| K | 35650 | 4285,8 | mg kg ⁻¹ |
| Mg | 10,8 | 2,72 | g kg ⁻¹ |
| Mn | 1567 | 141,3 | mg kg ⁻¹ |
| Na | 80,1 | 15 | g kg ⁻¹ |
| P | 84,5 | 17,3 | g kg ⁻¹ |
| Zn | 134 | 11,6 | mg kg ⁻¹ |
| As | 483,6 | 204,6 | µg kg ⁻¹ |
| Cd | 425,3 | 76,31 | µg kg ⁻¹ |
| Pb | 18555 | 9584,7 | µg kg ⁻¹ |

As maiores incertezas foram obtidas para os elementos As (42%) e Pb (51%) e Mg (25%).

CAPÍTULO 11

CONCLUSÕES

11. Conclusões

Ao final do trabalho, pode-se concluir que a preparação de um material candidato a material de referência está bem amparada no tocante a literatura disponível para o fornecimento de orientações.

Há um grande número de documentos elaborados de forma clara e alguns destes trazem exemplos ilustrativos de como proceder para realizar os cálculos mais complexos.

Um material candidato a material de referência para sal mineral para gado de leite foi preparado neste trabalho.

Os planejamentos fatorial e Doehlert utilizados neste trabalho foram poderosos guias para a elaboração de experimentos.

Aliados à ferramenta quimiométrica análise de componentes principais PCA, pode-se escolher de uma forma mais adequada o tipo de preparo da amostra que seria adotado.

Conclui-se que, apesar da solubilização da matriz ser incompleta, o procedimento foi adequado e possibilitou a determinação das incertezas, bem como o valor designado para cada analito em estudo.

A realização do programa colaborativo foi de extrema importância tanto para a obtenção do valor designado, como para acompanhar a dificuldade e realidade dos laboratórios com relação às diferentes metodologias utilizadas.

Mesmo com a variabilidade de metodologias aplicadas e solubilização incompleta da amostra, foi possível obter um valor de consenso, que foi amparado por um teste de homogeneidade suficiente para o material.

O teste de estabilidade a longo prazo mostrou-se questionável para elementos como Mn, Fe, K e os contaminantes Cd, As e Pb. O

acompanhamento da estabilidade deste material por um maior período de tempo pode fornecer um resultado mais confiável.

O extrato solubilizado apresenta indícios de ser instável pois, para elementos como Zn e Cd, houve diferença nas quantificações quando o extrato era preparado e imediatamente quantificado e quando era determinado em um intervalo de até uma semana. Contudo, a realização de mais testes embasariam melhor esta suspeita.

CAPÍTULO 12

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

12. Referências Bibliográficas

ABNT, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência. 1 ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2004 (ABNT ISO GUIA 34).

ABNT, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Materiais de referência – Conteúdo de certificados e rótulos. 2 ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2002 (ABNT ISO GUIA 31) .

ABNT, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Calibração em química analítica e uso de materiais de referência certificados. 1 ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2000 (ABNT ISO Guia 32).

ABNT, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Utilização de materiais de referência certificados. 1 ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2002 (ABNT ISO Guia 33).

ABNT, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Termos e definições relacionados com materiais de referência. 1 ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2000 (ABNT ISO Guia 30).

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

ANDRIGUETTO, José Milton et al. Nutrição animal: alimentação animal (nutrição animal aplicada. 4. ed. São Paulo:Nobel, v.2, 1985.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R. E. Planejamento e otimização de experimentos. 2ed. Campinas: Editora da UNICAMP, p. 299, 1996.

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, “in press” DOI 10.1007/s00769-011-0796-8.

CETEM – Centro de Tecnologia Mineral, Ministério da Ciência e Tecnologia Disponível em < <http://www.cetem.gov.br> > Acesso em: Julho de 2011.

CILeite - Centro de Inteligência do Leite – Governo de Minas Disponível em <<http://www.cileite.com.br> > Acesso em: Julho de 2011.

CRISPINO, C.C. Determinação de As, Sb e Se em material agrônômico por espectrometria de emissão ótica acoplada a plasma induzido com geração de hidretos. Universidade Federal de São Carlos, 2005, Dissertação de mestrado.

DEDINA, J., TSALEV, D. Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry, Wiley, New York, 1995.

EURACHEM/CITAC Guide: Determinando a Incerteza na Medição Analítica, 2ª Ed., ABNT, INMETRO, SBM – Brasil, 1998. FERREIRA, M. M. C. . Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. *Química Nova*, v. 22, n. 5, 1999.

FERREIRA, S.L.C., SANTOS, W.N.L, QUINTELLA, C.M., NETO, B.B., BOSQUE-SENDRA, J.M. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry—review *Talanta* v. 63, p. 1061-1067, 2004.

GÁSPAR, A., SZÉLES, E., BERNDT, H., Analysis of submicroliter samples using micro thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry *Analytica and bioanalytical chemistry*, v. 372, p.136-140, 2002.

GILLS, T.E., WOLF, W.R., STOEPLER, M., Eighth International Symposium on Biological and Environmental Reference Materials (BERM-8), Bethesda, MD, September 17–22, 2000 *Fresenius J Anal Chem* v. 370, p. 109-110, 2001.

GRUBBS, F.E. Procedures for Detecting Outlying Observations in Sample. *Technometrics*, v.11, p.1-21, 1969.

HUSÁKOVÁ, L., CERNOHORSKY, T., SRAMKOVÁ, J., VAVRUSOVÁ, L., Analytical, Nutritional and Clinical Methods Direct determination of arsenic in beer by electrothermal atomic absorption

spectrometry with deuterium background correction (D2-ET-AAS) *Food Chemistry*, v. 105, p. 286-292, 2007.

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Disponível em < <http://www.inmetro.gov.br> >. Acesso em: Julho de 2011.

IPT – Instituto de Pesquisas Tecnológicas. Disponível em <<http://www.ipt.br>> Acesso em: Julho de 2011.

KINGSTON, H.M. & HASWELL, S.J. *Microwave-Enhanced Chemistry, Fundamentals, Sample Preparation and Applications*, Washington, American Chemical Society, p.772, 1997.

LOPES, G.S. Avaliação de diferentes materiais para pré-concentração de metais. Universidade Federal de São Carlos, 2002, Tese de doutorado.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em < <http://www.agricultura.gov.br> >. Acesso em: Julho de 2011.

MARÇAL, W.S., GASTE, L., LIBONI, M., PARDO, P., NASCIMENTO, M. R., HISASI, C. S. Concentration of lead in mineral salt mixtures used as supplements in cattle food. *Exp Toxic Pathol*, v. 53, p. 7-9, 2001.

MATOS, G.D., PEREIRA-FILHO, E., POPPI, R.J., ARRUDA, M.A.Z. Análise exploratória em Química Analítica com emprego de Quimiometria: PCA e PCA de imagens. *Revista analytica*, n.6, 2003.

McDOWELL, L.R. Minerais para Ruminantes sob pastejo em regiões tropicais, enfatizando o Brasil. 3ª Ed. Gainesville: University of Florida, p. 92, 1999.

MONTASER, A. & GOLIGHTLY, D. W. *Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectroscopy*. New York, VCH Publisher, 1992.

MOREIRA, E.G., VASCONCELLOS, M.B.A., MAIHARA, V.A., CATHARINO, M.G.M., SAIKI, M. Mussel reference material preparation proposal as a quality assurance tool for Brazilian seashore biomonitoring, *Journal of Brazilian Society Exotoxicology*, v. 2, n 1, 2007, 61-65.

PAUWELS, J., LAMBERTY, A., CRMs for the 21st century: new demands and challenges. *Fresenius J. Anal. Chem.* n. 370, p. 11-114, 2001.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL, Nutrient Requirements of Beef Cattle, Washington, D.C., National Academy of Sciences, 1996.

NOGUEIRA, A.R.A., SOUZA, G.B., SILVA, F.V., ZAGATTO, E.A.G. Sistema polivalente de análises químicas por injeção em fluxo: determinação espectrofotométrica de cálcio, magnésio e fósforo em plantas. *Scientia agricola* v.54, n.3, 1997 .

QUEVAUVILLER, P. COFINO, W., CORTEZ, L. Use of reference materials in accreditation systems for environmental laboratories. *Trends in analytical chemistry*, vol. 17, no. 4, 1998.

THOMSEN, V.; ROBERTS, G. & BURGESS, K. The concept of background equivalent concentration in spectroscopy. *Spectrosc.*, 15: 33, 2000.

VOLYNSKII, A. B. Chemical Modifiers in Modern Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry". *Journal of Analytical Chemistry*, v.58, p. 905-921, 2003.

SEGURA, M., CÁMARA, C., MADRID, Y., REBOLLO, C., AZCÁRATE, J. KRAMER, G.N., GAWLIK, B.M., LAMBERTY, A., QUEVAUVILLER, Ph. Certified reference materials (CRMs) for quality control of trace-elements determinations in wastewaters, *Trends in Analytical Chemistry*, v. 23, n. 3, 2004.

SIMONET, B.M., Quality control in qualitative analysis, *Trends in Analytical Chemistry*, v. 24, n.6, 2005.

SINDIRAÇÕES – SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL (Ed.) Compêndio brasileiro de alimentação animal. São Paulo: SINDIRAÇÕES, 2005.

SOUZA, G.B.S., NOGUEIRA, A.R.A., DEL-SANTO, V.R., PICCHI, C. M., GUIMARÃES, E.S., BARIONI, W. J., Proficiency testing of animal nutrition laboratories. *Accreditation and Quality Assurance*, v. 14, p. 455-460, 2009.

SOUZA, S.N.P., FADINI, P.S., PEREIRA-FILHO, E.R. Determinação de Cd e Pb: Avaliação de sedimentos do Rio Jundiá - SP e Ribeirão Pirai - SP e lodo proveniente de uma estação de tratamento de esgotos *Química Nova*, v. 32, n. 9, 2367-2372, 2009.

TAGLIAFERRO, F.S., FERNANDES, E. A. N., BACCHI, M. A. Quality assessment of organic coffee beans for the preparation of a candidate reference material. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v. 269, n.2, p. 371-375, 2006.

THOMPSON, M., ELLISON, S.L.R.; WOOD, R., The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories. *Pure Applied Chemistry*, v.78, n.1, p. 145-196, 2006.

TOKARNIA, C. H., DOBEREINER, J., PEIXOTO, P.V. Deficiências minerais em animais de fazenda, principalmente bovinos em regime de campo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.20, n.3, p. 127-138, 2000.

VEEN, A.M.H., LISINGER T., PAUWELS, J., Uncertainty calculations in the certification of reference materials.2. Homogeneity study. *Accreditation and Quality Assurance* v. 6, p. 26-30, 2001.

VIM – Vocabulário internacional de termos básicos e gerais de metrologia.(SENAI/DN/INMETRO) – 5. ed., Brasília, 2007.

ZSCHUNKE, A., The role of reference materials in analytical chemistry, *Accreditation Quality Assurance*, v. 8, p. 247-251, 2003.

WATLING. R.J., The use of a slotter tube for the determination of lead, zinc, cadmium, bismuth, cobalt, manganese and silver by atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 97, p. 395-398, 1978.