
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE MATERIAIS DE REFERÊNCIA PARA NUTRIENTES E CONTAMINANTES INORGÂNICOS EM AMOSTRAS AGRONÔMICAS.

Caroline Santos da Silva*

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de
DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de
concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

Orientadora: Dr^a. Ana Rita de Araujo Nogueira

* bolsista: CAPES/EMBRAPA

São Carlos – SP
2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586p Silva, Caroline Santos da
Produção e avaliação de materiais de referência
para nutrientes e contaminantes inorgânicos em
amostras agronômicas / Caroline Santos da Silva. --
São Carlos : UFSCar, 2016.
165 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2016.

1. Material de referência. 2. Rocha fosfatadas.
3. ICP OES. 4. LIBS. 5. Combustão. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Caroline Santos da Silva, realizada em 29/01/2016:

Profa. Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira
Embrapa

Prof. Dr. Marcos Yassuo Kamogawa
ESALQ/USP

Prof. Dr. Olvio Pereira de Oliveira Junior
IPEN

Profa. Dra. Elma Neide Vasconcelos Martins
UFSCar

Prof. Dr. Edemar Rodrigues Pereira Filho
UFSCar

“Gratidão às adversidades que apareceram na minha vida, pois elas me ensinaram a tolerância, a simpatia, o autocontrole, a perseverança e outras qualidades que, sem essas adversidades, eu jamais conheceria.”

Dedico esse trabalho aos meus pais João e Maria Luiza, minha irmã Thaís, minha madrinha Eliane e ao meu Noivo Diego, que são minha base para tudo e sem eles não teria chegado até aqui. Eu amo vocês incondicionalmente. Eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar sempre ao meu lado, por permitir que eu chegasse até aqui com saúde, determinação e muita força para enfrentar a dor de estar longe dos meus familiares para que eu pudesse concretizar esse sonho.

Ao Departamento de Química e ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos pela possibilidade de execução do trabalho.

À Dr^a. Ana Rita de Araujo Nogueira pela orientação, pela oportunidade de realização deste trabalho, pelas inúmeras contribuições e valiosos ensinamentos feitos para o meu crescimento profissional, pela amizade, ajuda, conselhos e pela confiança em mim depositada durante esses quatro anos.

Ao Dr. Gilberto Batista de Souza, pela co-orientação, pela amizade, por toda ajuda principalmente na parte estatística e pelas inúmeras contribuições e ensinamentos.

À Dr^a Patricia Grinberg pela supervisão durante o estágio de Doutorado Sanduíche, pela oportunidade, pelas valiosas contribuições e ensinamentos, e principalmente pela grande amizade, ajuda e pelos conselhos. Agradeço também ao Renato e ao Lucas por terem me recebido com tanto carinho.

Aos professores Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega e Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho pela amizade e pelas valiosas discussões e sugestões durante as reuniões de grupo que contribuíram muito para a realização deste trabalho. Agradeço também a Dr^a Lucimar Fialho por estar sempre disposta a ajudar no que fosse preciso, pelos ensinamentos e pela amizade.

Aos colegas do Grupo de Análise Instrumental (GAIA) pela amizade e pelas contribuições. Em especial aos meus queridos amigos: Clarice, Raquel, Thiago, Alexandra e Maria da Natividade.

Aos meus amigos EX-GAIA, Mário Henrique, Luana, Silmara, Amanda e Ana Beatriz que estiveram sempre do meu lado e até hoje permanecem.

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

Ao Dr. Márcio Bacchi do Centro de Energia Nuclear na Agricultura de Universidade de São Paulo, USP, Piracicaba, pela disponibilidade das análises da distribuição de tamanho de partícula e Análise por Ativação Neutrônica Instrumental.

Ao Lanagro e a Flávia Consolini pela distribuição do material de referência aos laboratórios participantes do ensaio colaborativo

Aos laboratórios envolvidos no ensaio colaborativo por todas as análises do material de referência.

Ao National Research Council Canada (NRCC) pela oportunidade e a todos seus funcionários pela acolhida durante os seis meses de estágio no Canadá.

Aos funcionários da Embrapa Pecuária Sudeste: Cidinha, Natal, Cristina, Marcos, Victor, Carlos, Cadu, Gilbertinho, Rita e Ane Lysie por toda ajuda para a realização deste trabalho.

À Cathie Fraser, minha “homestay”, por ter dividido comigo o seu lar e me mostrar o quanto os Canadenses são receptivos e carinhosos.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos, Ariane, Cristina e Luciani por todo o suporte técnico administrativo.

A toda minha família, por estarem sempre do meu lado incondicionalmente: meu padrinho Gilmar, meus tios José Ernani e Maria Luisa, Antônio e Cláudia, Léa e Elmo, aos meus primos Allan, Aline e Gabriela meu querido avô Ernani. Vocês fazem parte dessa história.

À minha sogra Divina e ao meu sogro José Ronaldo por me acolherem como se fosse sua filha. A tia Guilhermina pelo carinho e ao “meu sobrinho” de coração Enzo por tornar meu mundo infantil bem mais colorido.

À Cristiane Ratmann e ao Ezequiel Ratmann pela amizade e incentivo para que eu criasse coragem para chegar até aqui, meus sinceros agradecimentos. À Priscila e ao Mario pelo acolhimento “São Carlense” e pelos nossos almoços deliciosos de domingo.

Às minhas grandes amigas: Adriane, Camila, Clarissa, Elisa, Gisele, Lídia, Karine, Lisiane, Paula, Sharon, Ramile, Tati e Vanessa, obrigada por ser meu refúgio mesmo a longas distâncias, obrigado por cada sorriso, cada palavra amiga e cada conselho.

Agradeço ao CAPES pelo suporte financeiro e pela bolsa concedida.

Meus sinceros agradecimentos aos membros da banca avaliadora deste trabalho, por sua disposição e grandiosa contribuição científica.

E a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, Muito obrigada!

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS – Espectrometria de Absorção Atômica (Atomic Absorption Spectrometry)

ANOVA - Análise de variância

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

BCR – Bureau Communautaire de Référence (Community Bureau of Reference)

CENA – Centro de Energia Nuclear na Agricultura

CETEM – Centro de Tecnologia Mineral

COMAR – Banco Internacional de Dados de Materiais de Referência Certificados (International Data Bank of Certified Reference Materials)

CV AAS - Espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry)

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EP - Ensaio de Proficiência

EPA – US Environmental Protection Agency

EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina

EPLNA - Ensaio de Proficiência para Laboratórios de Nutrição Animal

FAAS – Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (Flame Atomic Absorption Spectrometry)

FAES – Espectrometria de Emissão Atômica com Chama (Flame Atomic Emission Spectrometry)

GF AAS – Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica em Forno de Grafite (Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry)

HG AAS – Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Hidretos (Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry)

IAC – Instituto Agrônomo

IAPAR – Instituto Agrônomo do Paraná

IAEA – Agência Internacional de Energia Atômica

ICP OES – Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry)

ICP-MS – Espectrometria de Massa com Plasma Acoplado Indutivamente (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)

INAA – Análise por Ativação Neutrônica Instrumental (Instrumental Neutron Activation Analysis)

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade na Saúde

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

INPM – Instituto Nacional de Pesos e Medidas

IPEN - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

IPT – Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo

ISO – International Organization for Standardization

k– Fator de Abrangência

LD – Limite de Detecção

LIBS - Espectrometria de Emissão com plasma induzida por laser (Laser Induced Breakdown Spectroscopy)

LQ – Limite de Quantificação

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MIP-AES - Espectrometria de emissão atômica com plasma induzido por micro-ondas (Microwave Plasma-Atomic Emission Spectrometer)

MR– Material de Referência

MRC – Material de Referência Certificado

NBS – National Bureau of Standards

NIST –National Institute of Standards and Technology

NRCC - National Research Council Canada

RSD – Desvio Padrão Relativo (Relative Standard Deviation)

SI – Sistema Internacional

SLS-GF AAS - Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite com amostragem em suspensão (Slurry Sampling Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry)

SLS-HG AAS - Espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos e amostragem de suspensão (Slurry Sampling Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry)

U – Incerteza Expandida

u_{bb}– Incerteza Padrão da Homogeneidade

u_{char} – Incerteza Padrão da Caracterização

u_{lts} – Incerteza Padrão da Estabilidade a Longo Prazo

U_{MR}– Incerteza Expandida do Material de Referência

U_{MRC} – Incerteza Expandida do Material de Referência Certificado

UNCTAD - Conferência das Nações Unidas para o Comércio e o Desenvolvimento (United Nations Conference on trade and development)

u_{sts} – Incerteza Padrão da Estabilidade a Curto Prazo

UV-VIS - Espectroscopia Ultravioleta/visível (*Ultraviolet-visible spectroscopy*)

VIM – Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia

σ_p – Desvio Padrão Alvo

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Fluxograma das etapas da caracterização do MRC e suas respectivas incertezas associadas [25].	19
FIGURA 2 – Evolução anual da balança brasileira e do agronegócio entre 1989 e 2014 (US\$ bilhões) [59].	27
FIGURA 3- Processos que levam a produção de átomos, moléculas e íons em sistemas [90].	34
FIGURA 4 – Distribuição do tamanho de partícula da amostra de fosfato de rocha moída em moinho de almofariz e pistilo.	44
FIGURA 5 – Distribuição do tamanho de partícula da amostra de fosfato de rocha moída em moinho de copos de alta rotação.	44
FIGURA 6 – Aspecto do material candidato antes da moagem (A) e depois da moagem (B) em moinho de alta rotação (foto de celular).	45
FIGURA 7- Equipamentos utilizados para ajuste de tamanho de partícula (A) moinho de copos de alta rotação e (B) moinho de almofariz e pistilo e (C) peneira vibratória.	46
FIGURA 8–Homogeneizador tipo Y utilizado para homogeneizar o material (A) e tambores de plástico utilizados para separar cada porção do material.	47
FIGURA 9- Material de fosfato de rocha após envase em frascos tipo âmbar e imagem do frasco contendo 100 gramas do material de fosfato de rocha, rotulado, numerado e embalado em embalagem apropriada.	48
FIGURA 10 – Homogeneidade interamostral para alumínio.	71
FIGURA 11 – Homogeneidade interamostral para arsênio.	72
FIGURA 12 – Homogeneidade interamostral para Cálcio.	72
FIGURA 13 – Homogeneidade interamostral para cádmio.	72
FIGURA 14 – Homogeneidade interamostral para cobre.	73
FIGURA 15 – Homogeneidade interamostral para cromo.	73
Figura 16 – Homogeneidade interamostral para Ferro.	73
FIGURA 17 - Homogeneidade interamostral para fósforo.	74

FIGURA 18 – Homogeneidade interamostral para magnésio.	74
FIGURA 19 – Homogeneidade interamostral para manganês.	74
FIGURA 20 – Homogeneidade interamostral para níquel.	75
FIGURA 21 – Homogeneidade interamostral para potássio.	75
FIGURA 22 – Homogeneidade interamostral para sódio.....	75
FIGURA 23 - Homogeneidade interamostral para vanádio.	76
FIGURA 24 – Homogeneidade interamostral para zinco.....	76
FIGURA 25–Estabilidade a curto prazo para alumínio.	80
FIGURA 26 – Estabilidade a curto prazo para arsênio.....	81
FIGURA 27 – Estabilidade a curto prazo para cálcio.....	81
FIGURA 28 – Estabilidade a curto prazo para cádmio.	82
FIGURA 29 – Estabilidade a curto prazo para cromo.	82
FIGURA 30 – Estabilidade a curto prazo para cobre.	83
FIGURA 31 – Estabilidade a curto prazo para ferro.	83
FIGURA 32 – Estabilidade a curto prazo para potássio.	84
FIGURA 33 – Estabilidade a curto prazo para magnésio.....	84
FIGURA 34 - Estabilidade a curto prazo para manganês.....	85
FIGURA 35 - Estabilidade a curto prazo para sódio.	85
FIGURA 36 – Estabilidade a curto prazo para fósforo.....	86
FIGURA 37 – Estabilidade a curto prazo para níquel	86
FIGURA 38 – Estabilidade a curto prazo para vanádio.....	87
FIGURA 39 – Estabilidade a curto prazo para zinco.....	87
FIGURA 40 – Estabilidade a longo prazo para alumínio.	90
FIGURA 41 – Estabilidade a longo prazo para arsênio.....	91
FIGURA 42 – Estabilidade a longo prazo para cálcio.....	91
FIGURA 43 – Estabilidade a longo prazo para cádmio.....	92
FIGURA 44 – Estabilidade a longo prazo para cromo.	92
FIGURA 45 – Estabilidade a longo prazo para cobre	93
FIGURA 46 – Estabilidade a longo prazo para ferro.....	93

FIGURA 47 – Estabilidade a longo prazo para potássio.	94
FIGURA 48 – Estabilidade a longo prazo para magnésio.	94
FIGURA 49 – Estabilidade a longo prazo para manganês.	95
FIGURA 50 – Estabilidade a longo prazo para sódio.	95
FIGURA 51 – Estabilidade a longo prazo para fósforo (avaliado ao longo de 12 semanas).	96
FIGURA 52 – Estabilidade a longo prazo para níquel.	96
FIGURA 53 – Estabilidade a longo prazo para vanádio.	97
FIGURA 54 – Estabilidade a longo prazo para zinco.	97
FIGURA 55 – Sistema de decomposição por combustão iniciada por radiação micro-ondas [123].	130

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Principais produtores de MRCs cadastrados no COMAR.....	22
TABELA 2– Materiais de Referência Certificado de fosfato de rocha cadastrados no COMAR e os países produtores.	32
Tabela 3– Teores de P, Ca, Cd, Cr, Pb, Ni e As determinados pelos métodos indicados pelo MAPA.	43
TABELA 4 – Programa de aquecimento do forno de micro-ondas proposto por Kane & Hall [84]......	51
TABELA 5 – Parâmetros instrumentais empregados nas determinações por ICP-OES.....	53
TABELA 6– Laboratórios participantes do Ensaio Colaborativo.	59
Tabela 7 – Limites de detecção (LD), limites de quantificação (LQ), faixa linear, comprimento de onda e orientação da tocha na determinação por ICP OES de Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, V e Zn, em fosfato de rocha candidato a MR.	62
TABELA 8 – Média das concentrações, obtidas por ICP OES, para o material de referência certificado de Phosphate Rock (NIST 694) (n=3) utilizando a digestão assistida por radiação micro-ondas.	63
TABELA 9 – Média das concentrações, obtidas por ICP OES, para o material de referência certificado Trace Elements in Multi-Nutrient Fertilizer (NIST 695) (n=3) utilizando a digestão assistida por radiação micro-ondas.	64
TABELA 10 – Média das concentrações obtidas por ICP OES, para o material de referência certificado de Phosphate Rock (NIST 694) (n=3) utilizando o bloco digestor.	65
TABELA 11 – Média das concentrações, obtidas por ICP OES, para o material de referência certificado de Trace Elements in Multi-Nutrient Fertilizer (NIST 695) (n=3) utilizando o bloco digestor.....	65
TABELA 12. Média das concentrações, obtidas por LIBS, para os materiais de referência certificado 694 e 695 (n=3).	66

TABELA 13 – Umidade residual da amostra candidata a MR de fosfato de rocha determinado em estufa a 105°C por 24 h.	67
TABELA 14 – Frações de massa de Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, V e Zn obtidas nas porções amostradas após determinação por ICP OES. (n=7).	68
TABELA 15 –Dados da ANOVA fator único para a estimativa da massa mínima da amostra candidata a material de referência.	70
TABELA 16 – Dados da ANOVA fator único para o estudo de homogeneidade entre os frascos da amostra de fosfato de rocha candidata a MR.	77
TABELA 17 – Dados da ANOVA fator único dos frascos armazenados a 37°C e umidade relativa de 100% por um mês, para o estudo de estabilidade a curto prazo da amostra de fosfato de rocha candidata a MR.	88
TABELA 18 – Dados da ANOVA fator único para o estudo de estabilidade a longo prazo da amostra de fosfato de rocha candidata a MR.	98
TABELA 19 – Teste t obtido por ICP OES e LIBS (P) para o estudo de estabilidade a longo prazo.	101
TABELA 20 – Resultados obtidos pelos participantes do ensaio colaborativo para caracterização do candidato a material de referência de fosfato de rocha para valores totais dos elementos (mg kg ⁻¹).	104
TABELA 21 – RSD Horwitz teórico entre a precisão de um método de análise e a concentração da substância [107].	110
TABELA 22 – Estimativas das incertezas padrão da caracterização (u_{car}), homogeneidade (u_{bb}), estabilidade a curto prazo (u_{sts}), estabilidade a longo prazo (u_{lts}) e a incerteza expandida (U_{MR}) para cada mensurando no MR de fosfato de rocha.	114
TABELA 23 - Porcentagem de contribuição de cada incerteza obtida para o MR de fosfato de rocha.	115
TABELA 24 – Valores de referência para os teores totais atribuídos aos mensurados determinados no MR de fosfato de rocha (mg kg ⁻¹ e %).	116

Tabela 25– Valores informativos para os teores totais atribuídos aos mensurados determinados no MR de fosfato de rocha (mg kg^{-1}) por INAA, análise por ativação neutrônica instrumental, realizada somente por um laboratório.....	116
TABELA 26. Comparação dos entre os valores atribuídos e os métodos oficiais desenvolvidos pelo MAPA.....	117
TABELA 27 – Parâmetros instrumentais empregados nas análises por ICP-MS.	135
TABELA 28 – Resultados dos fatores de correção para as amostras de MRs para determinação da massa seca.....	136
TABELA 29 – Programa de aquecimento do forno de micro-ondas para decomposição das amostras.	138
TABELA30 – Avaliação do sistema de combustão iniciada por radiação micro-ondas para o material de referência NRC Tort-3 (Hepatopâncreas de lagosta).	141
TABELA 31 – Otimização do sistema de combustão iniciada por radiação micro-ondas para o material de referência NIST Apple Leaves (Folhas de Maçã)	142
TABELA 32 – Resultados da comparação dos métodos utilizados pelo NRC utilizando digestão assistida por radiação micro-ondas para Tort-3 e Dolt-5 e ICP-MS.....	142
TABELA 33 – Resultados das determinações utilizando o método proposto pelo NRC utilizando digestão assistida por radiação micro-ondas para Apple Leaves.	143
TABELA 34 – Aplicação do método proposto e dos métodos comparativos na amostra de RM-Agro E3001a fígado bovino por ICP-MS	144
TABELA 35 - Aplicação do método proposto e dos métodos comparativos na amostra CRM - Agro E1001a. As determinações foram feitas por ICP-MS....	145

TABELA 36 - Limites de detecção, quantificação, faixa linear para determinação dos elementos As, Cd, Cu e Pb utilizando o sistema de combustão iniciada por radiação micro-ondas e posterior determinação por ICP MS. 146

TABELA 37 - Limites de detecção, quantificação, faixa linear para determinação dos elementos As, Cd, Cu e Pb utilizando o sistema de digestão assistida por radiação micro-ondas e posterior determinação por ICP MS. 146

RESUMO

PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE MATERIAIS DE REFERÊNCIA PARA NUTRIENTES E CONTAMINANTES INORGÂNICOS EM AMOSTRAS AGRONÔMICAS.

A intensa busca por confiabilidade de resultados torna cada vez mais importante o papel dos materiais de referência, principalmente em química analítica, pois fornecem referências metrológicas visando assegurar a rastreabilidade de medições e ainda são fundamentais para a validação de métodos analíticos. O aumento da demanda por novos materiais de referência é gradativo em todas as áreas do conhecimento, porém os setores agropecuários e de alimentos estão entre os mais carentes. No Brasil, essa demanda é atendida somente pela importação do material a custos elevados, sendo freqüente a inexistência de materiais adequados às necessidades do país. Nesse contexto, o presente trabalho visou à produção de material de referência para nutrientes e contaminantes inorgânicos em fosfato de rocha, matéria-prima utilizada para a fabricação de fertilizantes. O material foi produzido seguindo as seguintes etapas, estabelecidas internacionalmente pelas ISO GUIAS 30 a 35: preparo e envase do material, avaliação da homogeneidade, teste de estabilidade a curto e a longos períodos e na caracterização prévia, que consistiu na montagem do ensaio colaborativo, com a distribuição do material preparado a laboratórios que se dispuseram a colaborar com o projeto. Ainda foram realizados estudos voltados ao preparo da amostra visando a rapidez e redução de uso de reagentes. A avaliação da estimativa da massa mínima, da homogeneidade e da estabilidade do material foi realizada utilizando-se como técnica de determinação a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). Para a determinação de fósforo foi avaliado o emprego de espectrometria de emissão com plasma induzida por laser (LIBS). Os resultados

foram submetidos à análise de variância de fator único (ANOVA) e a homogeneidade e a estabilidade do material apresentaram médias dentro do intervalo de confiança de 95%. Os resultados obtidos durante o preparo e através do ensaio colaborativo possibilitaram a caracterização química e o cálculo das incertezas relativas a cada etapa do preparo do material, sendo elaborada a carta controle com os resultados do material de referência e as incertezas expandidas para cada um dos analitos em estudo. Parte do trabalho foi desenvolvido junto ao National Research Council Canada (NRCC) em Ottawa no Canadá, onde foi avaliada a aplicabilidade do sistema de combustão iniciada por radiação micro-ondas no preparo de amostras de materiais de referência nacionais anteriormente preparados, fígado bovino (RM-Agro E3001a) e forrageira (RM-Agro E1001a), para a determinação de As, Cd, Cu e Pb por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), sendo obtidos resultados que poderão ser aplicados em outros materiais orgânicos e inorgânicos.

ABSTRACT

PRODUCTION AND EVALUATION OF REFERENCE MATERIALS FOR NUTRIENTS AND INORGANIC CONTAMINANTS IN AGRONOMICAL SAMPLES.

The intensive search for the reliability of results increases the role of reference materials, mainly in analytical chemistry, because they provide metrological references to ensure traceability of measurements and are still central to the validation of analytical methods. The increasing demand for new reference materials is gradual in all areas of knowledge, but the agricultural and food sectors are among the neediest. In Brazil, this requirement is met only by the import of the material at high costs, being frequently the lack of adequate material to the needs of the country. In this context, this work aimed at the production of reference material for inorganic nutrients and contaminants present in a phosphate rock, the raw material used to manufacture fertilizers. The material was produced by following the next steps, internationally established by ISO GUIDES 30 to 35: preparation and packaging material, assessment of uniformity, stability test in short and long periods and in prior characterization that was the assembly of the collaborative trial, with the distribution of the prepared material to laboratories that were willing to collaborate with the project. Sample preparation studies also have been conducted, aimed at speed and reduced use of reagents. The evaluation of the estimated minimum mass, homogeneity, and stability of the material was performed using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) as determination technique. Phosphorus determination was evaluated by laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS). Analysis of single-factor variance (ANOVA) was applied to results and the homogeneity and stability of the material presented averages within the 95% confidence interval. The

obtained results along the preparation and with collaborative trials allowed the chemical characterization and the determination of the uncertainties related to each stage of the preparation of the material, and final preparation of the chart control with results of the reference material with the expanded uncertainty for each of the analytes under study. Part of the work was developed by the National Research Council Canada (NRCC) in Ottawa in Canada. The applicability of the microwave-induced combustion for sample preparation of previously prepared national reference materials, bovine liver (RM-Agro E3001a) and forage (RM E1001a-Agro) was evaluated for the determination of As, Cd, Cu, and Pb by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), and the results could be applied in other organic and inorganic materials.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	XVIII
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. OBJETIVOS.....	9
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
3.1 MATERIAL DE REFERÊNCIA E MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO	11
3.2 PRODUÇÃO DE UM MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO	13
3.2.1 Teste de Homogeneidade	15
3.2.2 Teste de Estabilidade.....	16
3.2.3 Caracterização e incerteza do material de referência certificado.....	17
3.2.4 Preparação do certificado de análise	19
3.3 HISTÓRICO SOBRE A PRODUÇÃO DE MATERIAIS DE REFERÊNCIA	20
3.4 PRODUÇÃO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA NO BRASIL.....	23
3.5 FOSFATO DE ROCHA	28
3.6 MATERIAL DE REFERÊNCIA DE FOSFATO DE ROCHA	31
3.7 INSTRUMENTAÇÃO ANALÍTICA.....	32
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	39
4.1 PREPARO DO MATERIAL CANDIDATO	39
4.1.1 Obtenção do lote de fosfato de rocha.....	39
4.1.2 Moagem.....	43
4.1.3 Homogeneização	46
4.1.4 Envase.....	47
4.1.5 Determinação da umidade residual	48
4.2 DETERMINAÇÕES DOS ANALITOS POR ICP OES	50
4.2.1 Preparo de amostra utilizando digestão assistida por radiação micro-ondas e bloco digestor	50
4.2.2 Quantificação dos analitos por ICP OES	53
4.2.3 Determinação de fósforo por espectrometria de emissão com plasma induzido por laser	54
4.3 Estimativa da massa mínima da amostra candidata a material de referência	55
4.4 ESTIMATIVA DA HOMOGENEIDADE DA AMOSTRA CANDIDATA A MATERIAL DE REFERÊNCIA	55

4.5 ESTIMATIVA DA ESTABILIDADE DA AMOSTRA CANDIDATA A MATERIAL DE REFERÊNCIA	56
4.5.1 Estabilidade a curto prazo	57
4.5.2 Estabilidade a longo prazo	57
4.6 ENSAIO COLABORATIVO	57
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO.....	61
5.2 PREPARO DE AMOSTRA UTILIZANDO DIGESTÃO ASSISTIDA POR RADIAÇÃO MICRO-ONDAS E BLOCO DIGESTOR E POSTERIOR DETERMINAÇÃO POR ICP OES.	62
5.3 DETERMINAÇÃO DE FÓSFORO POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO COM PLASMA INDUZIDO POR LASER	66
5.4 DETERMINAÇÃO DA UMIDADE RESIDUAL	67
5.5 ESTUDO DA MASSA MÍNIMA DA AMOSTRA CANDIDATA A MATERIAL DE REFERÊNCIA	68
5.6 ESTIMATIVA DA HOMOGENEIDADE DA AMOSTRA DE FOSFATO DE ROCHA CANDIDATA A MATERIAL DE REFERÊNCIA	71
5.7 ESTUDOS DE ESTABILIDADE DO CANDIDATO A MATERIAL DE REFERÊNCIA DE FOSFATO DE ROCHA.....	80
5.7.1 Estabilidade a curto prazo	80
5.7.2 Estabilidade a longo prazo	90
5.8 ENSAIO COLABORATIVO	102
5.9 ESTIMATIVAS DAS INCERTEZAS	111
5.10 ATRIBUIÇÃO DOS VALORES DE PROPRIEDADES E INCERTEZAS OBTIDAS... ..	113
5.11 COMPARAÇÃO ENTRE OS VALORES ATRIBUÍDOS E OS MÉTODOS OFICIAIS DESENVOLVIDOS PELO MAPA.	117
6. CONCLUSÕES.....	120
CAPÍTULO 2	121
1. INTRODUÇÃO.....	123
2. OBJETIVOS.....	125
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	127
3.1 COMBUSTÃO INICIADA POR RADIAÇÃO MICRO-ONDAS	129
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	134
4.1 INSTRUMENTAÇÃO	134
4.2 REAGENTES E MATERIAIS	135

4.3 AMOSTRAS	135
4.3.1 Determinação do teor de umidade.....	136
4.4 PROCEDIMENTOS DE PREPARO DE AMOSTRA	136
4.4.1 Decomposição por combustão iniciada por radiação micro-ondas...	136
4.4.2 Decomposição assistida por radiação micro-ondas.....	137
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	141
5.1 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA DE COMBUSTÃO INICIADA POR RADIAÇÃO MICRO-ONDAS	141
5.2 COMPARAÇÕES DE PROCEDIMENTOS DE DECOMPOSIÇÃO ASSISTIDA POR RADIAÇÃO MICRO-ONDAS.....	142
5.3 APLICAÇÕES DO MÉTODO PROPOSTO UTILIZANDO O SISTEMA DE COMBUSTÃO INICIADA POR RADIAÇÃO MICRO-ONDAS E DOS MÉTODOS COMPARATIVOS NAS AMOSTRAS DE MATERIAIS DE REFERÊNCIA PRODUZIDAS NA EMBRAPA	144
6. CONCLUSÃO.....	149
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	151
APÊNDICE	166

Capítulo 1

Produção de material de referência para nutrientes e contaminantes inorgânicos em fosfato de rocha empregado na fabricação de fertilizantes.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Segundo o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), o Brasil possui aproximadamente 340 milhões de hectares de terras com condições para o plantio (cerca de 172 milhões de hectares são pastagens), além de possuir um clima diversificado, chuvas regulares, energia solar abundante e quase 13% de toda a água doce disponível no planeta. Somando todos estes fatores, logo se percebe que o Brasil possui excelentes condições no desenvolvimento do agronegócio, responsável por aproximadamente 23% do PIB total (produto interno bruto). As atividades agrícolas representam 70% do total da economia brasileira produzida no ano e a pecuária, cerca de 30%. Além disso, o Brasil exporta 42% de seus produtos agrícolas, sendo o setor agropecuário responsável por 37% dos empregos no País. Segundo a Assessoria de Gestão Estratégica do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (AGE/Mapa), os resultados obtidos indicam que houve expansão não apenas da produção das lavouras e da pecuária, mas também de insumos como fertilizantes e defensivos, além de máquinas e equipamentos [1].

O crescimento é gradativo e nos últimos 10 anos tem-se verificado um desempenho excepcional no ramo do agronegócio, praticamente dobrando o faturamento e resultando em um aumento de até 100% em seu saldo comercial, segundo dados obtidos em 2012 [1]. A Conferência das Nações Unidas para o Comércio e o Desenvolvimento (UNCTAD) estima que o Brasil será o maior produtor de alimentos na próxima década. O país já é considerado o maior produtor e exportador de alguns produtos como café, açúcar, álcool e suco de frutas e ainda lidera as vendas externas de soja, carne bovina, carne de frango, tabaco e couro. Devem-se ressaltar ainda as boas perspectivas para o algodão e para os biocombustíveis produzidos a partir da cana-de-açúcar e óleos vegetais, além de milho, arroz, frutas frescas, cacau, castanha, nozes, carne suína e pescado [2].

Grande parte do bom desempenho do agronegócio brasileiro pode ser atribuída ao desenvolvimento científico e tecnológico e à modernização da atividade rural, os quais são realizados a partir de pesquisas, mecanização e expansão da indústria. A adoção de programas de sanidade vegetal e animal, que garantem a produção de alimentos saudáveis, também são considerados um dos principais fatores que contribuem para que o país se transforme em uma das mais respeitáveis plataformas mundiais do agronegócio [3].

A intensa produção agrícola vem acarretando o crescente uso de insumos, que podem vir a causar impactos ambientais negativos, tais como a degradação de recursos naturais, a contaminação por produtos químicos e o acúmulo de dejetos. Devido a isso, há a necessidade de um monitoramento desses impactos, juntamente com o conhecimento e o controle dos materiais que estão sendo adicionados ao solo [3].

A qualidade dos produtos agropecuários, por exemplo, é demonstrada por resultados analíticos que precisam ser obtidos com qualidade, isto é, confiável ao uso pretendido, como forma de garantir a exatidão dos resultados. A aceitação mundial de resultados requer além da rastreabilidade, a confiabilidade e a comparabilidade de medidas, a redução de custos, o desenvolvimento de processos eficientes e o estabelecimento de condições justas de mercado [4].

Segundo o VIM (Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia), a rastreabilidade metrológica é a propriedade do resultado de uma medição ou do valor de um padrão estar relacionado a referências estabelecidas, geralmente a padrões nacionais ou internacionais, através de uma cadeia contínua de comparações, todas contendo incertezas estabelecidas. A rastreabilidade metrológica pode ser obtida a partir de uma combinação de práticas laboratoriais, como por exemplo, a calibração de equipamentos de medição com padrões que possuam 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; que os métodos utilizados tenham sua validade demonstrada; e que seja feito o uso de material de referência certificado de uma matriz que garanta o maior grau de similaridade possível com a amostra em questão [4-6].

Para garantir a rastreabilidade metrológica e a confiabilidade desejada, os laboratórios devem possuir procedimentos de qualidade e de certificação. Tais medidas incluem o uso de métodos de análise validados, o uso de procedimentos internos de controle de qualidade com o emprego de material de referência (MR) e material de referência certificado (MRC), além de procedimentos externos de controle de qualidade, tais como a participação em ensaios colaborativos. Dessa forma, é dada atenção especial a novos materiais de referência de melhor qualidade para maior precisão dos equipamentos de medição, devido à necessidade de dados mais exatos e confiáveis nas disciplinas científicas e tecnológicas [7].

Na “ciência da medição”, o papel do MRC já é bem estabelecido, pois fornece meios para verificar e calibrar procedimentos de medição e instrumentação. Além disso, a sua função básica é permitir o estabelecimento da rastreabilidade metrológica. Nesses materiais são citadas todas as metodologias utilizadas para determinar cada propriedade ou analito, sendo que a certificação pode ser realizada por um ou vários laboratórios, ou seja, são realizadas por meio de ensaios colaborativos que possibilitam, entre outros objetivos, analisar um material candidato a material de referência com o uso de metodologias reconhecidas, preferencialmente os métodos previamente validados. Os laboratórios participantes devem seguir as recomendações estabelecidas pelo produtor do material de referência, ou seja, empregar a metodologia e o procedimento analítico pré-estabelecidos no programa de certificação. Por permitirem a verificação da exatidão das medições, os materiais de referência certificados reduzem perdas causadas por resultados analíticos incorretos [8].

A importância dos CRMs é incontestável. Porém, o grande problema é que não há materiais suficientes disponíveis para atender as demandas em todos os setores, principalmente de produtos agropecuários e de alimentos, que estão entre os mais carentes de materiais de referência certificados [9,10].

No Brasil, essa demanda é atendida somente pela importação de países produtores a custos elevados. Além disso, para muitos setores não há disponibilidade de materiais adequados às necessidades brasileiras, uma vez que cada país produtor normalmente visa atender sua própria demanda. A seleção dos materiais de referência certificados desenvolvidos pelos grandes produtores mundiais tem sido pautada nas necessidades do usuário final, que precisa demonstrar a qualidade e a segurança dos produtos ofertados ao mercado consumidor nacional e internacional.

A aquisição destes materiais depende da importação de produtores internacionais que os comercializam a custos elevados. De uma maneira geral, a complexidade do preparo e caracterização dos materiais faz com que o preço final seja elevado. Além do custo, nem sempre é possível dispor de um material de referência da matriz semelhante à da amostra em estudo ou com níveis de concentração com a mesma ordem de grandeza, principalmente em relação a produtos agropecuários. Com isso, o domínio da tecnologia para a produção de materiais de referência no Brasil representa um avanço estratégico por colocar o país em condições de fornecer materiais específicos às suas próprias necessidades.

Dentro deste aspecto, a Embrapa Pecuária Sudeste apresenta vasta experiência como provedora de ensaios de proficiência visando o controle de resultados analíticos, tanto de materiais de origem animal como de origem vegetal ou mineral. A experiência adquirida nessa atividade e o acesso a diferentes laboratórios são facilitadores à implementação de ensaios

colaborativos para a obtenção de resultados de consenso durante a produção de materiais de referência.

Considerando a importância da disponibilidade de materiais de referência no Brasil e a experiência previa da Embrapa, pretende-se preparar um material de fosfato de rocha empregado na fabricação de fertilizantes, devido ao seu intenso uso em sistemas de agricultura e pela potencial presença de elementos tóxicos.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Preparar um material de referência de fosfato de rocha com valores estabelecidos de nutrientes e contaminantes inorgânicos para futura distribuição aos laboratórios do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e outros laboratórios nacionais.

2.1 Objetivos específicos

- Produzir material de referência de fosfato de rocha contendo teores estabelecidos dos analitos Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, V e Zn baseado em requisitos estabelecidos internacionalmente pelas ISO Guias 30 a 35.
- Desenvolver um método de preparo de amostra utilizando ácido diluído em forno de micro-ondas para a determinação de constituintes e contaminantes inorgânicos.
- Comparar os resultados obtidos com os métodos oficiais de preparo e determinação utilizados na rotina para que possam ser utilizados como métodos alternativos.
- Coordenar um programa interlaboratorial de análises.

Revisão Bibliográfica

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Material de Referência e Material de Referência Certificado

A constante busca em garantir a qualidade de uma medição obtida através de ensaios analíticos é o principal objetivo em laboratórios nos dias de hoje. Os resultados obtidos nesses ensaios são essenciais para a tomada de decisões em diversas áreas, como por exemplo, em indústrias, na saúde e no meio ambiente. Resultados não confiáveis trazem um elevado risco de decisões incorretas e podem acarretar custos mais elevados, riscos à saúde e práticas ilegais [11-13].

Com o aumento da produção agrícola, da globalização do comércio e da indústria, confiar nos próprios resultados não é suficiente, sendo necessário evidenciar essa confiabilidade através de resultados com rastreabilidade, para que sejam aceitos sem restrições. A qualidade dos resultados das medições tem sido considerada o centro de interesse de analistas químicos devido à crescente importância que esta área desempenha na economia e na sociedade. Muitos são os parâmetros que contribuem para a obtenção de resultados de medição confiáveis e comparáveis, como a competência do analista ou do laboratório, verificações de rotina de exatidão e precisão, validação de métodos analíticos para a acreditação dos laboratórios e o emprego de materiais de referência (RM), especificamente os materiais de referência certificados (CRM), que são ferramentas muito importantes e a base para a verificação de resultados de medições analíticas [14-16].

A Metrologia, ciência que se dedica ao aprimoramento de medições em todas as áreas do conhecimento, desempenha um papel importante, impulsionando o químico analista a se defrontar com o estabelecimento da rastreabilidade às medições geradas em seus experimentos e ensaios [17].

A rastreabilidade é um requisito importante para a garantia da qualidade dos dados analíticos nos mercados nacionais e internacionais. Segundo o VIM, “rastreabilidade metrológica” é a propriedade do resultado de uma medição estar relacionado a referências estabelecidas, geralmente padrões nacionais e internacionais, através de uma cadeia contínua de comparações, todas tendo as incertezas estabelecidas. A rastreabilidade de uma medida pode ser obtida a partir da combinação de equipamentos de medição calibrados com padrões que possuem sua rastreabilidade garantida ao Sistema Internacional (SI). Segundo De Bièvre, uma vez que uma cadeia de rastreabilidade metrológica é estabelecida, não se pode inverter a interpretação da sequência de operações após a medição, sendo considerada muito útil em qualquer modelo de medição [6,17].

Normalmente, as técnicas analíticas empregadas não possuem a característica de método primário de medição, sendo necessária uma calibração. A calibração na vasta área da análise instrumental, principalmente na forma de materiais de referência, vem se tornando uma necessidade na área de química analítica, sendo considerada como o principal campo de aplicação da metrologia química [14].

Assim, também de acordo com as definições metrológicas descritas no VIM, os MRs são amostras que possuem um ou mais valor de propriedade suficientemente homogêneo e bem estabelecido, de maneira que possa ser empregado na calibração de um instrumento de medição, na validação de um método analítico ou na atribuição de valores a um dado material. Já os MRCs são os materiais que são acompanhados por um certificado, com um ou mais valor de propriedade e ainda certificado por um procedimento que estabelece sua rastreabilidade metrológica para a obtenção exata da unidade na qual os valores foram expressos [6, 14, 18].

Os MRs e MRCs são designados como padrões a serem utilizados em Química Analítica, sendo normalmente empregados em diversas atividades

rotineiramente executadas nos laboratórios químicos, tais como verificação e validação de métodos; avaliação da eficiência dos resultados, estimativa das incertezas de uma medição, para calibração, em trabalhos de pesquisa e desenvolvimento, atividades de controle interno da qualidade e para fins de garantia externa da qualidade. Se vários laboratórios conseguem atingir o mesmo resultado analítico para um mesmo MRC, é um indicativo da comparabilidade de suas medições [11, 19-21].

A principal diferença entre os MRs e os MRCs é que, enquanto um material de referência específico pode ser adequado para controle de qualidade, mas não para validação de metodologia, a definição de MRC leva em conta o importante termo rastreabilidade, utilizado para relacionar o resultado de medição a uma referência, permitindo a esse tipo de material, usos variados e simultâneos.

Portanto, a utilização de MRs e MRCs tem influência na qualidade dos resultados gerados, uma vez que os mesmos possibilitam a transferência dos valores de grandeza entre diferentes laboratórios, garantindo a confiança, transparência, confiabilidade e aceitação dos resultados [11, 20].

3.2 Produção de um material de referência certificado

Com a intenção de estabelecer uma diretriz e fornecer orientações aos produtores de materiais de referência, onde são abordadas práticas de garantia de qualidade e a rastreabilidade do material preparado, seis guias foram publicadas pela International Organization for Standardization (ISO) e traduzidas para o português pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), que são reconhecidas internacionalmente: [19,20, 22-25].

- **ABNT ISO GUIA 30** (substituída pela ISO GUIDE 30: 2015 – Reference Materials – Selected terms and definitions) - Termos e definições

relacionados com materiais de referência - apresenta os termos e os significados associados em relação aos MRs.

- **ABNT ISO GUIA 31 (2004)** (substituída pela ISO Guide 31: 2015 - Reference materials - Contents of certificates, labels and accompanying documentation) - Materiais de referência - Conteúdo de certificados e rótulos - estabelece as informações que devem constar em um certificado de MR.

- **ABNT ISO GUIA 32(2002)**- Calibração em química analítica e uso de materiais de referência certificados - recomendações gerais para aqueles que enfrentam problemas relacionados à calibração e seleção e ainda uso de MR internos e dos MRCs.

- **ABNT ISO GUIA 33 (2002)** (substituída pela ISO Guide 33: 2015 - Reference materials - Good practice in using reference materials) - Utilização de materiais de referência certificados - discute a utilização de MRC e suas aplicações corretas.

- **ABNT ISO GUIA 34 (2012)** - Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência – estabelece os requisitos para o sistema da qualidade segundo os quais os MRs devem ser produzidos.

- **ABNT ISO GUIA 35 (2012)** – Princípios gerais e estatísticos para certificação - fornece princípios estatísticos para auxiliar na compreensão e desenvolvimento de métodos válidos para atribuir valores às propriedades de um MR, incluindo a avaliação de suas incertezas associadas, e estabelecer sua rastreabilidade metrológica.

Segundo um dos itens da ABNT ISO GUIA 34, os produtores de MRs necessitam ter um adequado sistema de qualidade para laboratórios de ensaio e calibração, preferencialmente baseados na norma ABNT NBR ISO/IEC 17025, para garantir a confiabilidade dos materiais preparados [20, 26]. Ainda, estabelece diretrizes para a produção do MRC que incluem: análise qualitativa para a verificação do tipo do material; usinagem, moagem, homogeneização,

peneiramento e quarteamento; determinação da distribuição dos tamanhos de partículas; limpeza de recipiente de amostra; secagem e esterilização; embalagem de amostras representativas do lote; testes de homogeneidade e estabilidade; e por fim, a caracterização das propriedades do MR [16, 20].

3.2.1 Teste de Homogeneidade

De todas as etapas do preparo, a homogeneização é uma das mais críticas, sendo considerado pré-requisito para um MR. De acordo com a ABNT ISO GUIA 30, a homogeneidade de um MR é a “condição de uniformidade de estrutura ou composição com respeito a uma ou mais propriedades especificadas. Um material é considerado homogêneo com respeito a uma determinada propriedade, se o valor da propriedade, determinado por ensaios em amostras de tamanho determinado se encontra dentro dos limites de incerteza especificados. As amostras podem ser tomadas de embalagens diferentes (frascos, pacotes, etc.) ou de uma única embalagem” [19].

A ABNT ISO GUIA 35 estabelece para o teste de homogeneidade que o número de frascos seja selecionado aleatoriamente, devendo incluir de 10 a 30 unidades do lote preparado. O planejamento para verificar os componentes de incerteza de um lote de um material preparado para fins de certificação deve indicar as variabilidades da amostra dentro do recipiente, assim como entre os recipientes que contêm os materiais que compõem o lote, devidamente envasados. A magnitude dos componentes de incerteza pode apresentar grande variabilidade, dependendo da natureza do material de referência. As análises para o teste devem ser realizadas em condições de repetitividade, ou seja, no mesmo laboratório, mesmo analista e testada no mesmo dia [25].

Além disso, na variabilidade entre os frascos, deve ser incluída a incerteza relativa a tal condição. A avaliação e a estimativa da incerteza são

calculadas com o emprego da análise de variância (ANOVA) de fator único [25].

O impacto da não homogeneidade de um dado material pode ser reduzido consideravelmente com a descrição de uso apropriadas. A ABNT ISO GUIA 34 recomenda e considera importante que se estabeleça a massa mínima de amostra para a utilização do material candidato a referência. Nesse caso, analisando intervalos de massa diferentes, pode-se estimar a massa mínima de amostra necessária para determinada aplicação [20]. A quantidade de massa mínima de amostra é determinada realizando-se um estudo de homogeneidade dentro do frasco para diferentes porções do ensaio e, como o desvio-padrão de homogeneidade dentro do frasco depende do número de partículas que possui certa propriedade, é possível determinar o número mínimo de partículas ou a porção mínima do ensaio. O desvio padrão de repetitividade de um método, s_r , está sempre incluído no desvio padrão obtido para análise, a massa mínima de amostra de um MRC que deve ser utilizada para que as informações de certificação sejam válidas é aquela em que o desvio padrão relativo obtido com determinada massa de amostra se iguala ao s_r [13, 27,28].

3.2.2 Teste de Estabilidade

A estabilidade dos MRs também é um requisito essencial, uma vez que é esperado que os materiais sejam estáveis e que resistam à degradação devido a fatores como luz, temperatura, oxidação e ação de micro-organismos, entre outros. Caso algum desses fatores seja crítico, o mesmo deverá ser observado em relação à disponibilização e comercialização do material.

A ABNT ISO GUIA 30 define estabilidade como a “capacidade do material de referência manter o valor de uma determinada propriedade dentro de limites especificados por um período de tempo pré-estabelecido, quando

estocado nas condições especificadas”. E esse teste é dividido em dois testes distintos de estabilidade: estabilidade a curto e a longo prazos [19].

O estudo de estabilidade a curto prazo simula as condições de transporte, garantindo que o material não sofrerá degradação por alteração de temperatura e umidade durante o transporte, por exemplo. A variação de temperatura é um fator chave na degradação do material e, portanto, frascos com o material são mantidos a diferentes temperaturas e analisados em função do tempo para verificar possíveis alterações de suas propriedades. Já o estudo de estabilidade a longo prazo (simula o tempo de “prateleira”) verifica se o material de referência pode ser armazenado em condições definidas, como à temperatura ambiente por exemplo. Os testes de estabilidade também são utilizados para estimar a contribuição da incerteza de medição associada à estabilidade do material, bem como definir as condições de armazenamento e de transporte [19,29].

A natureza do recipiente utilizado para armazenagem do material pode ter um grande significado em sua estabilidade. Caso seja escolhido de maneira inadequada pode vir a interagir com a amostra, afetando sua estabilidade [29].

3.2.3 Caracterização e incerteza do material de referência certificado

A caracterização do MRC tem como objetivo fornecer o valor de propriedade usando quatro abordagens de acordo com ABNT ISO GUIA 34: 1) medição por um único método primário, em um laboratório; 2) medição por dois ou mais métodos de referência independentes em um mesmo laboratório; 3) medição por uma rede de laboratórios com um ou mais métodos com exatidão demonstrável; 4) medição com método específico em um programa interlaboratorial realizado entre diferentes laboratórios [20].

Segundo a definição do VIM, o termo incerteza de medição é o “parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um

mensurado, com base nas informações utilizadas”. Obviamente, a confiança na precisão da medição dos resultados é muito maior quando acompanhada de um valor declarado de incerteza [6,30].

A GUIA EURACHEM/CITAC define que em química analítica, para a maioria dos fins, deve-se usar uma incerteza expandida, “U”. Através da incerteza expandida é possível obter um intervalo dentro do qual se crê encontrar-se o valor do mensurando, com um maior grau de confiança. O valor de “U” é obtido pela multiplicação da incerteza padrão combinada, (u), por um fator de abrangência (k). A escolha do fator k é baseada no grau de confiança desejado. Para um grau de confiança de aproximadamente 95%, o valor de k é 2 [4].

A incerteza final do MRC leva em consideração as incertezas associadas aos testes de homogeneidade, estabilidade e da caracterização do material. Assim, a incerteza expandida associada ao valor de propriedade de um MRC pode ser expressa pela Equação 1 [25].

$$U_{MRC} = k \sqrt{U_{char}^2 + U_{bb}^2 + U_{sts}^2 + U_{lts}^2} \quad (1)$$

Onde k é o fator de abrangência. As demais incertezas consideradas na equação se referem à incerteza padrão da caracterização (u_{char}), da homogeneidade (u_{bb}), da estabilidade a curto prazo (u_{sts}), da estabilidade a longo prazo (u_{lts}).

Na Figura 1 é apresentado um fluxograma das etapas da caracterização e suas respectivas incertezas associadas a cada etapa, que deve ser realizada para a produção de um MRC.

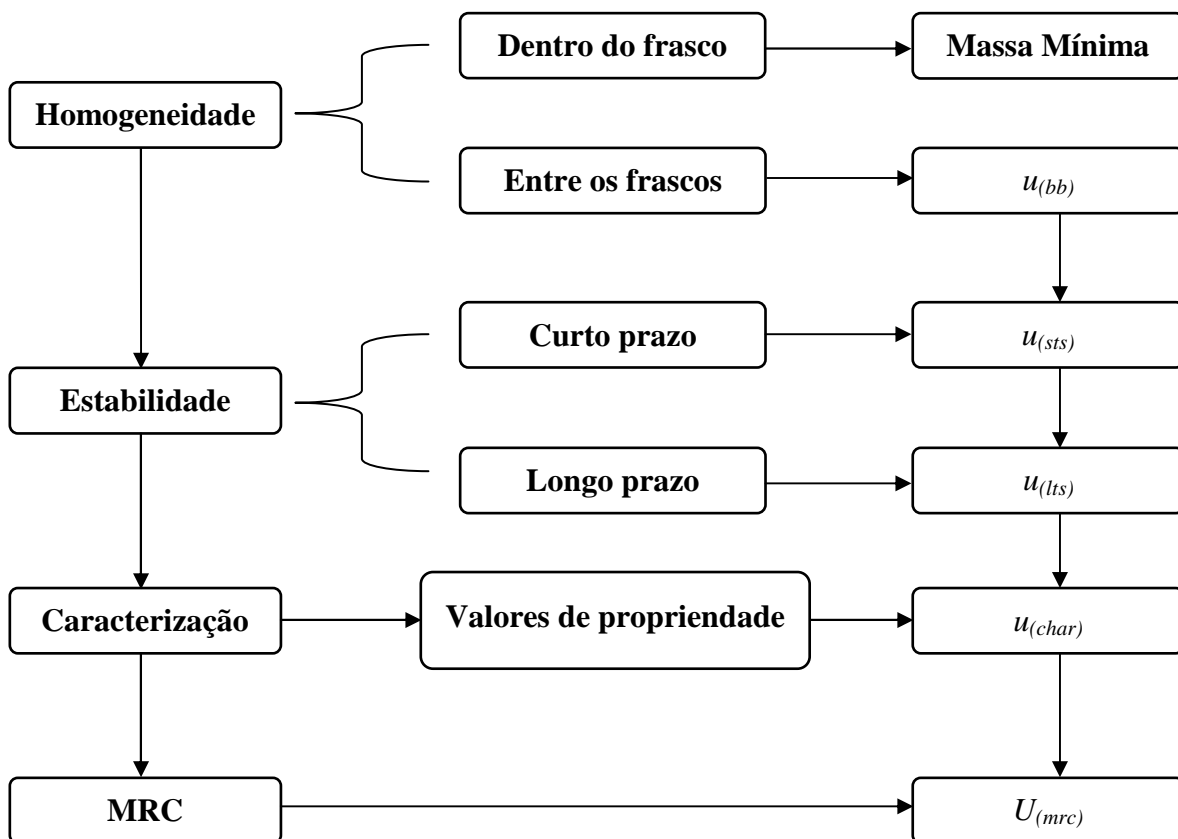


FIGURA 1 – Fluxograma das etapas da caracterização do MRC e suas respectivas incertezas associadas [25].

3.2.4 Preparação do certificado de análise

Uma vez que o MRC tenha sido apropriadamente caracterizado e seus valores atribuídos, um certificado de análise deve ser elaborado. A ABNT ISO GUIA 31 fornece os itens que o certificado deve conter, os quais incluem nome e endereço do produtor, descrição e nome do material, os valores de propriedade suas incertezas, data da certificação e o tempo de prateleira, o uso pretendido e se há alguma restrição ao seu uso, que podem incluir as condições de transporte e o armazenamento, instruções para o uso correto, o método de preparação, a declaração da homogeneidade e da estabilidade, os métodos de caracterização e se for apropriado, a lista de laboratórios participantes do processo de caracterização [22].

A rastreabilidade dos materiais de referência certificados pode ser obtida a partir de uma cadeia ininterrupta de calibrações ligadas a unidades relevantes, com base no sistema internacional, até o uso de resultados obtidos a partir de métodos de referência corretamente validados. Em cada caso, o produtor deverá incluir no certificado uma declaração da rastreabilidade, indicando os princípios e procedimentos aos quais os valores de propriedade estão baseados [25].

3.3 Histórico sobre a produção de materiais de referência

A produção de MR teve início no começo do século XIX. Devido à inexistência de padrões primários, era comum o uso de reagentes purificados ou de baixa pureza como padrão. Em 1824 Gay-Lussac, por exemplo, utilizou como padrão um óxido de As (III) purificado. Em função da adulteração do leite por diluição com água, em 1880 foi produzido em Londres o primeiro MR de matriz [31, 32].

O fato que pode ser citado como primeiro diretamente ligado à história dos MRs ocorreu em 1833, em Heightstown, EUA. O então presidente americano John Quincy Adams, acompanhado de Cornelius Vanderbilt estava dentro de um trem que sofreu um descarrilamento com vítimas. Esse tipo de acidente era comum naquela época devido a fraturas nas rodas de ferro fundido e, com o objetivo de prevenir a perda de outras vidas, foi criada a “Agência de Padrões” para certificar MRs [33].

Em 1905, a American Foundrymen’s Association em parceria com a Agência de Padrões, depois chamada de National Bureau of Standards (NBS), iniciou um trabalho para tentar resolver esses problemas de descarrilamento de vagões. Uma pesquisa realizada por essas agências mostrou que o problema poderia ser solucionado alterando-se a especificação do ferro fundido. Entretanto, os laboratórios das fundições fornecedoras das ferrovias não

realizavam medições exatas para garantir a composição dos seus produtos. O problema dos laboratórios era possuir uma fonte de materiais que pudessem ser analisados com exatidão, com composição dentro de especificações conhecidas e faixas aceitáveis. Quando o primeiro projeto foi terminado em 1906, quatro materiais constituídos de aparas de ferro fundido foram colocados a venda, juntamente com seus certificados de análise. Já em 1910 foi produzido um novo lote das amostras denominadas “amostras padrão” [33].

O sucesso dos MRs de ferro fundido contribuiu para a expansão do mercado de MRs. Em 1991 o catálogo já continha 25 MRC entre ligas metálicas, minérios de ferro e escória de cobre [33,34].

No período que compreendeu as duas guerras mundiais, a atividade de desenvolvimento de MRs cresceu lentamente. Durante os anos 50 e 60 houve uma aceleração de esforços para certificar MRs e a partir de então até 1969 já existiam 582 tipos de materiais disponíveis no catálogo da NBS [33,34].

O período de maior desenvolvimento em termos de quantidade e variedade de MRs ocorreu nos anos 70, sendo produzidos nos Estados Unidos, 600 novos MRs. Em 1979, já existiam 1060 tipos de materiais no catálogo, que incluía matrizes ambientais, naturais e biológicas, entre eles soro humano, tecido de plantas, sedimentos de rio e material particulado urbano [33].

Durante os anos 80 muitos avanços foram obtidos, principalmente no que diz respeito à certificação de parâmetros orgânicos de interesses ambientais. Também foram desenvolvidos MRs de farinha de trigo, farinha de arroz, fígado bovino, tecido de ostra e folhas de espinafre. Já nos anos 90 houve um grande progresso na certificação de vitaminas em misturas diet, fórmulas infantis e materiais alimentícios [33].

Segundo o COMAR (Banco Internacional de Dados de Materiais de Referência Certificados), atualmente existem 10.610 MRCs de diversas matrizes, compreendendo 283 produtores em 28 países cadastrados em seu banco de dados. A China é o país que possui a maior quantidade de produtores

de MRCs e o Japão o que possui uma maior quantidade de MRCs [35]. Na tabela 1 são apresentados os principais produtores de MRCs cadastrados no COMAR.

TABELA 1 - Principais produtores de MRCs cadastrados no COMAR.

Produtores	País	Website
NIST	Estados Unidos	http://www.nist.gov/
IRMM	Bélgica	http://irmm.jrc.ec.europa.eu/
BAM	Alemanha	http://www.bam.de/en/
LCG	Inglaterra	http://www.lcg.co.uk/
NMIJ	Japão	http://www.nmij.jp/
CENAM	México	http://www.cenam.mx/
IPT	Brasil	http://www.ipt.br

A literatura, atualmente reporta diversos estudos para a produção de MRs. Chew e colaboradores [36] produziram um material de cogumelo em pó para a determinação de Ca, As, Cd e Pb. Os resultados dos métodos validados foram comparados através de estudos interlaboratoriais em institutos nacionais de metrologia, sendo os valores reportados em excelente concordância com os valores de referência. As incertezas expandidas foram obtidas através da combinação da incerteza da caracterização (u_{char}) e da incerteza da homogeneidade (u_{bb}).

Oster e colaboradores [37] desenvolveram um MRC de partículas atmosféricas depositadas em filtros para monitoramento da qualidade do ar para determinação de As, Cd, Ni e Pb. Foram desenvolvidas todas as etapas para a certificação, como o teste de homogeneidade, avaliação da estabilidade e caracterização do material, juntamente com os cálculos da incerteza, baseados na ABNT ISO GUIA 35.

Ulrich e colaboradores [38] desenvolveram um MRC de amostras de peixe para a determinação de mercúrio e metilmercúrio. O material passou por todas as etapas de certificação, como a seleção do material, preparação, teste de homogeneidade, estudo de estabilidade e caracterização, baseados nas normas da ISO 30 a 35.

Caroli e colaboradores [39] realizaram um estudo piloto de produção de um MR para elementos-traço em mel. Os elementos considerados foram As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Sn, V e Zn, porém o material apresentou instabilidade em relação à estabilidade a longo prazo, não sendo possível sua disponibilização.

Sturgeon e colaboradores [40] desenvolveram um MRC de matriz de otólitos de peixe para determinação de Ba, Ca, Li, Mg, Mn, Na e Sr juntamente com as estimativas das incertezas. Valores de referência foram obtidos para Cd, Cu, Ni, Pb e Zn, porém estes elementos não foram certificados em função da elevada incerteza obtida pelo teste de homogeneidade.

Wang e colaboradores [41] produziram três MRCs para determinação do teor de água em soluções mistas de carbonato de xileno, butanol e propileno. Os CRMs foram certificados pelo método colorimétrico de Karl Fischer e por métodos volumétricos.

3.4 Produção de material de referência no Brasil

O grande crescimento industrial iniciado no século XX no Brasil impulsionou a necessidade do fortalecimento de instrumentos eficazes de controle de qualidade para proteger produtores e consumidores. Em 1961, foi criado o Instituto Nacional de Pesos e Medidas (INPM), que centralizou a política metrológica nacional, o qual foi substituído em 1973, pelo hoje chamado Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). O INMETRO atua em diversas funções, dentre elas a manutenção

e a conservação de padrões de medidas. Também tem a função de promover e manter a cadeia de rastreabilidade dos padrões das unidades de medida, executar atividades de acreditação de laboratórios de calibração e ensaio e produzir e comercializar padrões, como exemplos bioetanol, pH, condutividade eletrolítica, etanol em água, entre outros [42].

O início da produção de MRs para análise química no Brasil iniciou-se em 1975, com a criação do Núcleo de Padrões Analíticos, atualmente chamado de Agrupamento de Materiais de Referência, pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) localizado nas dependências da Universidade de São Paulo (USP), o qual desenvolveu mais de 130 MRCs, sendo eles minerais, metais, padrões físicos e de petróleo, constituídos de padrões de aço, ligas metálicas e minérios, entre outros [43].

Em 1978, o Centro de Tecnologia Mineral (CETEM) desenvolveu projetos envolvendo pesquisa tecnológica para o processamento mineral e metalúrgico e a prestação de serviços para a indústria mineral, onde foram produzidos MRs para carvão mineral seguido de minério de ouro [45]. Já em 1983, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade na Saúde (INCQS) – Fundação Oswaldo Cruz/Ministério da Saúde, desenvolveu MRs de matrizes biológicas para o controle de qualidade de produtos sujeitos à vigilância sanitária e de conjuntos de diagnósticos [44,45].

Um pequeno número de instituições produz e comercializa MRs no País. Segundo a base de dados do COMAR, o Brasil possui 138 MRCs cadastrados, sendo que 46% foram produzidos pelo IPT, 30% produzidos pelo INMETRO, 12% pelo CETEM e 11% pelo VISOMES. [35].

De uma maneira geral, a produção de MRCs no Brasil é recente e ainda se encontra em desenvolvimento. A contribuição do IPT está na produção de materiais para a área siderúrgica (aço, ferros fundidos, metais puros, ligas de cobre, refratários e minérios) e na indústria do petróleo, os quais se encontram descritos em publicações como um estudo sobre a homogeneidade de um lote de

material de silício metálico candidato a material de referência e a certificação de um material de minério de ferro [46,47].

O INMETRO, órgão responsável pela inserção de MR produzidos no Brasil junto ao COMAR, tem desenvolvido diversos materiais, tais como etanol em água, voltado à calibração de analisadores de álcool para determinação do teor alcoólico presente no ar expirado pelos condutores de veículos; materiais de soluções tampão para pH; cachaça; e solução de HCl [48]. Já o CETEM se caracteriza pela produção de materiais minerais, como exemplo MRC de bauxita e dois materiais para a indústria de cobre [49-51].

O Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) também tem atuado no desenvolvimento de MRs. Moreira e colaboradores produziram um material de referência certificado para 11 elementos em mexilhão [29, 52,53].

Fraga e colaboradores [54], do INMETRO, no Rio de Janeiro - RJ, desenvolveram um trabalho para a certificação de três parâmetros de qualidade eletroquímicos como ácido total, pH e condutividade eletrolítica que são utilizados para proteger da corrosão as partes metálicas de um veículo. A incerteza expandida foi calculada para todos os parâmetros obtidos através de testes de homogeneidade, estabilidade a curto e longo prazos e a caracterização, informada com um nível de confiança de 95%.

Carioni e colaboradores [55], da Universidade Federal do ABC e o Instituto de Química da USP, desenvolveram um estudo para avaliar os parâmetros para o preparo de um material de referência de atum para a determinação de arsênio total. As determinações foram realizadas por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite com amostragem em suspensão (SLS-GF AAS) e espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos e amostragem de suspensão (SLS-HG AAS). Os principais parâmetros avaliados foram: a homogeneidade, a segregação do analito durante a produção e a composição do material.

O mesmo grupo desenvolveu métodos analíticos para a determinação de mercúrio total e metilmercúrio visando à produção de MR de peixe. Foram investigados os parâmetros como homogeneidade, massa mínima de amostra, segregação e tamanho de partícula. Os principais métodos empregados foram espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CV AAS) e a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) [56].

Brandão e colaboradores [57], do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) e Instituto Federal de Ciência, Educação e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), realizaram estudos visando a produção de MR para microbiologia em uma matriz de queijo. Foram realizados testes de homogeneidade e de estabilidade, sendo que o material apresentou-se estável durante um período mais longo apenas quando conservado a -70°C . Outras temperaturas avaliadas foram avaliadas e à -20°C o material foi considerado estável durante 48 dias e a 35°C , foi à temperatura que ocasionou redução na concentração celular em quatro dias. Os autores concluíram que o material foi considerado homogêneo e adequado como MR e poderia ser transportado aos laboratórios participantes de um ensaio de proficiência a temperatura de até 35°C dentro de no máximo quatro dias, uma vez que os resultados indicaram a manutenção da concentração celular durante este período.

O Brasil vem crescendo no setor de produção de MRs, porém o setor de produtos agropecuários e de alimentos está entre os mais carentes. Essa demanda é atendida através da importação de países produtores a custos elevados, porém os mesmos nem sempre atendem as demandas em termos de combinação analito-matriz, que devem ser os mais próximos possíveis [58]. Essa deficiência de MR para o setor agropecuário torna-se crítica quando se observa a importância do agronegócio brasileiro. O Brasil somente poderá continuar e expandir suas exportações sendo competitivo e adequando os produtos nacionais às exigências do mercado internacional, através de resultados

validados e rastreáveis a sistemas internacionais. Portanto, se faz cada vez mais necessário, a utilização e o desenvolvimento de novos MRs e MRCs voltados para este setor. Na Figura 2 é representada a evolução anual da balança comercial brasileira e dos recursos relacionados ao agronegócio entre os anos 1989 e 2014 (Figura 2) [59].

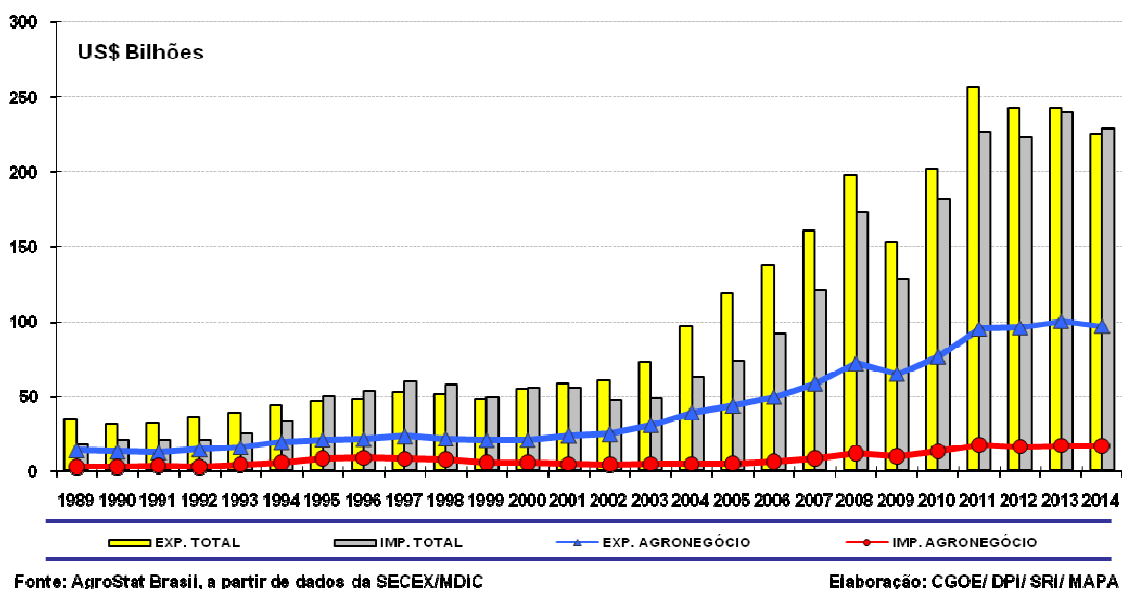


FIGURA 2 – Evolução anual da balança brasileira e do agronegócio entre 1989 e 2014 (US\$ bilhões) [59].

Em 1992, o Centro de Energia Nuclear na Agricultura, da Universidade de São Paulo (CENA, USP), em colaboração com a Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA), produziu o primeiro MR para o setor agropecuário, o qual foi denominado “Trace Elements in Soya Flour (IAEA RM-361), certificado para os elementos Br, Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Rb e Zn com os valores de consenso obtidos com 21 laboratórios participantes [60]. Outro estudo desenvolvido pelo CENA se refere à determinação da homogeneidade para uma amostra de café candidata a MR. Os analitos Br, Ca, Co, Cs, Fe, K, Na, Rb, Sc e Zn foram determinados por análise por ativação neutrônica instrumental (INAA) e, através do teste F, a homogeneidade para Ca, Co, Cs, K e Sc foi comprovada. [61].Recentemente o CENA, em conjunto

com a Empresa Pecuária Sudeste, em São Carlos e a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP de Ribeirão Preto, desenvolveu o projeto CRM - Agro - Materiais de Referência para Agricultura, Pecuária e Toxicologia, do qual a presente tese foi um desdobramento.

Outro desdobramento do CRM - Agro foi o projeto REPENSA que englobou, além dos participantes do CRM - Agro, outros produtores nacionais de MR, como o Instituto de Química da USP e o IPEN e laboratórios que participaram de ensaios colaborativos, como os laboratórios vinculados ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (LANAGRO/MAPA), Institutos Estaduais de Pesquisa (IAC, EPAGRI, IAPAR), laboratórios particulares e de outras universidades (UNESP e UNICAMP) [62].

A Embrapa Pecuária Sudeste produziu no escopo das atividades descritas anteriormente, quatro MRs: um MR de mistura mineral para gado de leite (CRM - Agro E2001a), contendo teores conhecidos de Ca, K, Na, P, Cu, Fe, Mn, Mg, Zn e os contaminantes As, Cd e Pb; um MR de forrageira (CRM - Agro E1001a), contendo teores conhecidos de Ca, P, Mg, K, Cu, Fe, Mn, Zn e Na e os contaminantes As, Cd, Cr e Pb; e um MR de solo para estudos ambientais (CRM - Agro E2002a), com teores conhecidos de As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Pb e um material de referência para fígado bovino (CRM - Agro E3001a), com teores conhecidos de As, Pb, Cd, Ca, Mg, Na, Fe, Cu, Zn, K, Mn, P, Co, V, Se, Sr e Mo, todos produzidos conforme as ISO Guias 30 a 35. Os materiais e seus certificados de análise estão disponíveis para distribuição no site da EMBRAPA (<http://www3.cppse.embrapa.br/materiaisdereferencia/>) [60, 63,64].

3.5 Fosfato de Rocha

O bom desempenho do agronegócio brasileiro pode ser atribuído, principalmente ao desenvolvimento científico e tecnológico e a modernização da

atividade rural, realizados através de pesquisas, mecanização e expansão da indústria. Todos esses fatores, somados a adoção de programas que garantem a produção de alimentos saudáveis, são considerados fundamentais para que o Brasil se transforme em uma das mais respeitáveis potências mundiais do agronegócio.

Devido à intensa produção agrícola e ao uso progressivo de insumos, as preocupações com os impactos ambientais negativos têm crescido, sendo necessário o conhecimento e monitoramento dos materiais que estão sendo adicionados, para evitar a ocorrência de impactos negativos [3,4].

A concentração de elementos tóxicos em alimentos depende de alguns fatores, como as condições do ambiente, os métodos de produção e processamento, a exposição a defensivos e fertilizantes, além do local de origem do produto agrícola, especialmente em relação à composição do solo. Os limites entre a essencialidade e a toxicidade de um elemento químico podem ser muito estreitos, tornando-os difíceis de discriminá-los [65,66].

A qualidade dos alimentos apresenta relação direta com os elementos químicos presentes nos solos cultivados. Os fertilizantes comerciais e corretivos do solo, largamente empregados em sistemas intensivos de agricultura ajudam a aumentar a produtividade agrícola, além de melhorar a qualidade através de incrementos no teor de alguns micronutrientes. Por outro lado, uma grande quantidade de elementos tóxicos é encontrada, principalmente na forma de impurezas originárias da matéria-prima ou do processo de produção, gerando motivos de preocupação sobre suas consequências ao meio ambiente e à saúde humana. Essas impurezas, entre as quais As, Cu, Hg, Mn, Pb, Sn e Zn, são encontradas em agroquímicos como inseticidas, herbicidas e fungicidas (especialmente nos sais orgânicos e moléculas organometálicas) e podem gerar resíduos no leite e na carne de animais. [62, 66,67].

O termo fertilizante refere-se a qualquer material, orgânico ou inorgânico, natural ou sintético, que forneça às plantas um ou mais elemento

necessário ao seu desenvolvimento normal e, ainda, devem repor ao solo os elementos retirados em cada colheita para manter o seu potencial produtivo estável [68].

Entre os elementos presentes nos fertilizantes, podem ser citados N, P e K, necessários em maiores quantidades para o desenvolvimento das culturas, assim como Fe, Cu, Mn e Zn, conhecidos como micronutrientes, por serem essenciais às culturas, porém em quantidades menores. Esses elementos têm funções essenciais no metabolismo das plantas e são constituintes de enzimas que controlam diferentes processos. A deficiência desses nutrientes pode afetar o crescimento das plantas. Por outro lado, os fertilizantes também podem conter elementos tóxicos que, mesmo em baixas concentrações são considerados perigosos, pois tendem à bioacumulação, o que pode ser tóxico para as culturas, contaminando a cadeia alimentar, estando associados a um grande número de efeitos adversos sobre a saúde humana. [69-72].

Já existem no Brasil Instruções Normativas que definem limites estabelecidos para teores máximos de elementos inorgânicos tóxicos presentes nos fertilizantes produzidos no país, assim como também são definidas metodologias analíticas para a determinação desses analitos, muitas delas baseadas nos protocolos estabelecidos pela Agência Americana de Proteção Ambiental, EPA (Environmental Protection Agency - EUA) [73,74].

A Instrução Normativa nº 27 de 2006 do MAPA dispõe sobre os limites máximos admitidos de metais tóxicos em fertilizantes e corretivos do solo. Em especial, o Anexo II trata de níveis máximos admitidos para fertilizantes minerais como nitrogênio, potássio e macronutrientes secundários [73]. A Instrução Normativa nº 24 de 2007 do MAPA, atualizada pelo Decreto nº 8.059, de 26 de julho de 2013, de acordo com o manual de métodos analíticos oficiais para fertilizantes e corretivos, estabelece os métodos reconhecidos para determinação de metais tóxicos em fertilizantes, corretivos de solo, corretivos agrícolas e substratos para plantas [74].

A disponibilidade de metais que estão presentes em baixas concentrações tem sido um problema crucial em pesquisas na área da agricultura e meio ambiente. Ultimamente, muitos estudos buscam informações a respeito da disponibilidade de metais no solo e sedimentos e o que pode interferir nos efeitos da mobilidade destes metais no solo para posterior avaliação das contaminações de águas subterrâneas, assim como sua possível fitotoxicidade [75].

O fósforo é um macronutriente que ocorre mais frequentemente sob a forma de cristais de estrutura complexa da família das apatitas e foi o primeiro elemento a ser adicionado como fertilizante mineral. As plantas absorvem o fósforo pelas raízes, principalmente sob a forma de íons H_2PO_4^- e HPO_4^{2-} . Os vegetais absorvem o fósforo de modo continuado, desde a germinação até a frutificação, sendo que sua ausência na nutrição vegetal limita o crescimento e a reprodução das plantas [76,77].

A rocha fosfática é utilizada industrialmente na produção de ácido fosfórico e na produção de vários tipos de fertilizantes fosfatados. Normalmente, a matéria-prima utilizada é a apatita, principal mineral encontrado nas rochas fosfáticas enriquecidas, sendo que dois terços dos fosfatos utilizados mundialmente provêm do Marrocos [76].

As indústrias de fosfato, cuja matéria-prima é constituída basicamente de rocha fosfatada, têm como principal objetivo a produção de fertilizantes fosfatados de alta solubilidade em água e com teores elevados de P_2O_5 para serem utilizados na recuperação de solos degradados e na transformação de solos inférteis em solos produtivos [78].

3.6 Material de Referência de Fosfato de Rocha

De acordo com base de dados COMAR, até outubro de 2015 tinham sido produzidos 10597 materiais de referência, sendo somente 123

voltados para a agricultura. Na Tabela 2 estão listados alguns MRCs de fosfato de rocha cadastrados no COMAR e os respectivos países produtores [35].

TABELA 2– Materiais de Referência Certificado de fosfato de rocha cadastrados no COMAR e os países produtores.

Código do MRC	Ano	País
IPT 18B	2011	Brasil
BCR – 032 (IRMM)	2010	Bélgica
SRM 694 (NIST)	1993	Estados Unidos

Na literatura é reportado um trabalho de Serrini e colaboradores, no qual foi desenvolvido um MRC de rocha fosfática originária do Marrocos, certificado para os analitos As, B, Cd, Cr, Co, Cu, Hg, Mn, Ni, Ti, V e Zn. A certificação foi realizada com a participação de 11 laboratórios de diferentes países europeus. No entanto, não está claro se este material se encontra disponível [79]. Dentre os demais materiais reportados no COMAR, um material nacional, produzido pelo IPT reporta teores de óxidos de Si, P (P_2O_5), Na, Mg, K, Ca, Al e Sr, sendo que o material, um concentrado de rocha fosfática, foi produzido com o objetivo de atender análises geológicas. O BCR-032 é comercializado por € 189,00 cada 100 g e o SRM-694 US\$ 269,00 cada 90 g. Desta forma, é pertinente a disponibilização de um material que venha a atender os laboratórios que realizam análises de fertilizantes [80].

3.7 Instrumentação Analítica

Para a determinação de elementos inorgânicos, geralmente é necessário que as amostras sejam solubilizadas, ou seja, necessitam de uma etapa prévia de preparo. Essa etapa pode ser considerada amais lenta em uma

metodologia analítica e onde podem ocorrer os erros mais críticos. Diversos procedimentos voltados ao preparo de amostras para a determinação de elementos em fertilizantes envolvem, usualmente, a decomposição por via úmida, utilizando aquecimento por blocos digestores ou fornos de micro-ondas, separação e pré-concentração com agentes complexantes ou extração assistida por ultra-som [81-87].

Para a determinação elementar em fertilizantes, a espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente, ICP OES, é reconhecida como uma técnica analítica eficaz devido à sua alta sensibilidade e, principalmente por sua capacidade de determinação multielementar. A técnica é bem estabelecida e tem sido amplamente utilizada em análises de rotina. A amostra é introduzida no plasma na forma de aerossol onde ocorre a evaporação do solvente e a formação de partículas sólidas. Em seguida ocorre a fusão, vaporização, dissociação para formação de átomos e íons livres e excitação com emissão de luz, como pode ser observado na Figura 3. O estado excitado é instável e os átomos e íons perdem energia em excesso, tanto por colisões com outras partículas como por transição por um nível de radiação de menor energia. Essa transição de energia para um nível mais estável ocorre com a emissão de fótons de luz que se propagam no meio com comprimentos de onda e frequências distintas, que geram espectros de emissão para se obter informações analíticas qualitativas e quantitativas [88, 89].

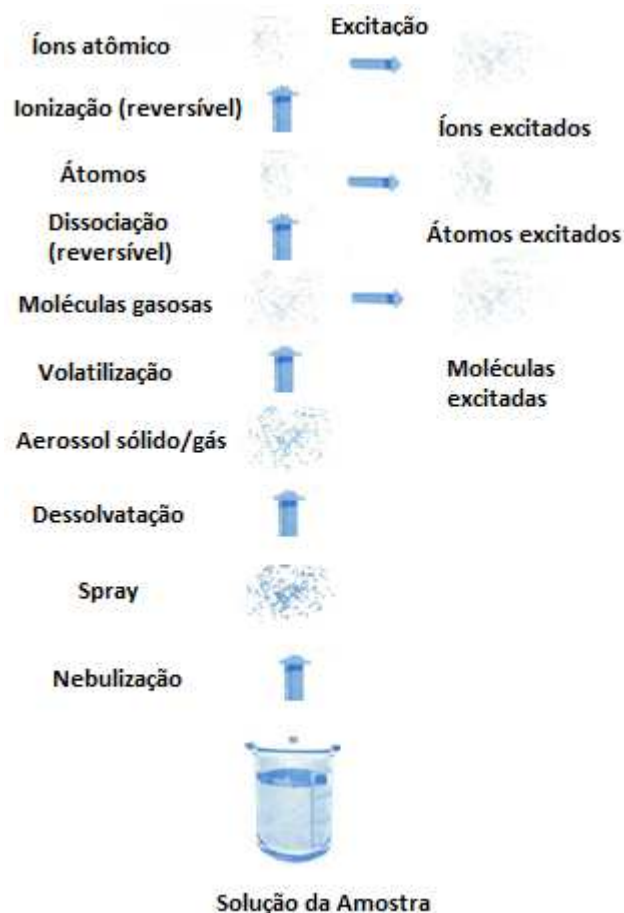


FIGURA 3- Processos que levam a produção de átomos, moléculas e íons em sistemas [90].

Souza e colaboradores [91] desenvolveram um método analítico para a determinação simultânea de macronutrientes (Ca, Mg, Na e P), micronutrientes (Cu, Fe, Mn e Zn) e oligoelementos (Al, As, Cd, Pb e V) em fertilizantes minerais. Um planejamento fatorial foi aplicado para avaliar as condições ótimas de reagentes utilizados na digestão. A exatidão e a precisão do método proposto foram avaliadas utilizando materiais de referência certificado e 21 amostras de fertilizantes foram coletadas e analisadas. O método apresentou boa precisão e foi efetivamente aplicado para a determinação simultânea dos analitos por ICP OES.

Kane e colaboradores [84] empregaram o método EPA 3051 no preparo de amostras de fertilizantes em um estudo colaborativo, com a finalidade de determinar As, Cd, Co, Cr, Pb, Mo, Ni e Se por ICP OES. Os

autores contaram com a colaboração de 14 laboratórios e utilizaram 62 diferentes amostras de fertilizantes. As médias dos teores de cada elemento, obtidas no estudo colaborativo, foram comparadas com as concentrações destes elementos nos MRCs e não houve diferença significativa entre os resultados, evidenciando que a metodologia aplicada foi satisfatória para analisar amostras de fertilizantes.

Nos últimos anos, uma alternativa que vem sendo muito utilizada principalmente em produtos agrícolas, amostras ambientais e industriais, é a espectrometria de emissão induzida por laser (LIBS), por se tratar de uma técnica que utiliza análise direta de sólidos e possibilitar determinações multi-elementares rápidas e simultâneas. .

Shawlon e colaboradores desenvolveram em 1958 a teoria necessária para construção do primeiro laser. Em 1960, com a construção do primeiro laser de rubi, foi possível estudar o potencial do uso de pulsos de laser na geração de pequenos plasmas [92,93].

A técnica LIBS tem como princípio fundamental a análise de emissões atômicas, iônicas e moleculares de espécies presentes em um plasma que é gerado por pulso de um laser de alta energia (a partir de 10 a centenas de mJ). Esse laser é focalizado por lentes na superfície da amostra. A amostra se dissocia no plasma e as espécies excitadas emitem radiação nos comprimentos de onda característicos de cada elemento. A radiação emitida é recolhida por um espectrômetro e a intensidade da mesma é utilizada como resposta analítica [94].

Nas décadas de 60 e 70, as pesquisas com LIBS declinaram devido ao elevado custo da instrumentação e o baixo desempenho analítico, comparadas com outras técnicas, tais como GF AAS e ICP OES. Entre as décadas de 80 e 90, com o desenvolvimento dos lasers e de outros componentes da LIBS, o interesse pela técnica reaparecesse e promoveu um grande avanço na adaptação da LIBS para análises qualitativa e quantitativa de diferentes amostras [95].

A popularidade da técnica LIBS na área de análises químicas é devido, principalmente, à sua versatilidade e simplicidade da estrutura operacional. Dentre as principais características da técnica destacam-se: a aplicação direta em amostras sólidas, líquidas ou gasosas, com o mínimo ou nenhum pré-tratamento da amostra; as massas amostradas variam de 0,1 a 100 μg , dependendo das características do laser e da amostra; é considerada uma técnica pouco destrutiva, pois o efeito de um único pulso de laser sobre a amostra compromete pouco sua integridade; permite a portabilidade do equipamento, podendo ser levado para análises em campo e possibilita fazer medidas à distância, permitindo a aplicação da técnica em ambientes insalubres, garantindo maior segurança ao operador. Apesar de todas essas vantagens a técnica LIBS apresenta sensibilidade e reprodutibilidade inferiores quando comparada com outras técnicas instrumentais analíticas já consolidadas, como o GF AAS, ICP OES, ICP-MS, principalmente quando se refere a amostras líquidas [96].

Nunes e colaboradores [97] desenvolveram um método para a determinação quantitativa de Cd, Cr e Pb em fertilizantes fosfatados por LIBS. Parâmetros do LIBS foram avaliados, tais como a fluência do laser, a distância entre lente-amostra, tempo de atraso, tempo de integração e número de pulsos por laser, utilizando um material de referência certificado. A calibração e a validação foram realizadas utilizando 30 amostras de fertilizante. O método proposto foi comparado utilizando digestão ácida assistida por radiação micro-ondas e posterior determinação por ICP OES e não houve diferenças significativas com um nível de confiança de 95%, mostrando que o método pode ser recomendado para a determinação destes analitos em amostras de fertilizantes.

Marangoni e colaboradores [98] desenvolveram um método quantitativo para determinação de fósforo em fosfatos de rochas utilizando a técnica de LIBS. Os espectros foram adquiridos através de diferentes amostras

de fertilizantes orgânicos e inorgânicos. Os resultados foram comparados utilizando ICP OES e materiais de referência certificado foram utilizados para a validação do método proposto. Foi desenvolvido um método para a remoção de “outliers” (valor aberrante ou atípico), bem como realizar a correção da linha de base e normalização de pico. Ao aplicar as correções propostas, a correlação linear entre o LIBS e o ICP aumentou de $R=0,76$ a $R=0,95$.

Procedimento Experimental

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Preparo do material candidato

4.1.1 Obtenção do lote de fosfato de rocha

Para a escolha da amostra candidata a MR de fosfato de rocha, inicialmente foram selecionadas cinco amostras comerciais, sendo que somente duas foram avaliadas em função da umidade e estabilidade, ou seja, as que se mostraram menos higroscópicas. As amostras, na forma de pó, foram homogeneizadas, pulverizadas e passadas em peneira de 0,30 mm. Em seguida, foram analisadas em conformidade com o protocolo estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para a determinação de P, Ca, Cd, Cr, Pb, Ni e As, conforme os procedimentos descritos a seguir:

Fósforo (P): foi utilizado o método gravimétrico do quimociac, que consiste na solubilização do fósforo da amostra por extração fortemente ácida e posterior precipitação do íon ortofosfato como fosfomolibdato de quinolina – $(C_9H_7N)_3H_3[PO_4 \cdot 12 MoO_3]$ – o qual é filtrado, seco e pesado. Os reagentes utilizados foram: a) ácido nítrico (HNO_3); b) ácido clorídrico (HCl); e c) reagente "Quimociac": dissolver 70 g de molibdato de sódio di-hidratado ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) em 150 mL de água. Dissolver 60 g de ácido cítrico cristalizado ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) em uma mistura de 85 mL de ácido nítrico concentrado e 150 mL de água. Esfriar e adicionar aos poucos, com agitação, a solução de molibdato à mistura de ácidos cítrico e nítrico. Dissolver 5 mL de quinolina sintética (C_9H_7N) em uma mistura de 35 mL de ácido nítrico e 100 mL de água. Adicionar esta solução, aos poucos, à solução de molibdato, ácido cítrico e nítrico; homogeneizar e deixar em repouso durante 24 horas. Filtrar,

juntar 280 mL de acetona, completar a 1 L com água e homogeneizar. Guardar esta solução em frasco de polietileno. Para a extração: a) pesar uma massa de 1 g da amostra (precisão de 0,1 mg) e transferir para béquer de 250 mL; adicionar 30 mL de ácido nítrico e 5 mL de ácido clorídrico concentrados. Ferver até cessar o desprendimento de vapores castanhos (NO_2) e a solução clarear. Adicionar 50 mL de água e ferver por 5 min. Deixar esfriar. Transferir a solução para balão volumétrico de 250 mL, completar o volume com água e homogeneizar. Filtrar através de papel de filtro de porosidade média, seco, desprezar os primeiros 20 a 30 mL e separar um volume de filtrado límpido, suficiente para a determinação.

Cálcio (Ca): Consiste na solubilização do cálcio presente na amostra por digestão ácida e determinação de sua concentração por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). Aplicável de modo geral e mais indicado para produtos com teores de cálcio abaixo de 5% em massa. Os reagentes utilizados foram: a) ácido clorídrico concentrado (HCl); b) solução de HCl (1:5) com água (aproximadamente 2 mol L^{-1}); c) solução de HCl (1:23) com água (aproximadamente $0,5 \text{ mol L}^{-1}$); d) ácido perclórico (HClO_4); e) ácido fluorídrico (HF); f) solução de lantânio, com 50 g L^{-1} : pesar 29,33 g de óxido de lantânio, La_2O_3 em um béquer de 400 mL e adicionar vagarosamente 250 mL de HCl (1:1) para dissolver o óxido. Transferir para balão volumétrico de 500 mL e completar o volume com água; g) solução padrão estoque de cálcio, contendo 500 mg L^{-1} de Ca: secar carbonato de cálcio (CaCO_3 , padrão primário) a $285 \pm 10 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 2 horas e manter em dessecador. Pesar uma massa em gramas igual a $[1, 2486 (100/P)]$ onde P é a pureza do sal utilizado em porcentagem em massa, transferir para um béquer de 250 mL e dissolver com 20 mL de solução de HCl (1:5). Transferir para balão volumétrico de 1 litro e completar o volume com água. No presente trabalho foi utilizada solução adquirida pronta para o uso, com rastreabilidade e grau de pureza analítica adequados; h) Solução padrão intermediária de Ca contendo 25 mg L^{-1} : transferir 25 mL da solução

estoque com 500 mg L^{-1} de Ca para balão de 500 mL e completar o volume com HCl (1:23); i) soluções padrão de leitura de Ca contendo 5 - 10 - 15 e 20 mg L^{-1} e o branco: transferir para balões de 25 mL: 5 - 10 - 15 e 20 mL da solução com 25 mg L^{-1} de Ca. Adicionar 5 mL de solução de lantânio a todos os balões e completar o volume com água. Preparar um “branco” com água e 5,0 mL da solução de lantânio também em balão volumétrico de 25 mL. Essas soluções devem ser usadas recém-preparadas. Para a extração: a) Pesar de 0,5 a 2,5 g da amostra, de acordo com a especificação do produto, com precisão de 0,1 mg. Transferir para um béquer de 150 mL e adicionar 10 mL de HCl concentrado para massas até 1 g de amostra. Para massas acima de 1g, aumentar proporcionalmente o volume de HCl concentrado. Cobrir com vidro de relógio e levar à ebulição moderada em placa ou chapa aquecedora até próximo à secura, sem deixar queimar o resíduo. Para amostras com teores acima de 5% em massa ou matérias-primas menos solúveis, esta etapa deverá ser repetida, com nova adição de HCl concentrado, aquecendo-se novamente até próximo à secura. Preparar, em paralelo, uma prova em branco; b) Acrescentar ao resíduo 20 mL da solução aquosa de HCl (1:5), ferver ligeiramente por 10 min, deixar esfriar e transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL. Para produtos concentrados este volume final poderá ser aumentado, de modo a permitir menores diluições para a leitura no FAAS. Neste caso, deve-se aumentar proporcionalmente o volume de HCl (1:5). Completar o volume com água e homogeneizar; c) filtrar em papel de filtro de porosidade média ou fina, se necessário, recebendo o filtrado em um recipiente seco.

Cádmio (Cd), Cromo (Cr), Níquel (Ni) e Chumbo (Pb): O método consiste na solubilização em meio ácido dos metais contidos na amostra e sua determinação por FAAS ou, alternativamente por ICP OES. Aplicável aos corretivos de acidez. Os reagentes utilizados foram: a) ácido clorídrico (HCl); b) solução aquosa de HCl (1:23) (aproximadamente $0,5 \text{ mol L}^{-1}$); c) soluções padrão estoque com 1000 mg L^{-1} dos metais: podem ser utilizadas soluções

certificadas adquiridas prontas ou serem preparadas a partir de padrões primários contendo os metais referidos; d) soluções de concentração intermediária (100 mg L^{-1}) dos metais, preparadas por diluição da solução-estoque com solução de HCl (1:23); e) soluções padrão de leitura, com concentrações de acordo com a faixa de leitura, para cada um dos elementos. Para a extração: a) Pesar de 1 a 2 g da amostra com precisão de 0,1 mg e transferir para béquer de 150 mL ou erlenmeyer de 125 mL ou tubo de digestão apropriado; b) acrescentar à amostra 5-10 mL de água, homogeneizar e adicionar, com cuidado, principalmente no início (devido à efervescência), 10 mL de HCl concentrado para cada grama de amostra tomada. Pesando-se mais de 1 g, aumentar proporcionalmente o volume de HCl concentrado; c) cobrir com vidro de relógio, levar ao banho-maria, ou placa aquecedora, ou bloco de aquecimento com temperatura controlada e ferver até reduzir o volume a 2-3 mL (estado xaroposo). Esfriar, adicionar 20 mL de água e 5 mL de HCl concentrado. Ferver por 10 min e deixar esfriar ligeiramente para permitir o manuseio. Filtrar com papel de filtro de porosidade média (ou fina, se necessário) para balão volumétrico de 100 mL ou de um volume mais adequado, de acordo com a concentração do contaminante na amostra, de modo a minimizar as operações de diluição; d) lavar o retido com água quente ($80-90^{\circ}\text{C}$), deixar esfriar e completar o volume. Homogeneizar, obtendo-se o extrato-amostra; e) fazer as diluições necessárias para leitura por FAAS, utilizando nas diluições solução aquosa de HCl (1:23).

Arsênio: Foi realizada por espectrometria de absorção atômica com chama acoplada a geração de hidretos (HG-FAAS). A solubilização da amostra foi realizada com o emprego de água régia invertida (HNO_3 : HCl 3:1 v/v) em chapa de aquecimento.

A Tabela 3 apresenta os resultados das determinações conforme os procedimentos utilizados pelo MAPA.

Tabela 3– Teores de P, Ca, Cd, Cr, Pb, Ni e As determinados pelos métodos indicados pelo MAPA.

Identificação	P ₂ O ₅ total %	Ca %	Cd mg kg ⁻¹	Cr mgkg ⁻¹	Pb mg kg ⁻¹	Ni mg kg ⁻¹	As mg kg ⁻¹
Fosfato de rocha 1	29,1	12,45	27,0	197	<10,0	29,0	5,7
Fosfato de rocha 2	31,1	17,25	18,9	295	<10,0	46,0	15,3

De acordo com os valores mais representativos de constituintes inorgânicos, principalmente de contaminantes, o material de fosfato de rocha 2 proveniente do Marrocos (Apatita- Valefert), foi selecionado para a produção do material candidato à material de referência. Assim, um total de aproximadamente 10 kg desse material foi separado e acondicionado em tambor de plástico.

4.1.2 Moagem

Em um estudo preliminar para avaliação do tamanho da partícula e a homogeneidade do material, foram empregados dois moinhos: (1) Moinho de almofariz e pistilo (Retsch modelo RM 200, Alemanha) e (2) Moinho de copos de alta rotação (Marconi modelo MA 630/1, Piracicaba, Brasil). Para esse estudo, retirou-se uma porção de aproximadamente 50 g da amostra previamente moída e submeteram-se a mesma aos dois tipos de moagem. Realizou-se um ensaio de distribuição de tamanho de partícula em um Analysette 22 MicroTec Plus (Fritsch, Alemanha) utilizando dispersão seca, conduzido pelo Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP). As Figuras 4 e 5 apresentam os resultados dos ensaios de tamanho de partícula utilizando o moinho de almofariz e pistilo e moinho de copos de alta rotação :

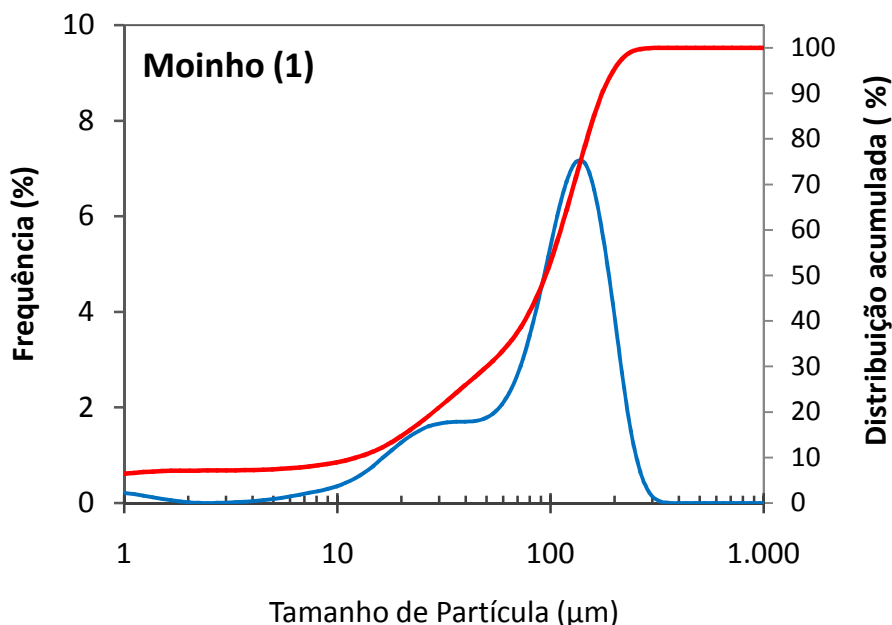


FIGURA 4 – Distribuição do tamanho de partícula da amostra de fosfato de rocha moída em moinho de almofariz e pistilo.

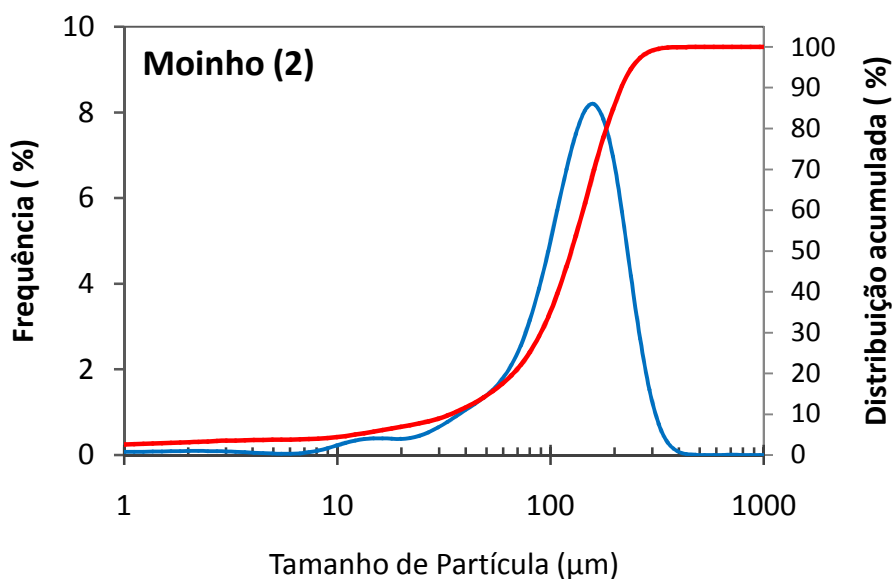


FIGURA 5 – Distribuição do tamanho de partícula da amostra de fosfato de rocha moída em moinho de copos de alta rotação.

A partir dos resultados provenientes do ensaio de distribuição do tamanho de partículas foi possível observar que houve uma ótima distribuição para o material candidato, que apresentou aproximadamente 80% do volume com partículas entre 177 e 216 μm . Porém, a amostra após moagem no moinho

2 (copos de alta rotação) apresentou-se mais homogênea do que a amostra moída no moinho 1 (almofariz e pistilo). Assim, optou-se por moer toda a amostra em moinho de alta rotação, que além ter um custo mais baixo, também apresenta-se mais rápido, facilitando o trabalho em rotina. Na Figura 6 são apresentados os aspectos da amostra antes e depois da moagem, sendo possível observar a heterogeneidade do material antes da moagem.

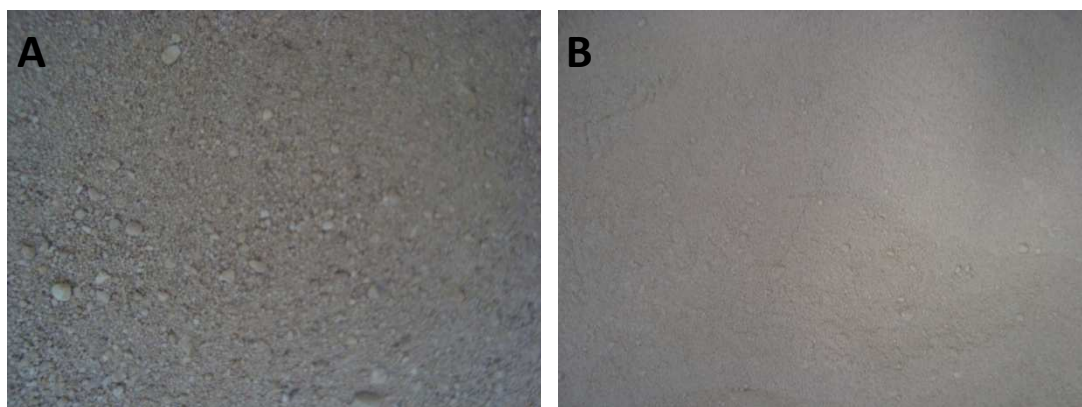


FIGURA 6 – Aspecto do material candidato antes da moagem (A) e depois da moagem (B) em moinho de alta rotação (foto de celular).

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, o material candidato foi moído em pequenas porções, de forma a evitar o aquecimento da amostra (devido ao atrito causado entre a amostra e a lâmina do moinho), o que poderia causar perdas por volatilização. Logo após a moagem, o material foi submetido a um agitador eletromagnético equipado com peneira com malha de 150 μm (Bertel, Caieiras, SP) conforme a Instrução Normativa nº 28 do MAPA para fertilizantes fosfatados [99]. Este procedimento foi realizado em porções de 500g em programa com duração de 10 min. O material retido na peneira foi submetido a uma nova etapa de moagem, até que todo o material estivesse na mesma granulometria. Na Figura 7 são apresentados os equipamentos utilizados para ajuste de tamanho de partícula.

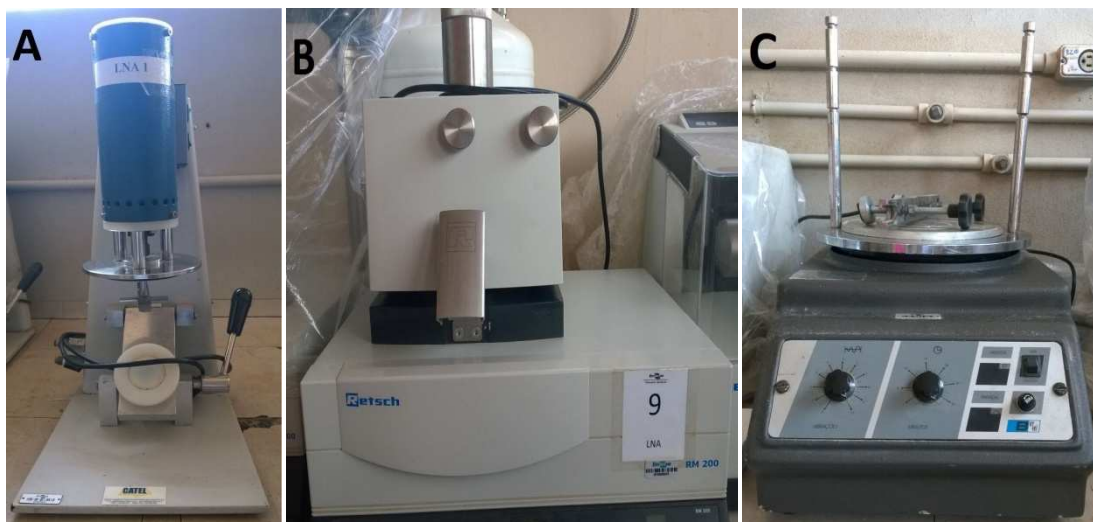


FIGURA 7- Equipamentos utilizados para ajuste de tamanho de partícula (A) moinho de copos de alta rotação e (B) moinho de almofariz e pistilo e (C) peneira vibratória.

4.1.3 Homogeneização

Para homogeneização, o material foi separado em dois tambores de plástico, com aproximadamente 5 kg de material em cada um e em seguida porções da amostra proveniente de cada tambor eram adicionadas em homogeneizador tipo Y (Marconi modelo MA 201/5MO, Piracicaba, Brasil) durante aproximadamente 20 min. Tal procedimento foi repetido até que todo o material dos tambores fosse homogeneizado. Esse procedimento foi repetido 3 vezes. Após homogeneização o material foi colocado novamente nos tambores e feita nova homogeneização. Na Figura 8 são apresentados o Homogeneizador tipo Y utilizado para homogeneizar o material candidato e os tambores de plásticos utilizados para separar cada porção do material.



FIGURA 8–Homogeneizador tipo Y utilizado para homogeneizar o material (A) e tambores de plástico utilizados para separar cada porção do material.

4.1.4 Envase

Após a moagem e homogeneização, o material foi envasado em frascos de vidro âmbar (boca larga) de 150 mL com tampa plástica de rosca e plexan interno (Samavidros, São Paulo, SP), previamente descontaminados em banho de HNO_3 10% (v/v) durante 48 h e secos em capela de fluxo laminar. Porções de 100 g da amostra foram pesadas em balança (Tecnal, Piracicaba, SP) e transferidas para os frascos previamente descontaminados, sendo produzidos 100 frascos, os quais foram nomeados de 1 a 100. Para a realização dos testes de homogeneidade foram sorteados 10 frascos e, para os testes de curto e longo prazos, foram sorteados mais 6 frascos, sendo 3 para cada teste.

Na Figura 9 é apresentado o envase do material de fosfato de rocha em frascos âmbar e o frasco contendo 100 gramas do material de fosfato de rocha, rotulado e enumerado.



FIGURA 9- Material de fosfato de rocha após envase em frascos tipo âmbar e imagem do frasco contendo 100 gramas do material de fosfato de rocha, rotulado, numerado e embalado em embalagem apropriada.

4.1.5 Determinação da umidade residual

Geralmente os resultados de análise em laboratórios de rotina são expressos em matéria seca, os quais devem ser facilmente realizados e claramente definidos. O teor de água em uma amostra depende da umidade do ambiente e da forma como a amostra foi armazenada, os quais podem variar devido a diversos fatores e, caso o método escolhido para a determinação dos analitos não garantia a obtenção de resultados reprodutíveis, o erro final pode ser considerado significativo [100].

Para a determinação da umidade residual do MR de fosfato de rocha foram selecionados, aleatoriamente, 2 frascos. O ensaio consistiu na secagem dos frascos vazios durante 2 horas em estufa a 105°C. Logo após, os frascos foram retirados da estufa e colocados em dessecador por 1 hora e pesados em balança analítica (Mettler AE200, Suíça) com precisão de 0,0001g e máxima de tara de 200 g. A seguir, foi adicionado 1 g de amostra em cada um dos frascos, que foram novamente pesados e transferidos para a estufa, que permaneceu a 105°C durante 24 h. Após este período, os recipientes foram retirados da estufa, colocados em dessecador por 1 h e pesados novamente [89].

A umidade residual foi determinada através da equação (2):

$$Umidade (\%) = 100 - \frac{(a - b) \times 100}{c} \quad (2)$$

a = peso do recipiente + amostra seca após 24 h de estufa

b = peso do recipiente seco após 2 h de estufa

c = peso da amostra

4.1.6 Reagentes e materiais

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico. Para o preparo das soluções utilizou-se água deionizada em um sistema de purificação Milli-Q® (Millipore, São Paulo, Brasil), com resistividade de 18,3 MΩcm. Para a digestão das amostras foi utilizado HNO₃ 37% (Aldrich Chemical, Estados Unidos) e H₂O₂ (30% v v⁻¹) (Aldrich Chemical, Estados Unidos). As soluções de referência para todos os elementos foram preparadas a partir da diluição de soluções estoque contendo 1000 mg L⁻¹ (Quemis high purity, Estados Unidos).

O HNO₃ foi previamente destilado abaixo do ponto de ebulição em destilador de quartzo (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil).

Todo material de laboratório utilizado no trabalho, incluindo os frascos utilizados para o envase do material, foi previamente lavado com detergente neutro e água corrente, enxaguado com água destilada e descontaminado por imersão em HNO₃ 10 % (v/v) por, no mínimo, 48h, sendo posteriormente lavado com água deionizada e seco em capela de fluxo laminar.

4.2 Determinações dos analitos por ICP OES

4.2.1 Preparo de amostra utilizando digestão assistida por radiação micro-ondas e bloco digestor

Geralmente, para a determinação de elementos inorgânicos, é necessário que as amostras sejam convertidas na forma de solução, ou seja, é necessário uma etapa de preparo de amostras, considerada crítica, pois pode ocasionar erros na determinação final, além de ser a etapa mais demorada. [81].

Os procedimentos analíticos de preparo de amostra para a determinação de elementos em fertilizantes envolvem, usualmente, a decomposição por via úmida utilizando blocos digestores ou micro-ondas através do aquecimento da amostra na presença de um ácido mineral oxidante, de mistura de ácidos oxidantes ou mistura de um ácido oxidante com peróxido de hidrogênio. Outras alternativas descritas na literatura envolvem a separação e pré-concentração com agentes complexantes e a extração assistida por ultrassom [72, 81-87].

No presente trabalho, a digestão das amostras foi realizada levando-se em consideração o caráter volátil de alguns elementos estudados, sendo a digestão assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado com cavidade o procedimento mais adequado, principalmente por evitar riscos de contaminação e perdas dos analitos por volatilização.

A maioria dos trabalhos descritos na literatura reporta o uso de ácidos concentrados durante o preparo de amostras de fertilizantes. Entretanto, o uso de ácidos diluídos nos procedimentos que empregam a digestão assistida por radiação micro-ondas tem sido considerado uma alternativa viável frente aos procedimentos convencionais de preparo de amostra, sem prejuízos para o desempenho analítico e proporcionando maior segurança e menor necessidade de diluições para se adequar aos procedimentos instrumentais, além de minimizar o volume de reagentes utilizado e a geração de resíduos [101].

Assim, uma das abordagens deste trabalho foi direcionada ao desenvolvimento de métodos utilizando ácidos diluídos para o preparo da amostra de fosfato de rocha, sendo os resultados comparados aos métodos oficiais reconhecidos pelo MAPA para favorecer o aperfeiçoamento das metodologias já existentes, e simplificar a rotina dos laboratórios de análises [99].

Em 200 mg da amostra do material candidato foram adicionados 6 mL de HNO_3 (7 mol L^{-1}) e 2 mL de H_2O_2 (30% v v⁻¹). A seguir, foi realizada a digestão assistida por radiação micro-ondas em forno com cavidade (Ethos 1, Milestone, Sorisole, Itália), com rotor de 10 frascos de TFM® (propileno-etileno fluorado) e o volume final do digerido foi aferido em 20 mL com água deionizada. O mesmo procedimento de preparo foi utilizado para a digestão dos materiais de referência certificado utilizados para avaliar a exatidão do método proposto. As digestões das amostras de fosfato de rocha foram realizadas na Embrapa Pecuária Sudeste e as determinações foram realizadas nos laboratórios do Grupo de Análise Instrumental Aplicada (GAIA) instalados na Embrapa Pecuária Sudeste e no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Para a digestão das amostras empregou-se o programa de aquecimento proposto por Kane & Hall [84] para amostras de fertilizantes, conforme apresentado Tabela 4.

TABELA 4 – Programa de aquecimento do forno de micro-ondas proposto por Kane & Hall [84].

Etapa	Potência (W)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
1	1100	200	20
2	1100	200	20
3	0	0	10

Na última etapa do programa de aquecimento é realizada uma etapa de resfriamento, para garantir que não haja perdas por volatilização quando for realizada a abertura dos frascos. A digestão não foi considerada completa, pois no fundo dos frascos de digestão foi possível verificar resíduos de material silicatado proveniente da amostra. Após a digestão foi realizada uma centrifugação durante 5 min com uma rotação de 3500 rpm para separar a massa restante do sobrenadante, evitando possibilidade de entupimento do nebulizador do sistema de introdução de amostra do ICP OES.

Com o intuito de avaliar o comportamento da digestão em situações onde não esteja disponível um sistema de digestão assistida por radiação micro-ondas, foi realizado um estudo utilizando um bloco digestor com tubos de PFA rosqueáveis (Tecnal modelo 40/25, Piracicaba, SP, Brasil) e materiais de referência certificados foram utilizados para avaliar a exatidão do procedimento. Foram pesadas 200 mg de amostra com a adição de 6 mL de HNO_3 (7 mol L^{-1}) e 2 mL de H_2O_2 (30% v v⁻¹), a 90 °C durante 2 horas.

Assim como na digestão utilizando a radiação micro-ondas, não foi possível realizar a digestão completa, pois restava um resíduo do material precipitado no fundo dos frascos. Provavelmente a massa restante seja derivada da matriz silicatada originária das rochas fosfatadas. Após as digestões, também foi realizada centrifugação durante 5 min com rotação de 3500 rpm. Os materiais de referência certificado “Western Phosphate Rock” (NIST 694, Gaithersburg, Estados Unidos) e “Trace Elements in Multi-Nutrient Fertilizer” (NIST 695, Gaithersburg, Estados Unidos) foram incluídos na determinação analítica para avaliação da exatidão do método.

4.2.2 Quantificação dos analitos por ICP OES

Os elementos Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, V e Zn foram determinados por ICP OES com visões radial e axial simultâneas (Thermo Scientific, modelo iCAP 6000 series – Dual view), cujos parâmetros instrumentais empregados estão descritos na Tabela 5:

TABELA 5 – Parâmetros instrumentais empregados nas determinações por ICP OES.

Parâmetros Instrumentais	ICP OES (axial e radial)
Potência da rádio frequência	1150 W
Vazão do gás de nebulização	0,70 L min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar	0,5 L min ⁻¹
Vazão do gás de resfriamento	12 L min ⁻¹
Nebulizador	Concêntrico
Câmara de nebulização	Ciclônica
Comprimento de onda (nm)	Al I 394,4**; As I 189,0*; Ca I 422,6**; Cd II 228,8**; Cr II 283,5**; Cu II 224,7**; Fe II 240,4**; K I 769,8**; MgII 280,2**; Mn II 257,6**; Na I 589,5**; Ni I 341,4*; P I 213,6** V II 292,4**; Zn I 213,8**.

*visão axial; ** visão radial, I = atômica, II = iônica

As amostras digeridas foram analisadas mediante diluições adequadas para cada analito, os quais foram avaliados em mais de um comprimento de onda e nas duas diferentes configurações (axial e radial), com o

objetivo de se obter o procedimento mais sensível, com menores desvios-padrão e com os melhores valores de recuperação em relação aos materiais de referência analisados. As soluções para as curvas de calibração foram construídas utilizando o mesmo meio de preparo das amostras, com pelo menos cinco concentrações diferentes, preparadas com diluições adequadas a partir de soluções estoque de 1000 mg L^{-1}

4.2.3 Determinação de fósforo por espectrometria de emissão com plasma induzido por laser

Os estudos voltados à homogeneidade e estabilidade do fósforo foram realizados por LIBS, técnica que vem sendo cada vez mais utilizada, sendo que a grande maioria das aplicações se dá em amostras no estado sólido o que é um fator positivo, necessitando baixa preparação das amostras. Para o procedimento proposto foi utilizado um espectrômetro LIBS 2500 (Ocean Optics, Dunedin, Estados Unidos) equipado com um Q-switched 1064 nm Nd:YAG fabricado pela Quantel (Big Sky Laser Ultra50). As pastilhas utilizadas foram de 2 mm de diâmetro; o diâmetro do laser na amostra no interior da câmara de ablação foi estimado em cerca de 100 μm ; a distância entre a amostra e feixe óptico foi de aproximadamente 7 mm. As análises foram realizadas na Embrapa Instrumentação, São Carlos SP, em colaboração com a Dra. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori e o Prof. Dr. Bruno Marangoni da Universidade Federal de São Carlos.

Os espectros variaram de 189 a 966 nm com resolução óptica de 0,1 nm e para cada pastilha, 100 espectros (50 para o lado de superfície) foram obtidos em diferentes posições da amostra, sendo cada espectro resultante de dois disparos de laser acumulados, precedido por uma limpeza.

O equipamento LIBS foi operado com um pulso de laser de 8 ns e 60 mJ com um tempo de integração de 2,1 ms para todas as medições. O tempo de atraso otimizado para emissão da linha P foi de 2,5 μs .

Para a calibração do equipamento foram utilizadas 26 amostras de fertilizantes (5 fosfatos de rocha, 3 fertilizantes minerais, 1 superfosfato, 1 superfosfato triplo, e 18 fertilizantes orgânicos minerais granulados) e foi realizada uma validação cruzada. Neste tipo de validação, uma amostra é retirada do conjunto e testada como modelo. Esse processo foi repetido para todas as 26 amostras. Os resultados foram comparados utilizando um ICP OES e em uma situação ideal, todos os pontos devem ser alinhados, indicando um total acordo entre os dados do ICP OES e do LIBS, e os deslocamentos do pontos foram proporcionais, resultando em um erro de 15% em média para cada amostra.

4.3 Estimativa da massa mínima da amostra candidata a material de referência

Para o estudo na massa mínima, selecionou-se aleatoriamente 1 frasco a partir do lote preparado. Foram avaliadas massas de 100, 150 e 200 mg, em triplicata para cada massa, as quais foram digeridas em forno de radiação micro-ondas, conforme descrito anteriormente. Após a digestão, foram determinados, por ICP OES, os analitos Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, V e Zn, empregando-se os parâmetros instrumentais apresentados na Tabela 5.

A precisão do método de medição foi avaliada através do desvio padrão relativa (RSD, do inglês relative standard deviation) e os resultados foram avaliados com o emprego de análise de variância ANOVA de fator único.

4.4 Estimativa da homogeneidade da amostra candidata a material de referência

Dentre as etapas de preparo de um MR, o teste de homogeneidade é considerado um dos mais críticos e cruciais de um processo de certificação,

então uma boa homogeneidade é pré-requisito para um MR, pois garante que as amostras poderão ser tomadas de embalagens diferentes [25].

Para o estudo de homogeneidade deve ser selecionado, aleatoriamente, um subconjunto entre 10 e 30 unidades do lote produzido. Para este estudo, 10 frascos do lote de 100 frascos foram selecionados aleatoriamente utilizando a ferramenta de números aleatórios do programa da Microsoft Office Excel®. As análises foram realizadas em triplicata, utilizando-se massa de 200 mg da amostra do material candidato com a adição de 6 mL de HNO₃ (7 mol L⁻¹) e 2 mL de H₂O₂ (30% v v⁻¹). Foi realizada a digestão assistida por radiação micro-ondas com cavidade (Ethos 1, Millestone, Itália), com rotor de 10 frascos de TFM® (propileno-etileno fluorado) e o volume final do digerido foi aferido em 20 mL com água deionizada. Os analitos foram determinados por ICP OES de acordo com as condições descritas no item 4.2.2 e na tabela 5. Para o tratamento estatístico, utilizou-se a análise de variância ANOVA para determinar a variabilidade dos resultados obtidos tanto entre os frascos como dentro do frasco.

4.5 Estimativa da estabilidade da amostra candidata a material de referência

A estabilidade dos materiais de referência é um requisito essencial e, dependendo do tipo de amostra, esta pode estar exposta à degradação devido a fatores como luz, oxidação, ação de micro-organismos ou perda de analitos ao longo do tempo. Assim, o produtor do material candidato deve informar as melhores condições de armazenamento e garantir a estabilidade do material durante o tempo de validade. Os testes de estabilidade só podem ser realizados após o conhecimento dos componentes de incerteza da amostra, ou seja, o grau de heterogeneidade [20].

4.5.1 Estabilidade a curto prazo

Para o estudo da estabilidade a curto prazo, três frascos do material de fosfato de rocha candidato a material de referência foram escolhidos aleatoriamente, utilizando-se a ferramenta de números aleatórios do programa do Microsoft Office Excel. Os frascos foram submetidos à temperatura de 38°C e 100% de umidade relativa, durante 30 dias, dentro de um sistema mantido em estufa com temperatura controlada, com verificações diárias de temperatura e umidade. Esse sistema é constituído de um frasco grande de vidro de boca larga com tampa, sendo colocada água no fundo e um suporte ajustado para amparar os frascos com as amostras. Os analitos avaliados foram quantificados, em triplicata, no tempo zero (antes do início do experimento) e após 30 dias, empregando os procedimentos de digestão e determinação descritos nos itens 4.2.1 e 4.2.2 [60].

4.5.2 Estabilidade a longo prazo

Para o estudo da estabilidade a longo prazo, três frascos do material de fosfato de rocha candidato a material de referência foram escolhidos aleatoriamente, utilizando-se a ferramenta de números aleatórios do programa do Microsoft Office Excel. Esses frascos foram armazenados a temperatura ambiente e, mensalmente, durante um período de 9 meses, foi realizada a quantificação em triplicata dos analitos de interesse nos frascos sorteados conforme descrito nos itens 4.2.1 e 4.2.2 [25].

4.6 Ensaio Colaborativo

O estabelecimento dos valores de propriedade foi feito através de ensaio colaborativo e laboratórios com boas práticas foram convidados a

participar do ensaio e 17 laboratórios (apresentados na Tabela 6), se disponibilizaram a colaborar. Todos os laboratórios receberam os frascos contendo o material de fosfato de rocha candidato a material de referência durante o 4º e o 5º Workshop “Ensaio de Proficiência para Laboratórios de Nutrição Animal – EPLNA, realizados na Embrapa Pecuária Sudeste em São Carlos, SP.

Juntamente com a amostra, os laboratórios receberam a documentação pertinente, que continha informações a respeito do preparo e outras características do material e fichas para preenchimento do cadastro do laboratório, inserção dos métodos utilizados, incluindo preparo, determinação e resultados obtidos. Aos laboratórios foi sugerida a determinação de quantos analitos tivesse interesse e possibilidade de acordo com os métodos utilizados na rotina de seus próprios laboratórios, com seis repetições para cada elemento, sendo solicitado o envio de todos os valores obtidos.

As técnicas analíticas utilizadas para a determinação dos analitos de interesse dos laboratórios que participaram efetivamente do ensaio colaborativo que enviaram os resultados foram: FAAS, FAES, ICP OES, GF AAS, UV-VIS, MIP-AES, HG-AAS, INAA, LIBS e análise gravimétrica. Para o preparo da amostra, os laboratórios utilizaram digestão assistida por radiação micro-ondas com cavidade e/ou chapa de aquecimento (sistema aberto) e ainda por ultra-som, exceto para os laboratórios que determinaram análise por ativação neutrônica instrumental, considerada técnica primária e que serviu de base para comparação com os teores totais. A Tabela 6 apresenta os laboratórios participantes no ensaio colaborativo.

TABELA 6 – Laboratórios participantes do Ensaio Colaborativo.

CBO Análises Laboratoriais

Laboratório de Análise de Fertilizantes e Corretivos - IMA

Connan – Cia. Nacional de Nutrição Animal

Laboratório João Carlos Pedreira de Freitas - Cooperativa Regional de
Cafeicultores em Guaxupé Ltda.

Laboratório de Fertilizantes e Resíduos – Instituto Agrônômico (IAC)

Lab. Fert. Análises

Laboratório Oficial de Fertilizantes e Corretivos- LOFC-VGA-MG
(LANAGRO-MG)

Unidade de análises físico-químicas de fertilizantes, corretivos, substratos e
afins (Lanagro - SP)

Instituto de Química - Universidade de São Paulo - USP

Ribersolo Laboratório de Análise de Solo e Foliar Ltda

TECPAR – Instituto de Tecnologia do Paraná

Universidade Federal de São Carlos - Araras

Laboratório de Fertilizantes e Corretivos - UNISC

Yara Brasil Fertilizantes S.A.

Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) – USP

Embrapa Pecuária Sudeste

Embrapa Instrumentação

Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram estimados com base nos desvios padrão das soluções dos brancos e nos valores do BEC (background equivalent concentration) de cada um dos elementos de interesse. Sendo assim, para estimá-los, as soluções dos brancos foram analisadas 10 vezes no ICP OES. As equações envolvidas foram deduzidas conforme sugerido por Thomsen e colaboradores [104]:

$$LD = 3 \times RSD_{branco} \times BEC / 100 \quad (4)$$

$$LQ = 10 \times RSD_{branco} \times BEC / 100 \quad (5)$$

Onde: LD = limite de detecção e LQ = limite de quantificação, RSD = desvio padrão relativo para a leitura do branco (n=10); BEC = concentração equivalente ao sinal de fundo.

$$BEC = C_{padrão} / SBR \quad (6)$$

$$SBR = (I_{padrão} / I_{branco}) / I_{branco} \quad (7)$$

Onde: $C_{padrão}$ = concentração de um padrão da curva de calibração, $I_{padrão}$ = intensidade do sinal de emissão do padrão da curva de calibração e I_{branco} = intensidade do sinal do branco.

As figuras de mérito, envolvendo os limites de detecção e quantificação calculados com base nas equações (4) a (7), bem como a

linearidade das curvas analíticas estão apresentados na Tabela 7 com correlações lineares próximas a 0,999 para todos os elementos estudados.

Tabela 7 – Limites de detecção (LD), limites de quantificação (LQ), faixa linear, comprimento de onda e orientação da tocha na determinação por ICP OES de Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, V e Zn, em fosfato de rocha candidato a MR.

Elemento	Faixa linear (mg kg⁻¹)	LD (mg kg⁻¹)	LQ (mg kg⁻¹)	Comprimento de onda (nm)	Orientação da tocha
Al	0,01 - 50	0,023	0,075	394,4	Radial
As	0,01 -2,5	0,0021	0,069	189,0	Axial
Ca	0,01-50	0,0011	0,0037	422,6	Radial
Cd	0,01-5	0,00032	0,011	228,8	Radial
Cr	0,01-50	0,0016	0,0054	283,5	Radial
Cu	0,01-10	0,042	0,138	224,7	Radial
Fe	0,01-50	0,0013	0,0042	240,4	Radial
K	10 - 150	0,039	0,129	769,8	Radial
Mg	0,01 - 25	0,002	0,005	280,2	Radial
Mn	0,01 -10	0,00025	0,00084	257,6	radial
Na	10-150	0,32	1,08	589,5	radial
Ni	0,01-2,5	0,0013	0,0045	341,4	axial
P	5-20 (%)	0,5 (%)	1,67 (%)	213,6	-
V	0,01 - 10	0,0011	0,0038	292,4	radial
Zn	0,01-10	0,0018	0,0060	213,8	radial

5.2 Preparo de amostra utilizando digestão assistida por radiação micro-ondas e bloco digestor e posterior determinação por ICP OES.

Uma das propostas deste trabalho foi direcionada ao desenvolvimento de métodos utilizando ácidos diluídos para o preparo da amostra de fosfato de rocha, com o objetivo de aperfeiçoar as metodologias já existentes e simplificar a rotina dos laboratórios de análises. Foram utilizadas duas abordagens para as digestões, como a digestão assistida por radiação micro-ondas e em bloco digestor para avaliar a determinação total dos analitos

estudados no fosfato de rocha candidato a material de referência. A exatidão da metodologia proposta foi avaliada utilizando dois materiais de referência certificado, (NIST 694, Gaithersburg, Estados Unidos) e “Trace Elements in Multi-Nutrient Fertilizer” (NIST 695, Gaithersburg, Estados Unidos). Nas Tabelas 8 e 9 são apresentados os valores certificados, determinados e os percentuais de recuperação dos analitos estudados utilizando a digestão assistida por radiação micro-ondas e nas Tabelas 10 e 11 são apresentados os valores certificados, determinados e os percentuais de recuperação dos analitos estudados utilizando o bloco digestor.

TABELA 8 – Média das concentrações, obtidas por ICP OES, para o material de referência certificado de Phosphate Rock (NIST 694) (n=3) utilizando a digestão assistida por radiação micro-ondas.

Elemento	Determinado (%)	RSD (%)	Certificado (%)	Recuperação (%)
Al ₂ O ₃	1,60 ± 0,02	1,20	1,8 ± 0,1	89
CaO	43,4 ± 1,3	3,05	43,6 ± 0,4	99
CdO	0,014 ± 0,001	0,98	0,015 ± 0,003	93
Cr ₂ O ₃	0,091 ± 0,0007	0,77	0,10*	91
Fe ₂ O ₃	0,68 ± 0,004	0,56	0,79 ± 0,06	86
K ₂ O	0,45 ± 0,05	0,011	0,51 ± 0,02	88
MgO	0,29 ± 0,001	0,41	0,33 ± 0,02	88
Na ₂ O	0,85 ± 0,02	2,66	0,86 ± 0,04	99
P ₂ O ₅	31,1 ± 1,7	5,62	30,2 ± 0,1	103
V ₂ O ₅	0,27 ± 0,0001	0,06	0,31 ± 0,07	87
ZnO	0,154 ± 0,008	0,88	0,19*	81

*valor informativo

TABELA 9 – Média das concentrações, obtidas por ICP OES, para o material de referência certificado Trace Elements in Multi-Nutrient Fertilizer (NIST 695) (n=3) utilizando a digestão assistida por radiação micro-ondas.

Elemento	Determinado	RSD (%)	Certificado	Recuperação (%)
Al (%)	0,58 ± 0,003	0,54	0,61 ± 0,03	95
As (mg kg ⁻¹)	161,89 ± 0,74	0,45	200 ± 5	81
Ca (%)	2,10 ± 0,07	3,32	2,26 ± 0,04	93
Cd (mg kg ⁻¹)	15,44 ± 0,25	1,64	16,9 ± 0,2	90
Cu (mg kg ⁻¹)	1120,71 ± 66,87	6,0	1225 ± 9	91
Fe (%)	4,57 ± 0,008	0,39	3,99 ± 0,08	114
K (%)	13,56 ± 0,008	1,36	11,65 ± 0,13	116
Mg (%)	1,88 ± 0,04	1,93	1,79 ± 0,05	105
Mn (%)	0,322 ± 0,003	1,08	0,305 ± 0,005	106
Na (%)	0,47 ± 0,009	1,99	0,405 ± 0,007	115
Ni (mg kg ⁻¹)	108,46 ± 3,24	2,99	135 ± 2	80
P (%)	6,80 ± 0,44	6,48	7,2 ± 0,1	94%
V (mg kg ⁻¹)	143,44 ± 1,26	0,88	122 ± 3	118
Zn (%)	0,311 ± 0,0080	2,63	0,325 ± 0,005	96

Ao aplicar o teste t não pareado, observou-se que não há diferença estatística entre os valores certificado e determinado para Ca, Cd, Cu, Mg, Mn, Na, P e Zn, ao nível de 95 % de confiança, enquanto que para Al, As, Cr, Fe, Ke V foram observadas diferenças estatísticas. Essa diferença pode ser explicada pelas baixas concentrações dos elementos As Cr e V presentes no material de referência. Em relação aos elementos Al, Fe e K podem ser explicadas devido aos baixos desvios padrão-relativo entre as medidas, devendo ser salientado os adequados percentuais de recuperações obtidos (entre 80 e 120%).

TABELA 10 – Média das concentrações obtidas por ICP OES, para o material de referência certificado de Phosphate Rock (NIST 694) (n=3) utilizando o bloco digestor.

Elemento	Determinado (%)	RSD (%)	Certificado (%)	Recuperação (%)
Al ₂ O ₃	1,49 ± 0,06	3,96	1,8 ± 0,1	83
CaO	43,1 ± 1,7	3,97	43,6 ± 0,4	99
CdO	0,013 ± 0,0003	2,21	0,015 ± 0,0003	87
Cr ₂ O ₃	0,08 ± 0,002	2,02	0,10*	80
Fe ₂ O ₃	0,70 ± 0,0004	3,71	0,79 ± 0,06	89
K ₂ O	0,51 ± 0,02	3,80	0,51 ± 0,02	100
Na ₂ O	1,02 ± 0,02	2,44	0,86 ± 0,04	119
V ₂ O ₅	0,26 ± 0,008	3,05	0,31 ± 0,07	83
ZnO	0,16 ± 0,006	3,70	0,19*	84

*valor informativo

TABELA 11 – Média das concentrações, obtidas por ICP OES, para o material de referência certificado de Trace Elements in Multi-Nutrient Fertilizer (NIST 695) (n=3) utilizando o bloco digestor.

Elemento	Determinado	RSD (%)	Certificado	Recuperação (%)
As (mg kg ⁻¹)	181,17 ± 0,41	0,22	200 ± 5	91
Ca (%)	2,29 ± 0,02	0,96	2,26 ± 0,04	97
Cd (mg kg ⁻¹)	17,87 ± 0,06	0,33	16,9 ± 0,2	106
Cu (mg kg ⁻¹)	1188,17 ± 24,30	2,04	1225 ± 9	97
Fe (%)	3,50 ± 0,008	2,40	3,99 ± 0,08	88
K (%)	9,53 ± 0,08	1,89	11,65 ± 0,13	82
Mg (%)	1,68 ± 0,03	2,10	1,79 ± 0,05	94
Mn (%)	0,293 ± 0,008	2,77	0,305 ± 0,005	96
V (mg kg ⁻¹)	130,87 ± 0,68	0,52	122 ± 3	107
Zn (%)	0,270 ± 0,008	3,12	0,325 ± 0,005	83

Ao aplicar o teste t não pareado, observou-se que não há diferença estatística entre os valores certificado e determinado somente para Ca, Cu e K ao nível de 95 % de confiança, enquanto que para Al, As, Cd, Cr, Fe, K, Mg, Na, V e Zn foram observadas diferenças estatísticas. Essa diferença pode ser explicada pelas baixas concentrações presentes no material de referencia para os analitos As, Cd, Cr, V e Zn. Em relação aos analitos Al, Fe, K, Mg e Na as diferenças podem ser explicadas devido aos baixos desvios padrão-relativo entre as medidas, devendo ser salientado os adequados percentuais de recuperações obtidos (entre 80 e 120%).

5.3 Determinação de fósforo por espectrometria de emissão com plasma induzido por laser

Para validação do método, foram utilizados dois materiais de referência certificado: “Phosphate Rock” (NIST 694, Gaithersburg, Estados Unidos) e “Trace Elements in Multi-Nutrient Fertilizer” (NIST 695, Gaithersburg, Estados Unidos) e as recuperações ficaram 102 e 104%, respectivamente, sendo que os resultados estão apresentados na Tabela 12. A amostra candidata a material de referencia foi analisada após a validação do método e os resultados comparados com os obtidos no ensaio colaborativo, os quais são apresentados na Tabela 20.

TABELA 12. Média das concentrações, obtidas por LIBS, para os materiais de referência certificado 694 e 695 (n=3).

MRC	Certificado	Determinado	Recuperação (%)
NIST 694 (P ₂ O ₅)	30,2 ± 0,1	31,5 ± 0,7	104
NIST 695 (P)	7,2 ± 0,1	7,3 ± 0,6	102

Ao aplicar o teste t não pareado, observou-se que não há diferença estatística entre os valores certificado e determinado, ao nível de 95 % de confiança.

5.4 Determinação da umidade residual

Na Tabela 13, estão apresentados os valores da umidade residual em porcentagem para cada frasco.

TABELA 13 – Umidade residual da amostra candidata a MR de fosfato de rocha determinado em estufa a 105°C por 24 h.

Frasco	Umidade (%)	Número de determinações
1	0,60 ± 0,07	6
2	0,55 ± 0,02	6
Média Final	0,58 ± 0,15	12

Primeiramente foi realizado um teste de umidade em triplicata durante aproximadamente três dias para verificar se haviam possíveis diferenças no valor de umidade residual. Através da Tabela 13 pode-se observar que os resultados de umidade residual permaneceram constantes, sem perdas significativas, conforme era o previsto devido à estabilidade do material. Assim, ficou definido que os usuários não necessitam determinar a umidade residual em estufa até massa constante.

5.5 Estudo da massa mínima da amostra candidata a material de referência

Na Tabela 14 são apresentados os resultados da média das concentrações obtidos por ICP OES a partir de diferentes massas de amostra (100 mg, 150 mg e 200 mg).

TABELA 14 – Frações de massa de Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, V e Zn obtidas nas porções amostradas após determinação por ICP OES. (n=7).

Elementos	100 mg (média ± desvio)	RSD (%)	150 mg (média ± desvio)	RSD (%)	200 mg (média ± desvio)	RSD (%)
Al	2.513,87 ± 55,65	2,21	2.567,98 ± 66,36	2,58	2.581,26 ± 48,37	1,87
As	13,07 ± 0,29	3,52	13,49 ± 0,27	2,01	13,49 ± 0,13	0,99
Ca	37,76 ± 5,51	14,60	36,47 ± 1,10	3,03	33,90 ± 2,59	7,64
Cd	17,33 ± 0,42	2,63	17,33 ± 0,34	1,98	16,81 ± 0,18	1,07
Cr	176,79 ± 3,78	2,14	178,88 ± 4,45	2,49	176,56 ± 2,56	1,45
Cu	30,23 ± 0,62	2,06	29,72 ± 0,54	1,83	29,05 ± 0,33	1,15
Fe	1.365,55 ± 33,86	2,48	1.385,56 ± 37,15	2,68	1.340,49 ± 19,61	1,46
K	937,74 ± 15,44	1,65	886,06 ± 15,86	1,79	867,10 ± 13,83	1,59
Mg	2.137,33 ± 48,66	2,28	2.095,69 ± 50,83	2,43	2.039,52 ± 19,95	0,98
Mn	8,43 ± 0,77	9,08	9,03 ± 0,75	8,27	9,25 ± 0,90	9,68
Na	4.586,21 ± 101,28	2,21	4.612,54 ± 106,14	2,30	4.617,49 ± 73,54	1,59
Ni	32,89 ± 0,76	2,32	33,81 ± 0,80	2,37	34,14 ± 0,49	1,42
V	163,65 ± 3,29	2,01	163,08 ± 3,36	2,06	160,40 ± 1,85	1,16
Zn	231,16 ± 4,94	2,14	233,95 ± 4,62	1,97	230,74 ± 2,51	1,09

Foi realizada a análise de variância ANOVA de fator único dentro de um intervalo de confiança de 95% ($\alpha=0,05$) para avaliar se existem diferenças entre as massas amostradas. Na tabela 15, são apresentados os dados estatísticos da análise de variância ANOVA, onde se comparou o valor de $F_{\text{crítico}}$ em relação ao valor de $F_{\text{calculado}}$ para cada elemento. Os elementos que apresentaram $F_{\text{crítico}} < F_{\text{calculado}}$ não apresentaram diferenças significativas entre as massas

estudadas, o que indica que a utilização de qualquer uma das porções estudadas no ensaio não irá contribuir significativamente nos valores da incerteza. Já os elementos que apresentaram diferenças significativas, ou seja, $F_{\text{crítico}} > F_{\text{calculado}}$, a massa mínima foi definida visando à homogeneização dos dados obtidos, através do menor desvio padrão relativo (RSD), e assim foi estabelecida a massa de 200 mg para os estudos posteriores.

Cabe ressaltar que, segundo a norma da ABNT ISO GUIA 33 [24], convém que o usuário esteja ciente de que a utilização de uma porção do ensaio que não atenda ou que exceda aquela especificada pode aumentar significativamente a contribuição da não homogeneidade do MR para a incerteza da propriedade especificada, até o ponto em que os parâmetros estatísticos da certificação não são válidos.

TABELA 15 - Dados da ANOVA fator único para a estimativa da massa mínima da amostra candidata a material de referência.

Elemento	Fonte de variância	SQ	gl	MQ	F _{calculado}	Valor-p	F ^a _{crítico}
Al	Entre Frascos	1783,49	2	8919,24	2,72	0,09	3,55
	Dentre Frascos	59043,80	18	3280,21			
	Total	76882,29	20				
As	Entre Frascos	1,29	2	0,64	6,47	0,008	3,55
	Dentre Frascos	1,79	18	0,10			
	Total	3,08	20				
Ca	Entre Frascos	53,58	2	26,79	2,10	0,15	3,55
	Dentre Frascos	229,96	18	12,77			
	Total	283,55	20				
Cd	Entre Frascos	1,48	2	0,74	6,21	0,009	3,55
	Dentre Frascos	2,14	18	0,12			
	Total	3,62	20				
Cr	Entre Frascos	22,94	2	11,47	0,85	0,44	3,55
	Dentre Frascos	243,46	18	13,52			
	Total	266,40	2				
Cu	Entre Frascos	4,88	2	2,44	9,21	0,002	3,55
	Dentre Frascos	4,77	18	0,26			
	Total	9,65	2				
Fe	Entre Frascos	7139,25	2	3569,63	3,68	0,04	3,55
	Dentre Frascos	17463,13	18	970,17			
	Total	24602,38	2				
K	Entre Frascos	18715,40	2	9357,70	41,21	0,00000002	3,55
	Dentre Frascos	4087,39	18	227,08			
	Total	22802,79	2				
Mg	Entre Frascos	33732,21	2	16866,11	9,46	0,0015	3,55
	Dentre Frascos	32097,69	18	1783,20			
	Total	65829,90	20				
Mn	Entre Frascos	2,49	2	1,24	1,92	0,17	3,55
	Dentre Frascos	11,68	18	0,65			
	Total	14,17	20				
Na	Entre Frascos	3956,21	2	1978,11	0,22	0,80	3,55
	Dentre Frascos	161587,80	18	8977,1			
	Total	165544,02	20				

Elemento	Fonte de variância	SQ	gl	MQ	F _{calculado}	Valor-p	F ^a _{crítico}
Ni	Entre Frascos	5,93	2	2,96	6,09	0,009	3,55
	Dentre Frascos	8,76	18	0,49			
	Total	14,68	20				
V	Entre Frascos	42,07	2	21,03	2,47	0,11	3,55
	Dentre Frascos	153,21	18	8,51			
	Total	195,28	20				
Zn	Entre Frascos	42,67	2	21,33	1,23	0,31	3,55
	Dentre Frascos	312,32	18	17,35			
	Total	355,00	20				

5.6 Estimativa da homogeneidade da amostra de fosfato de rocha candidata a material de referência

Nas Figuras 10 até 24 são apresentados os resultados da homogeneidade para cada analito avaliado, onde são contemplados as três réplicas, os limites inferiores e superiores em um intervalo de confiança de 95%. Os resultados mostram que os valores indicados estão próximos ao valor da média (representada na linha preta) para Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, V e Zn.

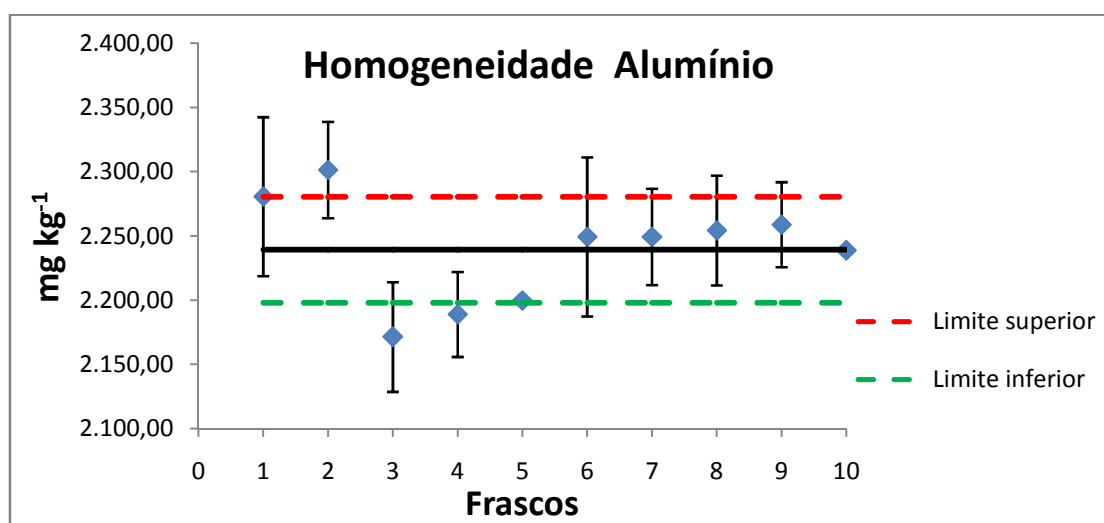


FIGURA 10 – Homogeneidade interamostral para alumínio.

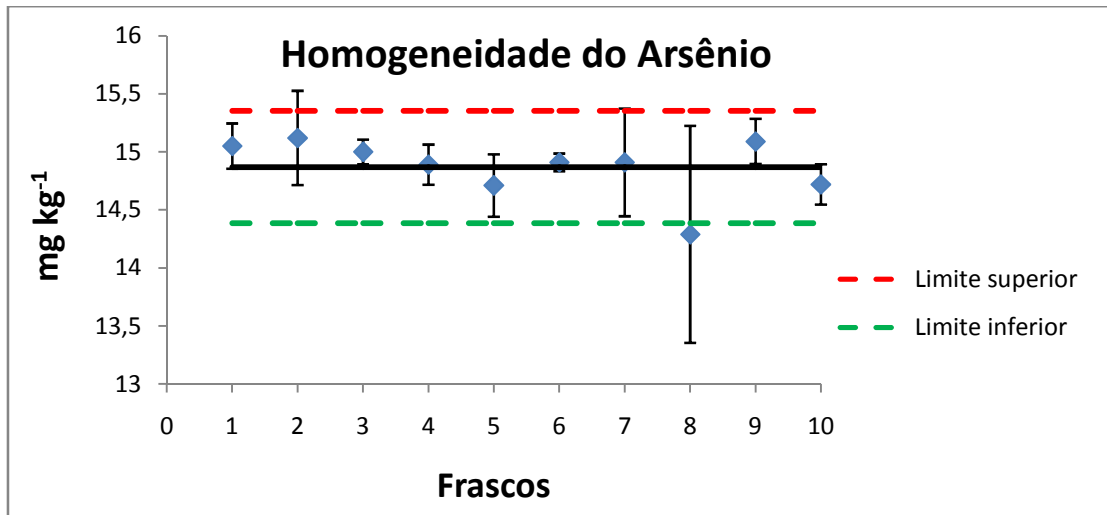


FIGURA 11 – Homogeneidade interamostral para arsênio.

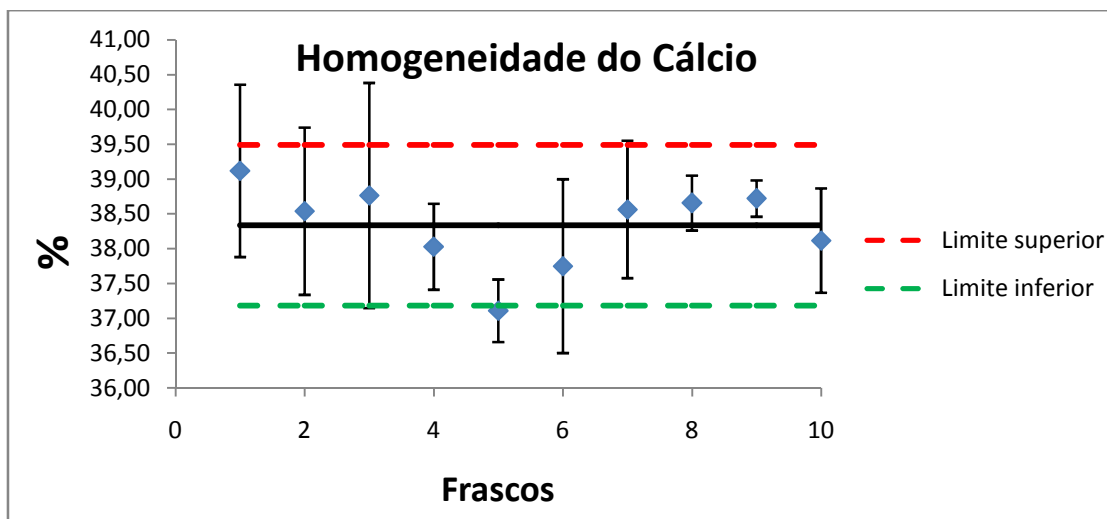


FIGURA 12 – Homogeneidade interamostral para Cálcio.

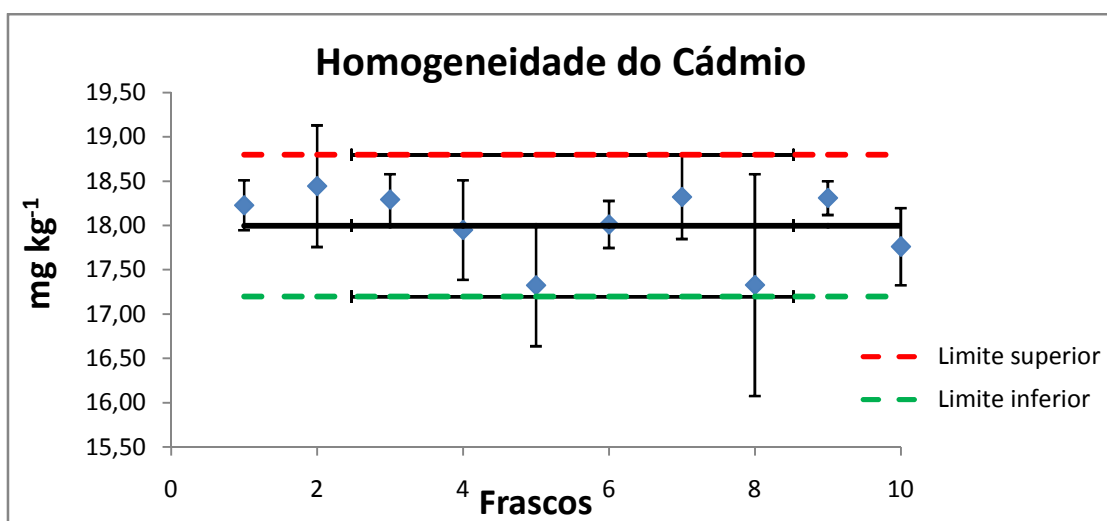


FIGURA 13 – Homogeneidade interamostral para cádmio.

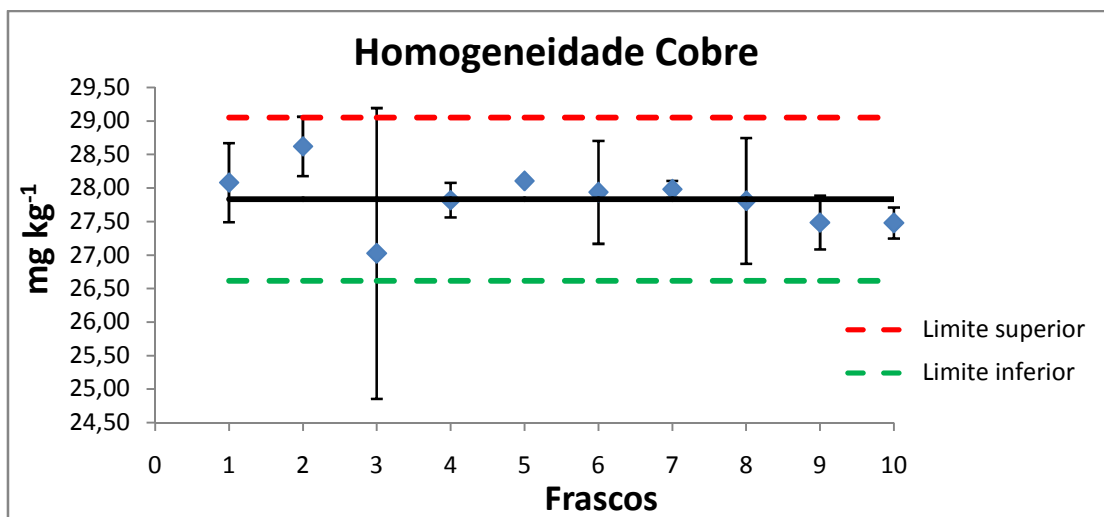


FIGURA 14 – Homogeneidade interamostral para cobre.

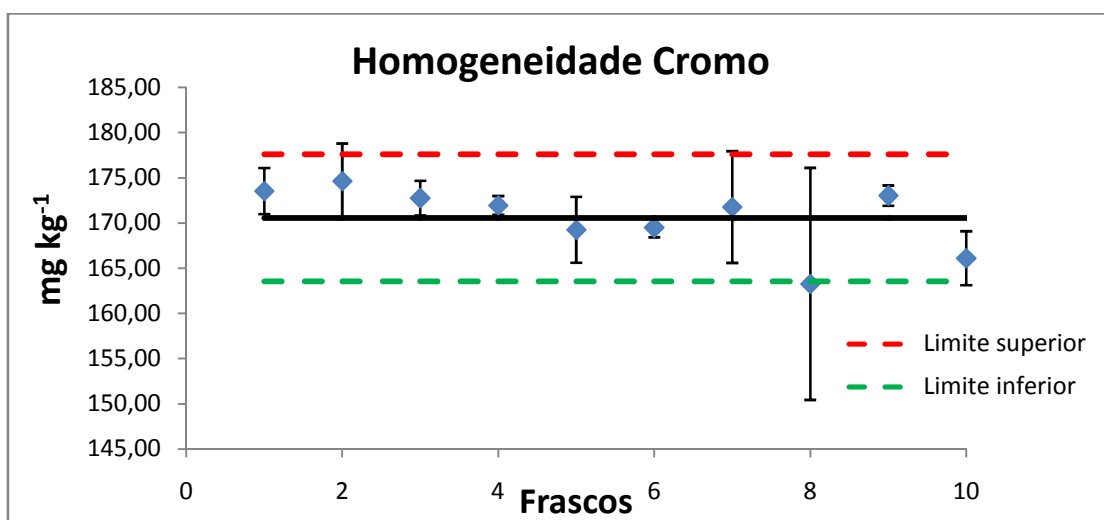


FIGURA 15 – Homogeneidade interamostral para cromo.

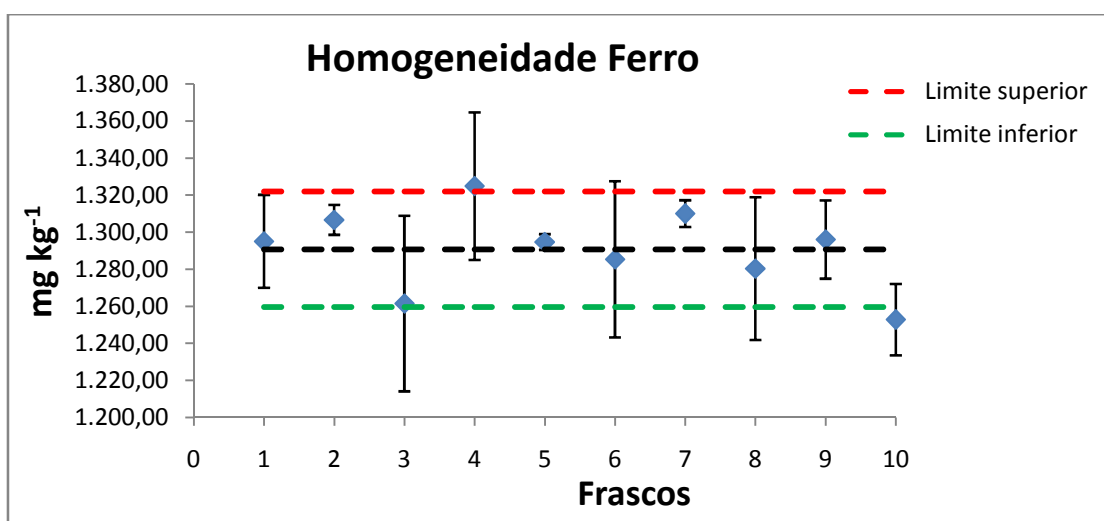


Figura 16 – Homogeneidade interamostral para Ferro.

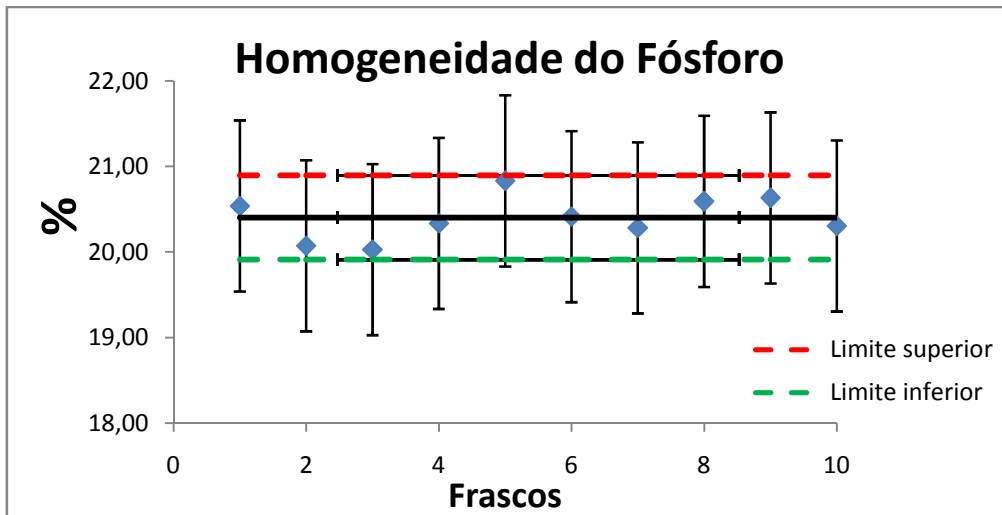


FIGURA 17 - Homogeneidade interamostral para fósforo.

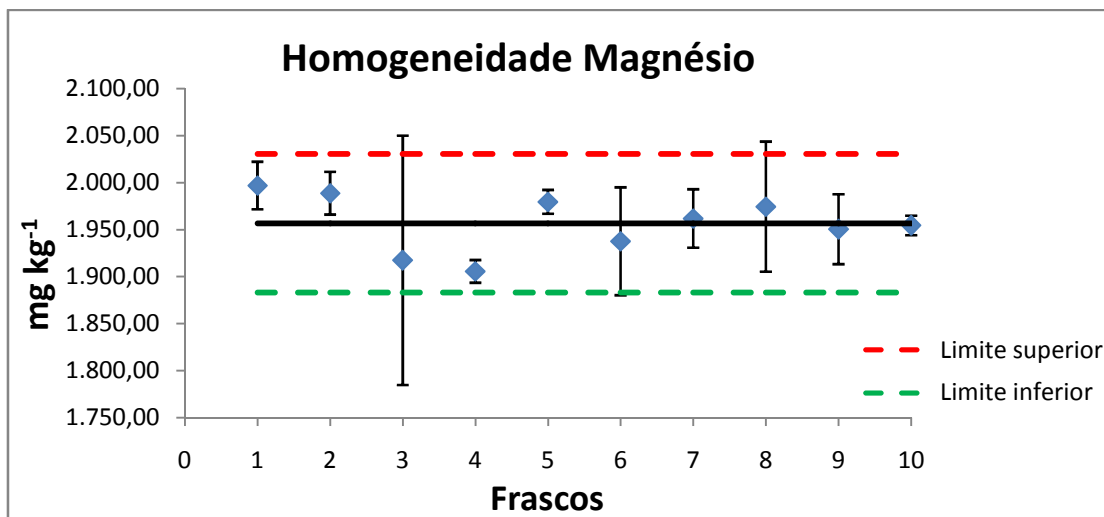


FIGURA 18 – Homogeneidade interamostral para magnésio.

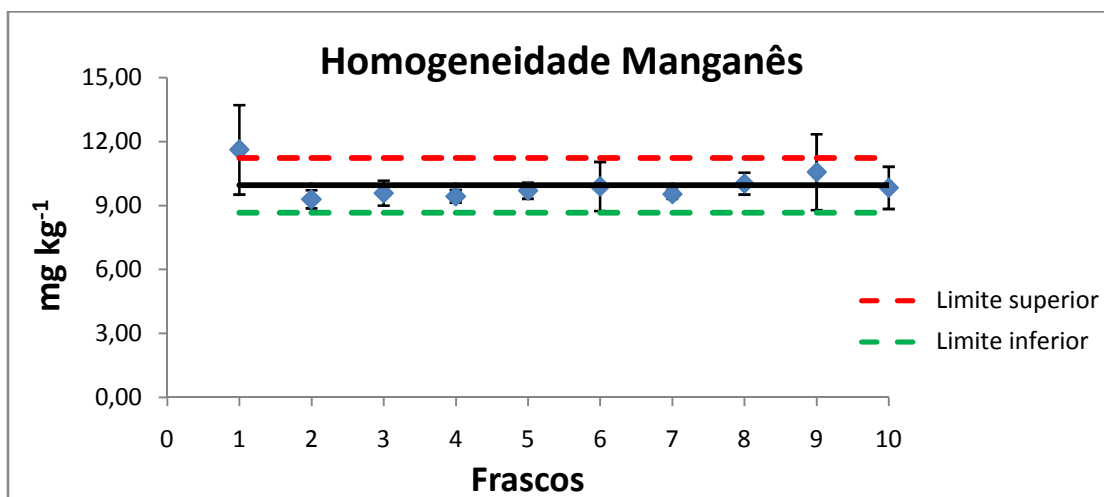


FIGURA 19 – Homogeneidade interamostral para manganês.

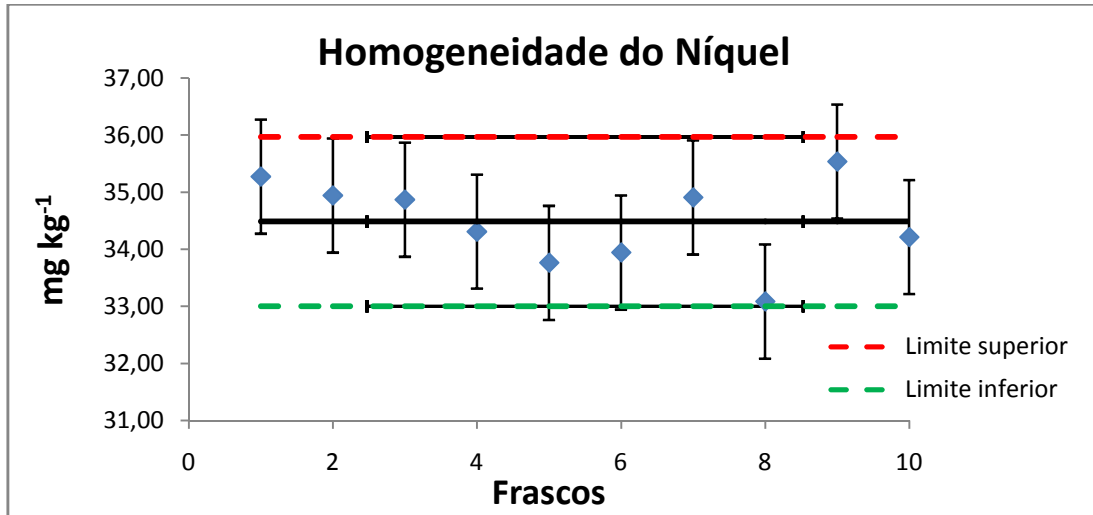


FIGURA 20 – Homogeneidade interamostral para níquel.

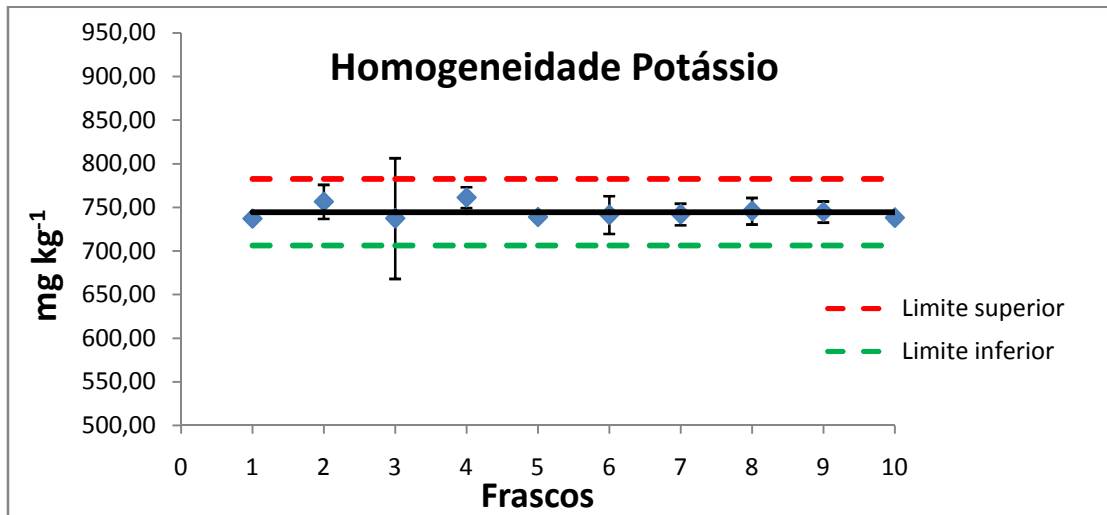


FIGURA 21 – Homogeneidade interamostral para potássio.

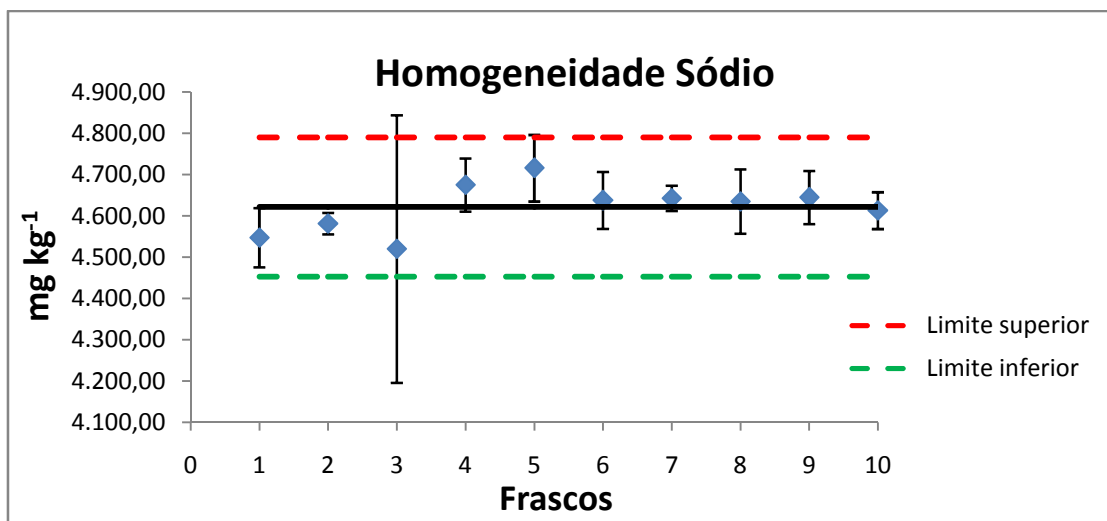


FIGURA 22 – Homogeneidade interamostral para sódio.

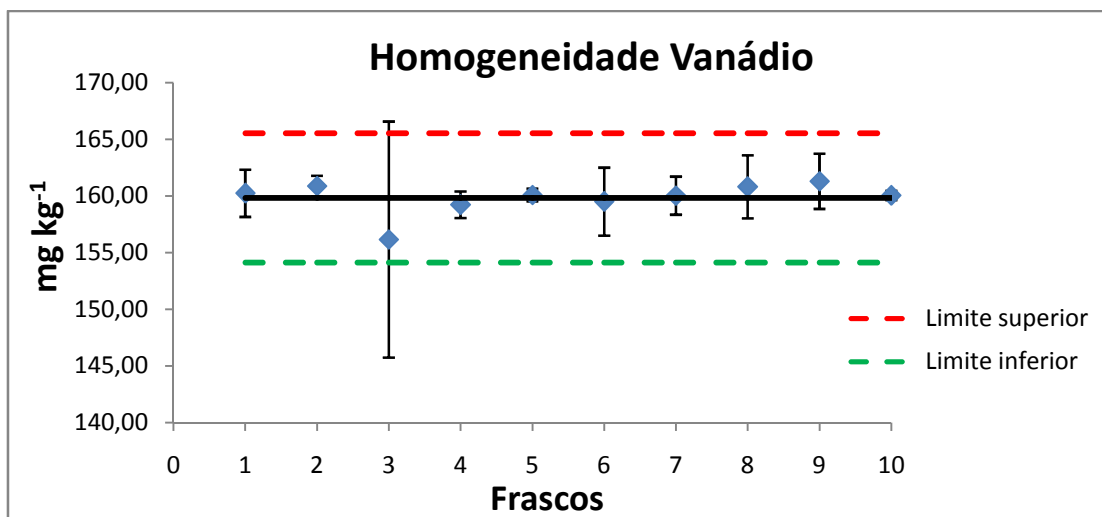


FIGURA 23 - Homogeneidade interamostral para vanádio.

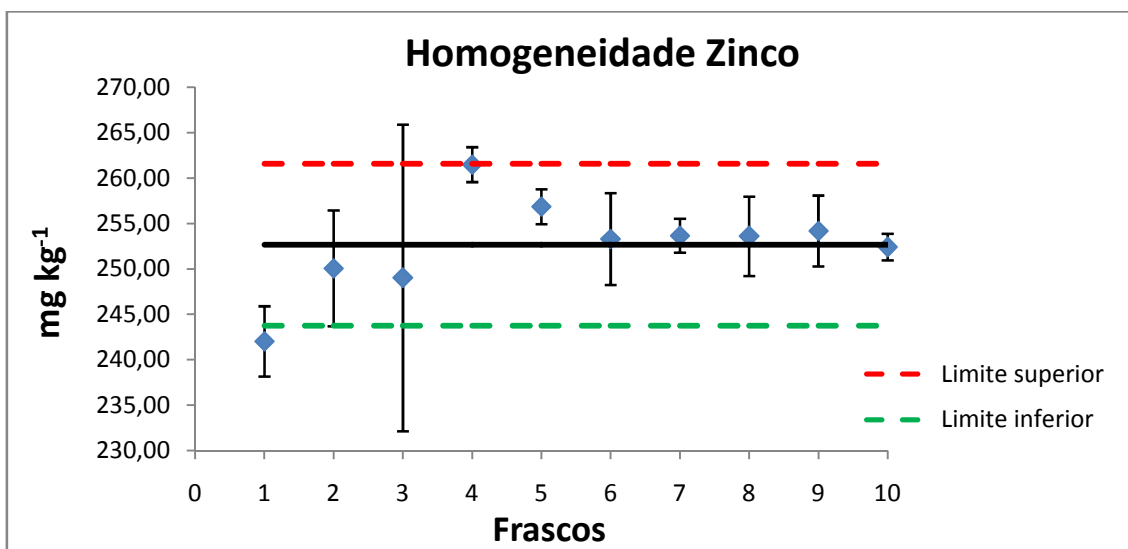


FIGURA 24 – Homogeneidade interamostral para zinco.

Ao avaliar os gráficos apresentados anteriormente, pode-se perceber que, com exceção do alumínio, que apresentou réplicas fora dos limites superiores e inferiores, todos os elementos aqui relacionados estão dentro dos intervalos dos limites superiores e inferiores de confiança, em nível de 95%. Os dados estão bem distribuídos ao redor da média de forma aleatória, o que mostra a homogeneidade da amostra e sugere que não existem tendências a erros sistemáticos.

Para avaliar a homogeneidade das amostras, foi realizada análise de variância com fator único (ANOVA *one-way*) no nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$) considerando-se valor crítico de $F_{9,20} (\alpha = 0,05) = 2,39$ e o $F_{\text{crítico}}$ foi comparado ao $F_{\text{analítico}}$. A hipótese nula H_0 é utilizada quando não há diferença significativa, em um intervalo de confiança de 95% entre os valores das determinações em cada um dos 10 frascos amostrados e a hipótese alternativa H_1 é utilizada quando há diferença significativa, também em um intervalo de confiança de 95% entre os valores das determinações em cada um dos 10 frascos amostrados.

Com isso, quando o $F_{\text{crítico}}$ for maior que o $F_{\text{analítico}}$, aceita-se a hipótese nula, e o material é então considerado homogêneo e quando o $F_{\text{crítico}}$ for menor que o $F_{\text{analítico}}$, rejeita-se a hipótese nula e o material não é considerado homogêneo, como podem ser observados através da Tabela 16.

TABELA 16 – Dados da ANOVA fator único para o estudo de homogeneidade entre os frascos da amostra de fosfato de rocha candidata a MR.

Elemento (mg kg ⁻¹)	Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F calculado	Valor-p	u_{bb} (mg kg ⁻¹)	F ^a crítico
Al	Entre Frascos	57825	9	6425	1,11	0,40	14,91	2,39
	Dentre Frascos	115165	20	5758				
	Total	172990	29					
As	Entre Frascos	1,65	9	0,18	1,25	0,32	0,11	2,39
	Dentre Frascos	2,92	20	0,15				
	Total	4,57	29					
Ca (%)	Entre Frascos	9,40	9	1,04	1,10	0,40	0,18	2,39
	Dentre Frascos	18,97	20	0,95				
	Total	28,37	29					

Elemento (mg kg ⁻¹)	Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F calculado	Valor-p	u _{bb} (mg kg ⁻¹)	F ^a crítico
Cd	Entre Frascos	4,51	9	0,50				
	Dentre Frascos	7,02	20	0,35	1,43	0,24	0,22	2,39
	Total	11,53	29					
Cu	Entre Frascos	5,07	9	0,56				
	Dentre Frascos	14,03	20	0,70	0,80	0,62	2,07	2,39
	Total	19,11	29					
Cr	Entre Frascos	346,80	9	38,53				
	Dentre Frascos	512,60	20	25,63	1,50	0,21	0,15	2,39
	Total	859,40	29					
Fe	Entre Frascos	12864	9	1429			13,68	
	Dentre Frascos	12685	20	634	1,65	0,17	4,48	2,39
	Total	14561	29					
Mg	Entre Frascos	24278	9	2698				
	Dentre Frascos	59261	20	2963	0,91	0,53	9,68	2,39
	Total	83539	29					
Mn	Entre Frascos	12,74	9	1,42				
	Dentre Frascos	21,93	20	1,10	1,29	0,30	0,33	2,39
	Total	34,67	29					
Na	Entre Frascos	91938	9	10215				
	Dentre Frascos	278515	20	13926	0,73	0,67	20,99	2,39
	Total	370453	29					

Elemento (mg kg ⁻¹)	Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F calculado	Valor-p	u _{bb} (mg kg ⁻¹)	F ^a crítico
Ni	Entre Frascos	15,45	9	1,72	1,11	0,39	0,24	2,39
	Dentre Frascos	30,73	20	1,54				
	Total	46,18	29					
P (%)	Entre Frascos	1,71	9	0,19	0,52	0,85	0,11	2,39
	Dentre Frascos	7,34	20	0,37				
	Total	9,05	29					
V	Entre Frascos	55,42	9	6,16	0,44	0,90	0,79	2,39
	Dentre Frascos	282,15	20	14,11				
	Total	337,57	29					
Zn	Entre Frascos	699	9	77,69	1,88	0,11	3,48	2,39
	Dentre Frascos	827	20	41,34				
	Total	1526	29					

SQ = Soma Quadrática; gl = graus de liberdade; MQ= Média Quadrática;
^aFcrítico para $\alpha=0,05$

Dessa forma, considera-se valor crítico de $F_{9,20} (\alpha=0,05) = 2,39$ para os analitos Al, As, Ca, Cd, Cu, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, V e Zn, os quais não apresentaram diferenças estatísticas significativas, podendo ser considerados homogêneos nos frascos do material candidato a MR de fosfato de rocha, o que indica que todos os frascos apresentaram valores médios dentro do intervalo de confiança de 95% e que o material tem a sua homogeneidade assegurada para todos os elementos estudados nesse trabalho.

5.7 Estudos de estabilidade do candidato a material de referência de fosfato de rocha

5.7.1 Estabilidade a curto prazo

Nas Figuras de 25 a39 são apresentados os resultados referentes às réplicas (n=3) de cada frasco em estudo, juntamente com o frasco controle para Al, As, Ca, Cd, Cu, Cr, Fe, K, Mg, Mn,Na, Ni, P, V e Zn. Os frascos nomeados como “0” foram analisados antes de serem submetidos às condições extremas de temperatura e umidade.

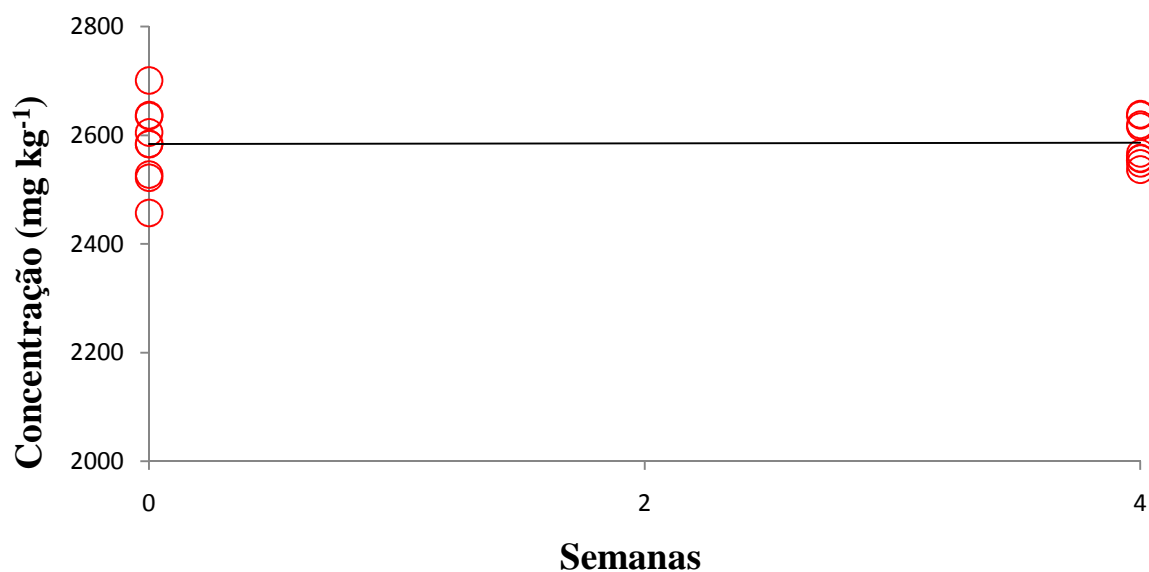


FIGURA 25–Estabilidade a curto prazo para alumínio.

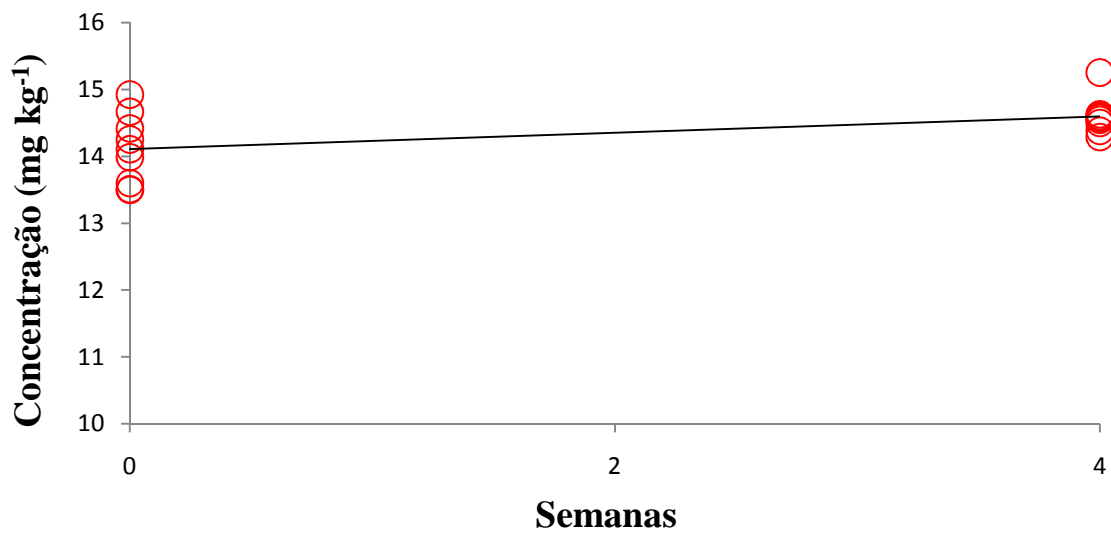


FIGURA 26 – Estabilidade a curto prazo para arsênio.

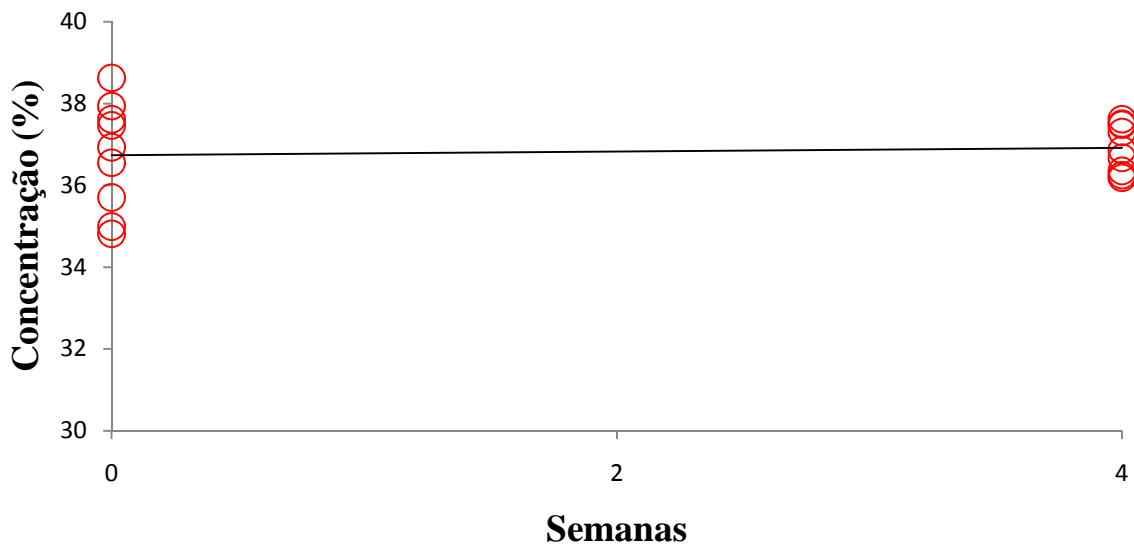


FIGURA 27 – Estabilidade a curto prazo para cálcio.

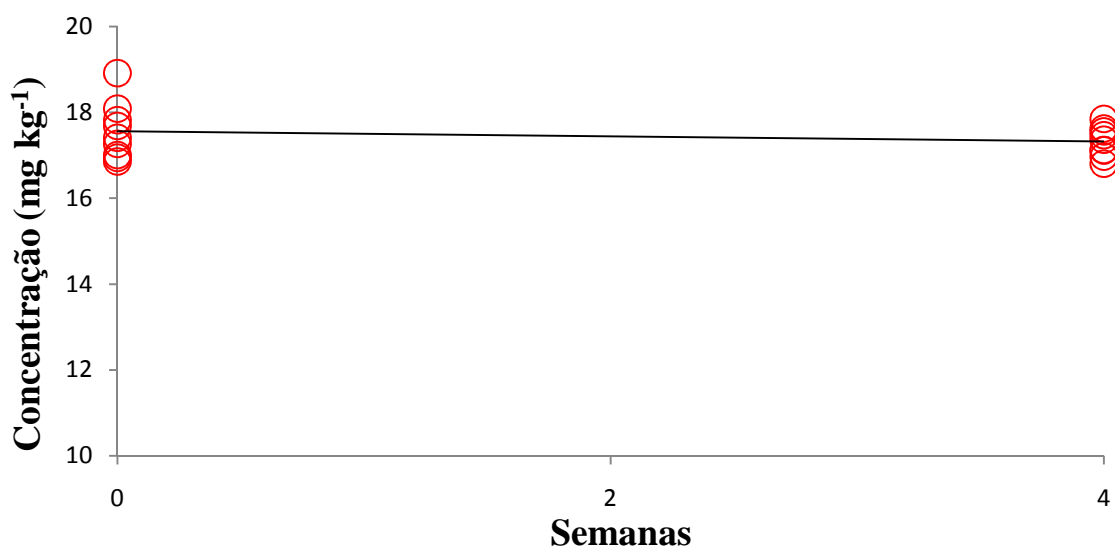


FIGURA 28 – Estabilidade a curto prazo para cádmio.

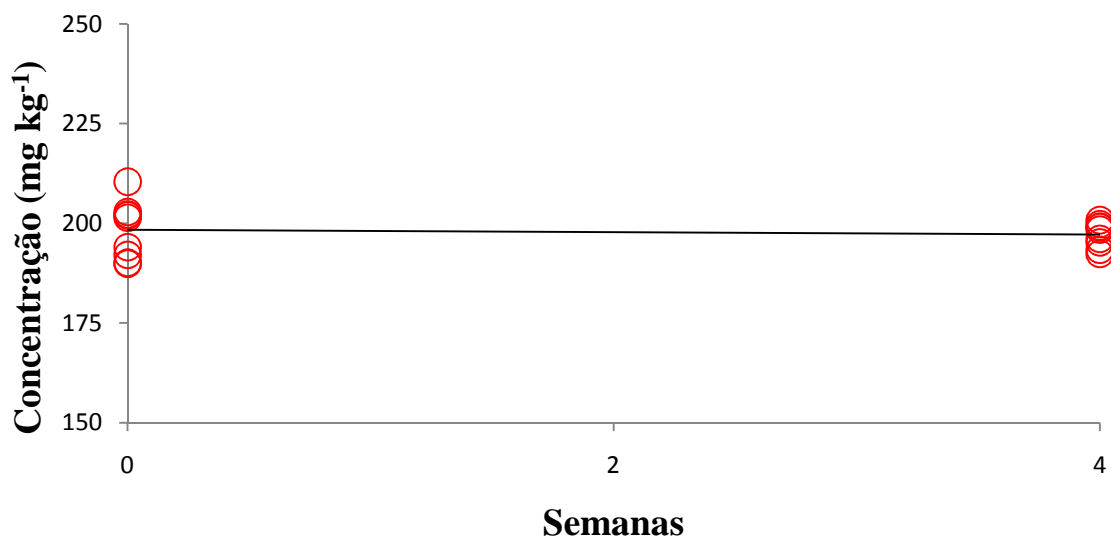


FIGURA 29 – Estabilidade a curto prazo para cromo.

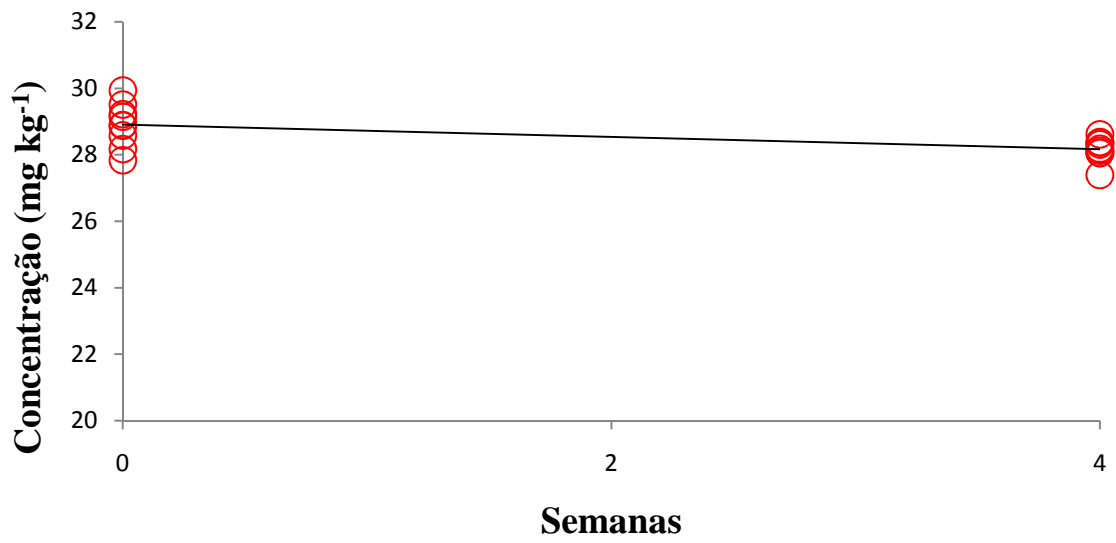


FIGURA 30 – Estabilidade a curto prazo para cobre.

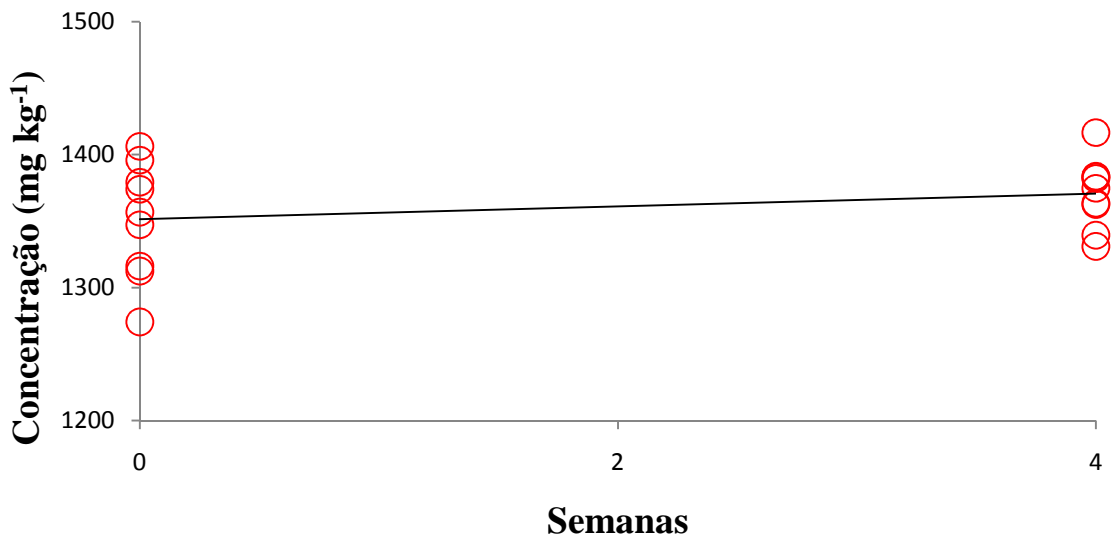


FIGURA 31 – Estabilidade a curto prazo para ferro.

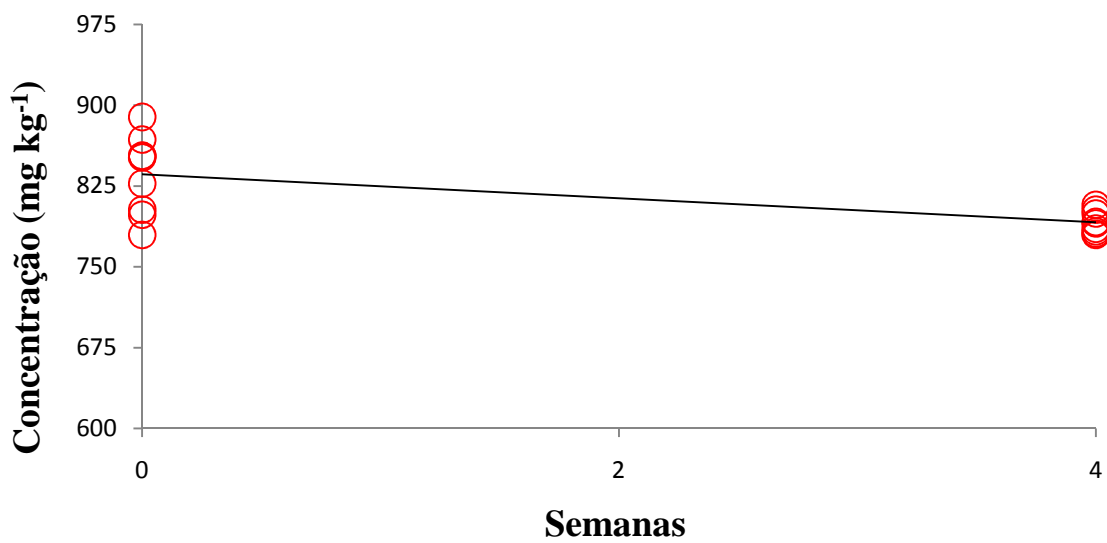


FIGURA 32 – Estabilidade a curto prazo para potássio.

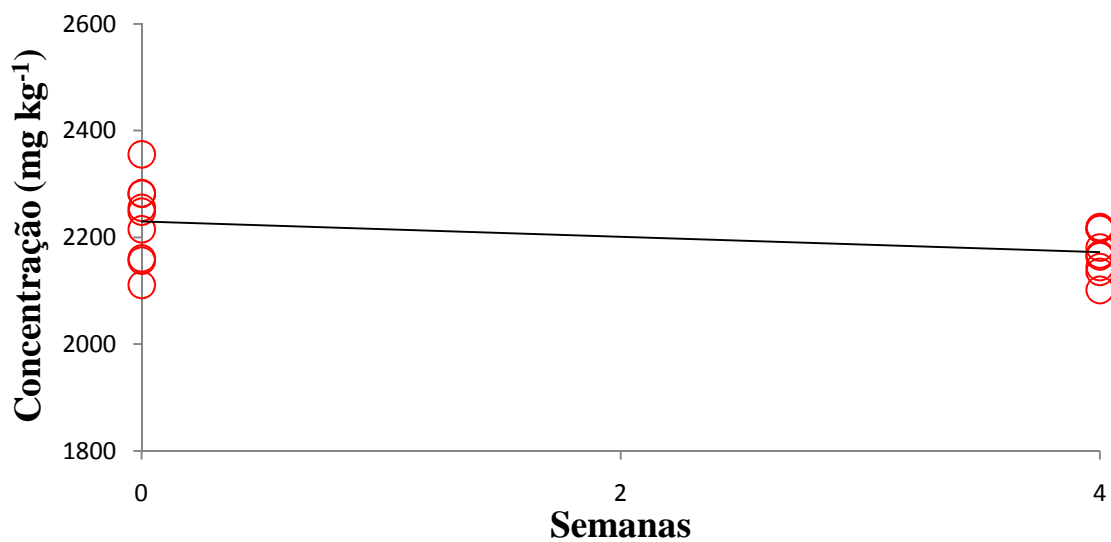


FIGURA 33 – Estabilidade a curto prazo para magnésio.

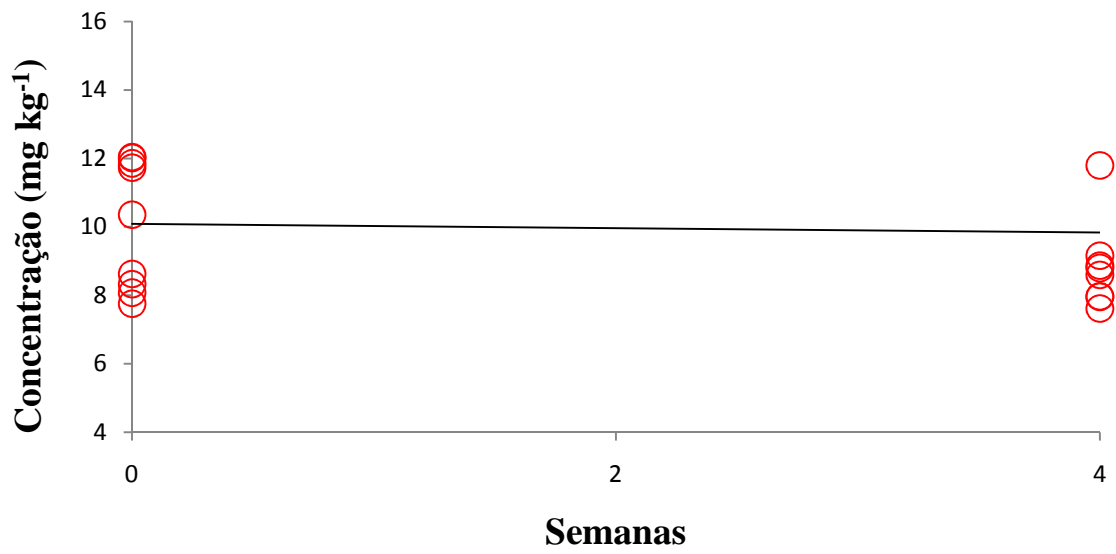


FIGURA 34 - Estabilidade a curto prazo para manganês.

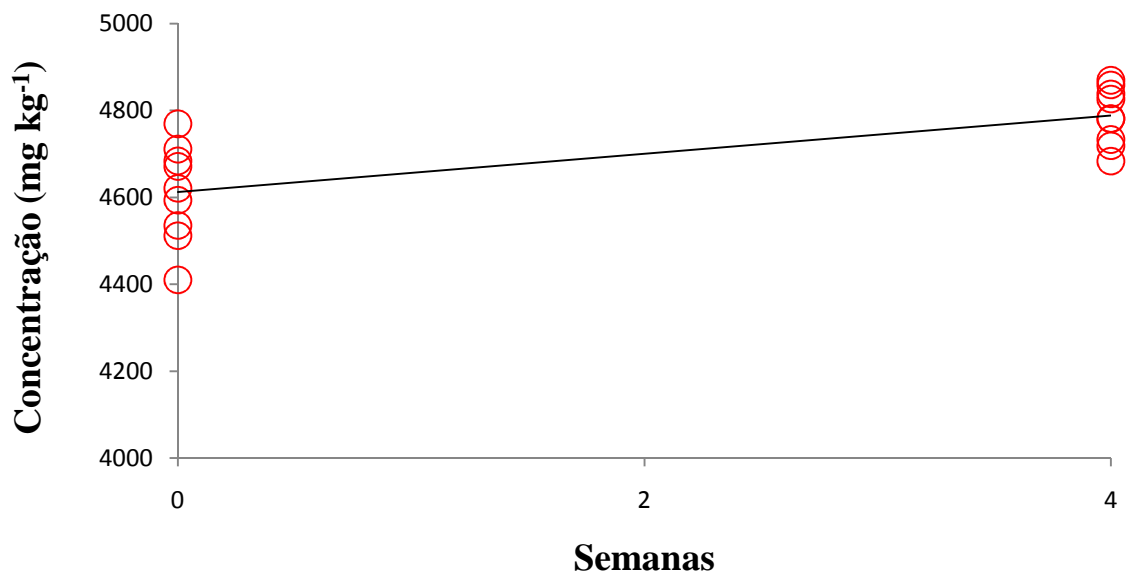


FIGURA 35 - Estabilidade a curto prazo para sódio.

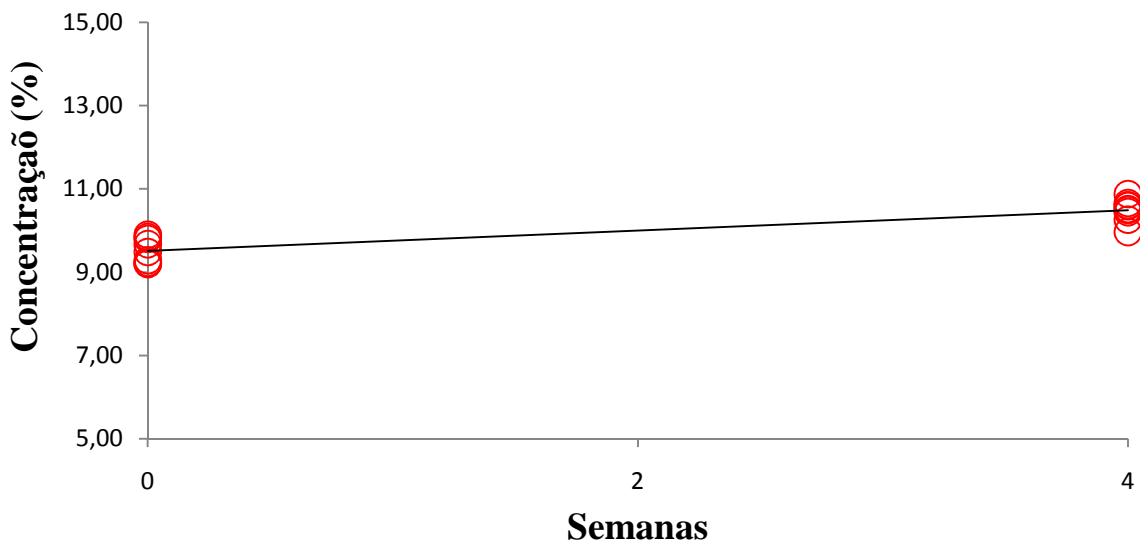


FIGURA 36 – Estabilidade a curto prazo para fósforo.

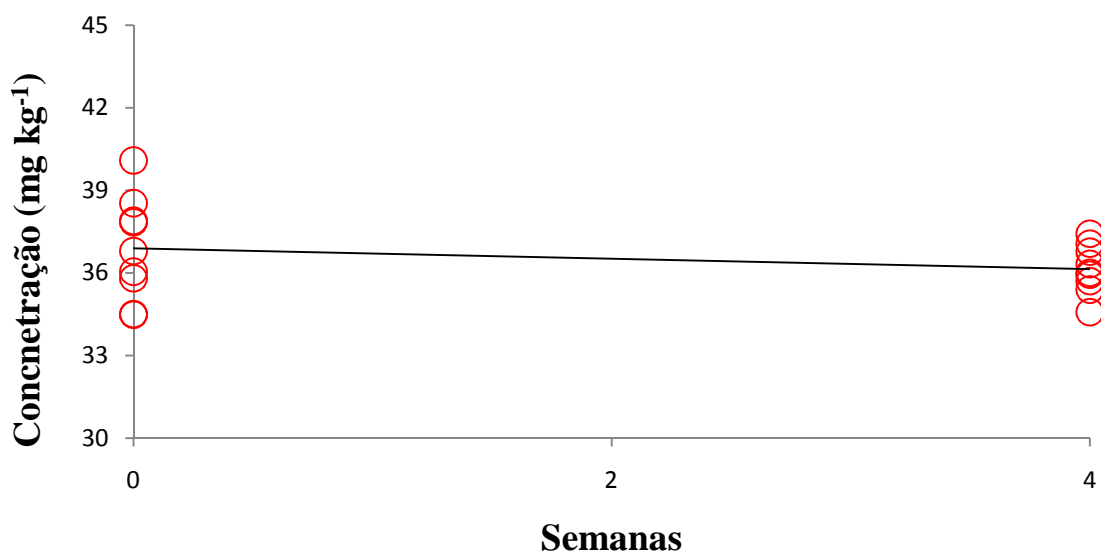


FIGURA 37 – Estabilidade a curto prazo para níquel

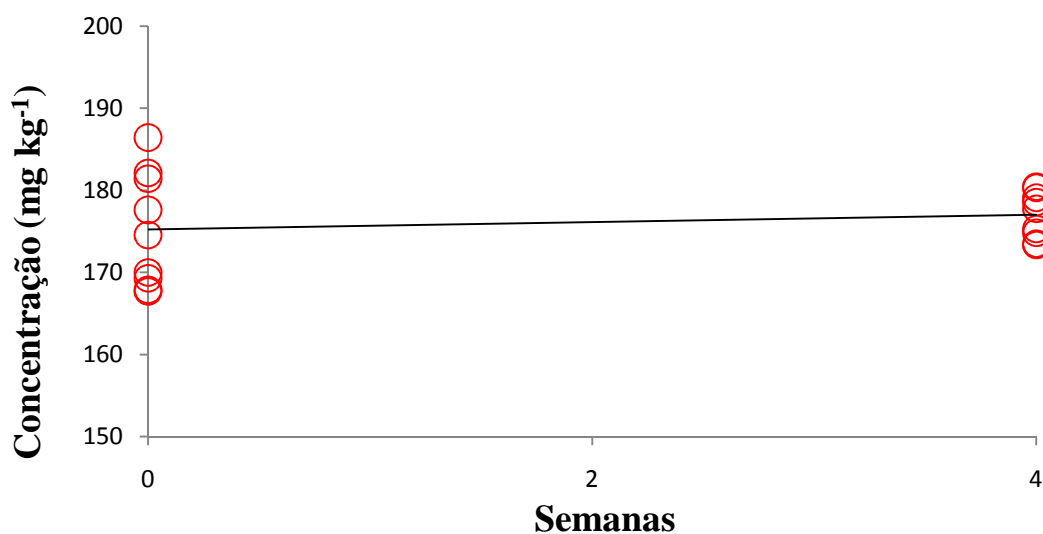


FIGURA 38 – Estabilidade a curto prazo para vanádio.

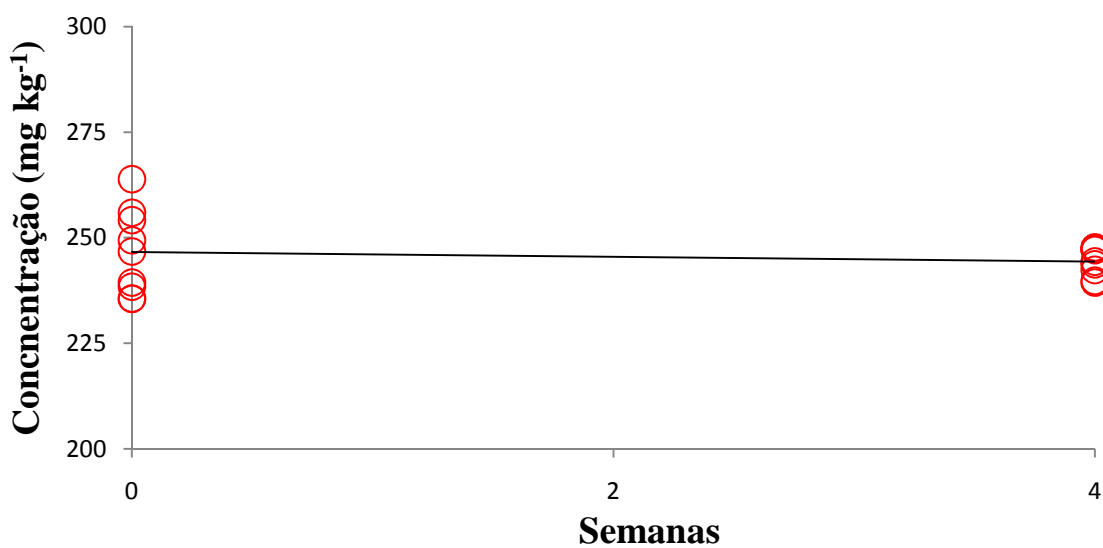


FIGURA 39 – Estabilidade a curto prazo para zinco.

É possível observar que não houve diferenças significativas entre as concentrações dos elementos que foram submetidos a 37°C de temperatura e 100% de umidade relativa. Para avaliar a estabilidade a curto prazo dos analitos,

foi utilizado como ferramenta a análise de variância com fator único ANOVA no nível de significância de 95% ($\alpha=0,05$), como indicado na Tabela 17.

TABELA 17 – Dados da ANOVA fator único dos frascos armazenados a 37°C e umidade relativa de 100% por um mês, para o estudo de estabilidade a curto prazo da amostra de fosfato de rocha candidata a MR.

Elemento (mg kg ⁻¹)	Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F calculado	Valor- p	F ^a crítico
Al	Entre Frascos	11901	5	2380	0,65	0,67	3,10
	Dentre Frascos	43992	12	3666			
	Total	55893	17				
As	Entre Frascos	1,32	5	0,26	1,31	0,32	3,10
	Dentre Frascos	2,42	12	0,20			
	Total	3,74	17				
Ca	Entre Frascos	0,60	5	0,12	0,07	0,99	3,10
	Dentre Frascos	16,42	12	1,37			
	Total	17,02	17				
Cd	Entre Frascos	1,27	5	0,26	0,91	0,50	3,10
	Dentre Frascos	3,38	12	0,28			
	Total	4,67	17				
Cr	Entre Frascos	56,13	5	11,23	0,32	0,89	3,10
	Dentre Frascos	422,29	12	35,19			
	Total	478,43	17				
Cu	Entre Frascos	2,94	5	0,59	1,82	0,18	3,10
	Dentre Frascos	3,87	12	0,32			
	Total	6,81	17				
Fe	Entre Frascos	3225	5	645,10	0,41	0,83	3,10
	Dentre Frascos	18831	12	1569,22			
	Total	22056	17				
	Entre Frascos	9521	5	1904,26			

Elemento (mg kg ⁻¹)	Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F calculado	Valor- p	F ^a crítico
K	Dentre Frascos	10640	12	886,70	2,14	0,13	3,10
	Total	20161	17				
	Entre Frascos	24090	5	4818,01			
Mg	Dentre Frascos	51175	12	4264,56	1,13	0,40	3,10
	Total	75265	17				
	Entre Frascos	24,77	5	4,95			
Mn	Dentre Frascos	85,74	12	7,14	0,69	0,64	3,10
	Total	110,51	17				
	Entre Frascos	134282	5	26856			
Na	Dentre Frascos	152998	12	12750	2,11	0,13	3,10
	Total	287280	17				
	Entre Frascos	0,67	5	0,13			
P	Dentre Frascos	0,82	12	0,07	1,95	0,16	3,10
	Total	1,49	17				
	Entre Frascos	7,91	5	1,58			
Ni	Dentre Frascos	29,03	12	2,42	0,65	0,66	3,10
	Total	26,94	17				
	Entre Frascos	39,92	5	7,98			
V	Dentre Frascos	427,01	12	35,58	0,22	0,94	3,10
	Total	466,93	17				
	Entre Frascos	62,19	5	12,44			
Zn	Dentre Frascos	859,53	12	71,63	0,17	0,97	3,10
	Total	921,72	17				

SQ = Soma Quadrática; gl = graus de liberdade; MQ= Média Quadrática;
^aFcrítico para $\alpha=0,05$

Observa-se que, a um nível de confiança de 95%, não houve diferenças significativas entre os resultados. Com isso Al, As, Ca, Cd, Cu, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, V e Zn podem ser considerados estáveis nas condições avaliadas e o material pode ser eventualmente transportado sem alterações significativas na sua composição química.

5.7.2 Estabilidade a longo prazo

Nas Figuras de 40 a54 são apresentados os resultados referentes às réplicas de cada frasco (n=9) para Al, As, Ca, Cd, Cu, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, V e Zn, avaliadas ao longo de 32 semanas.

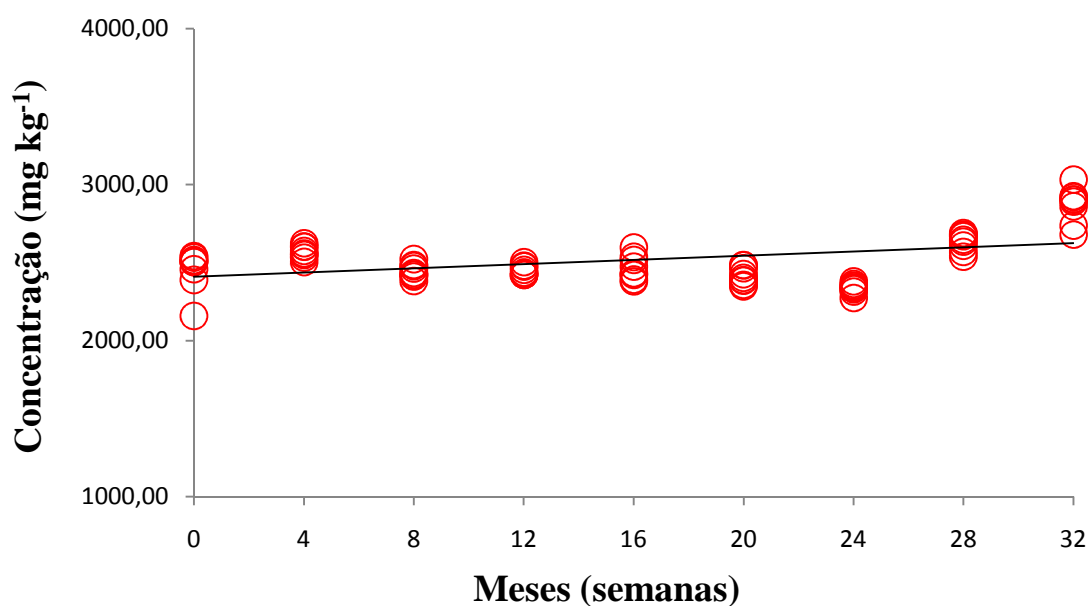


FIGURA 40 – Estabilidade a longo prazo para alumínio.

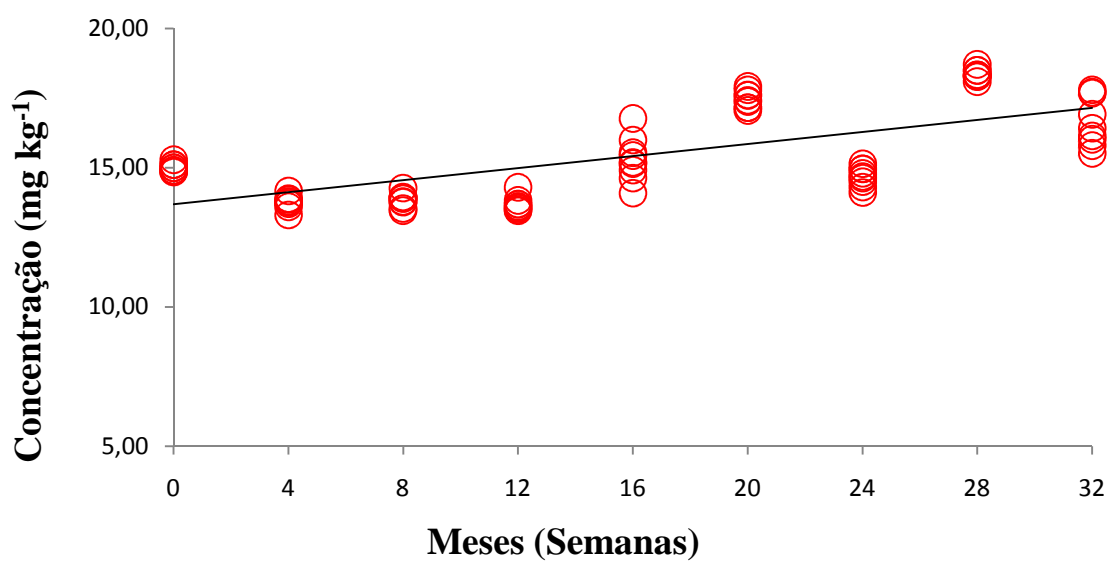


FIGURA 41 – Estabilidade a longo prazo para arsênio.

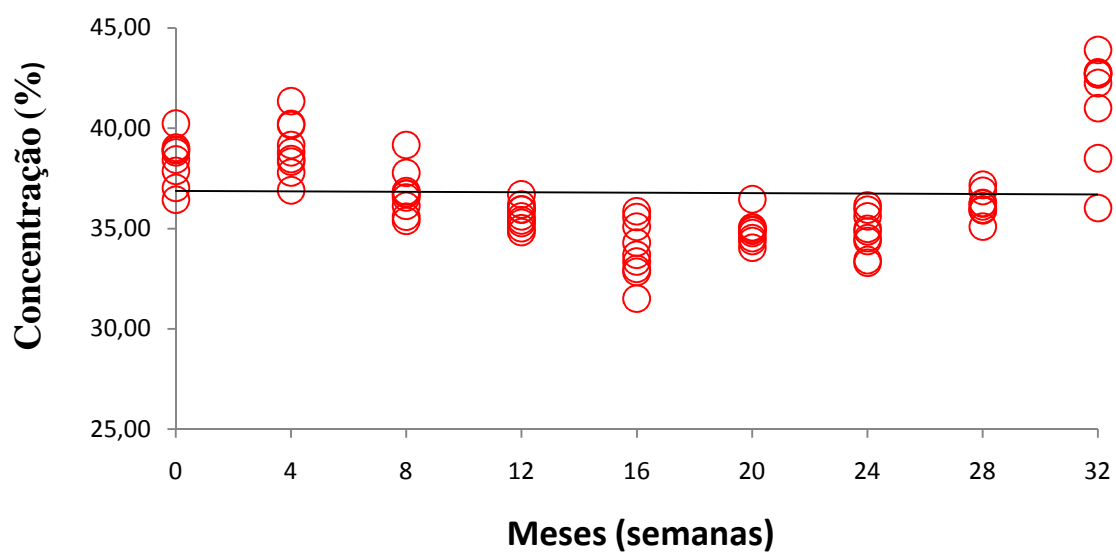


FIGURA 42 – Estabilidade a longo prazo para cálcio.

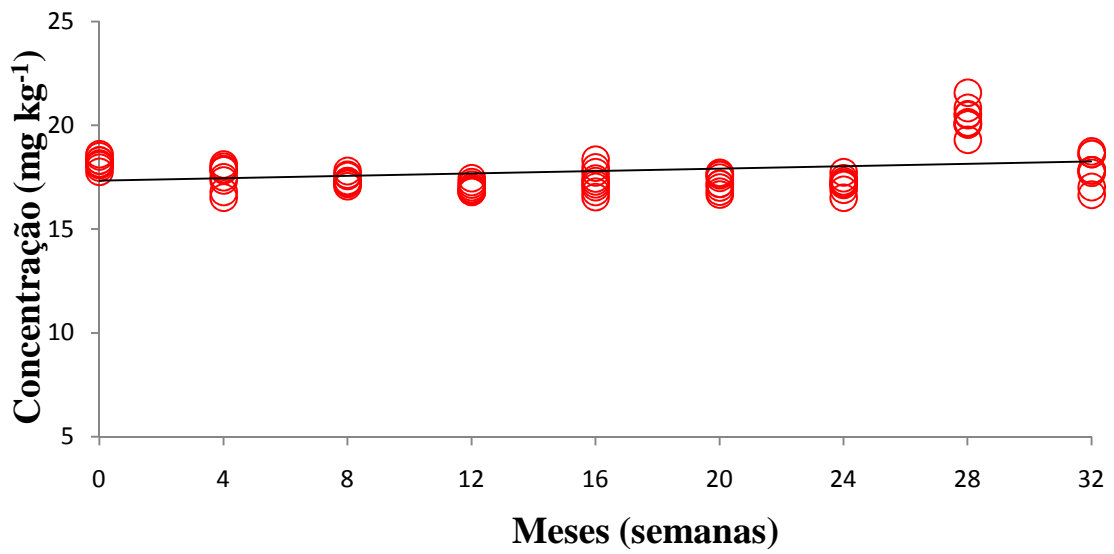


FIGURA 43 – Estabilidade a longo prazo para cádmio.

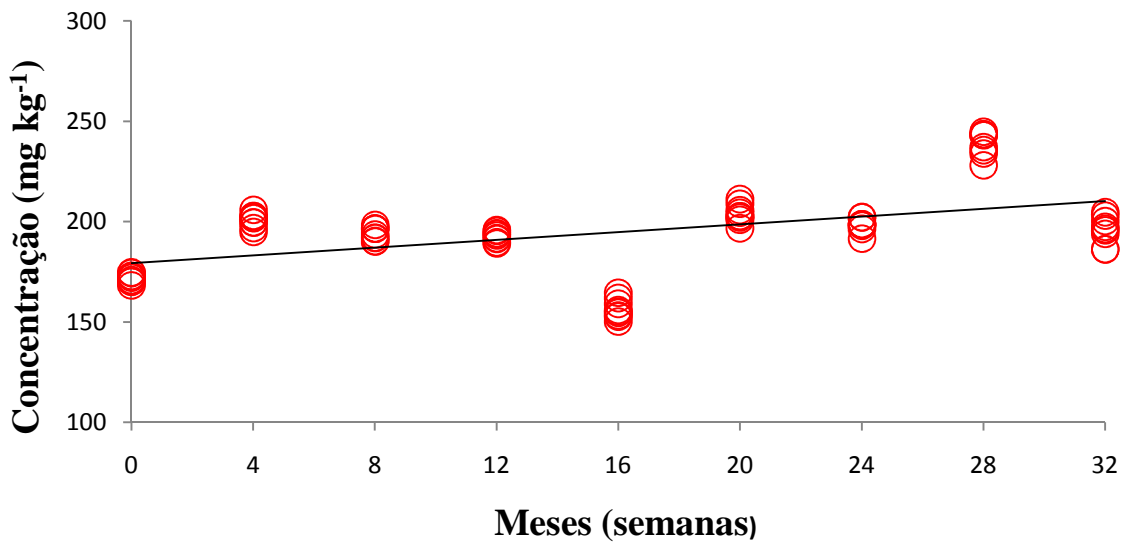


FIGURA 44 – Estabilidade a longo prazo para cromo.

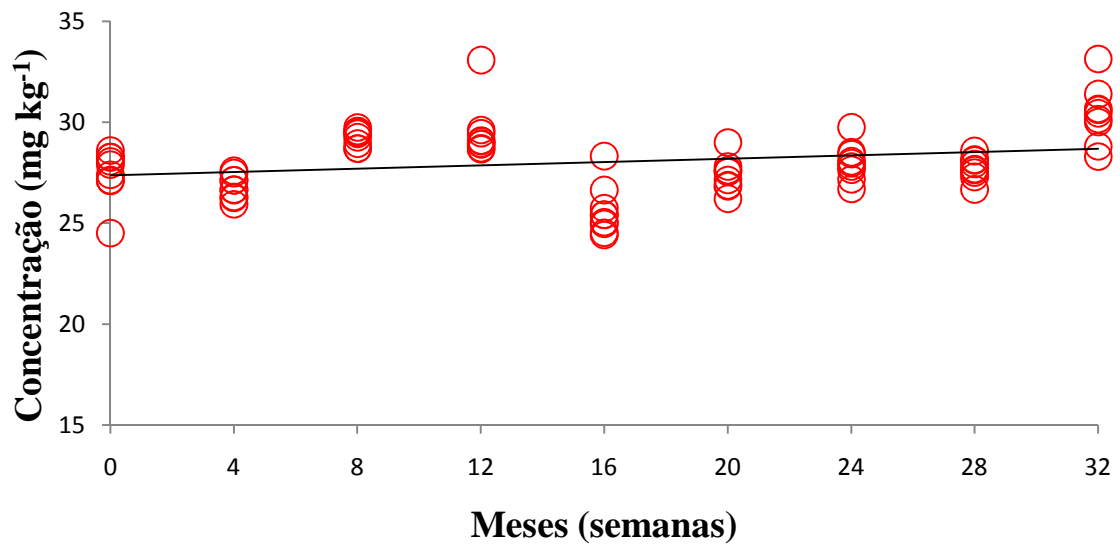


FIGURA 45 – Estabilidade a longo prazo para cobre

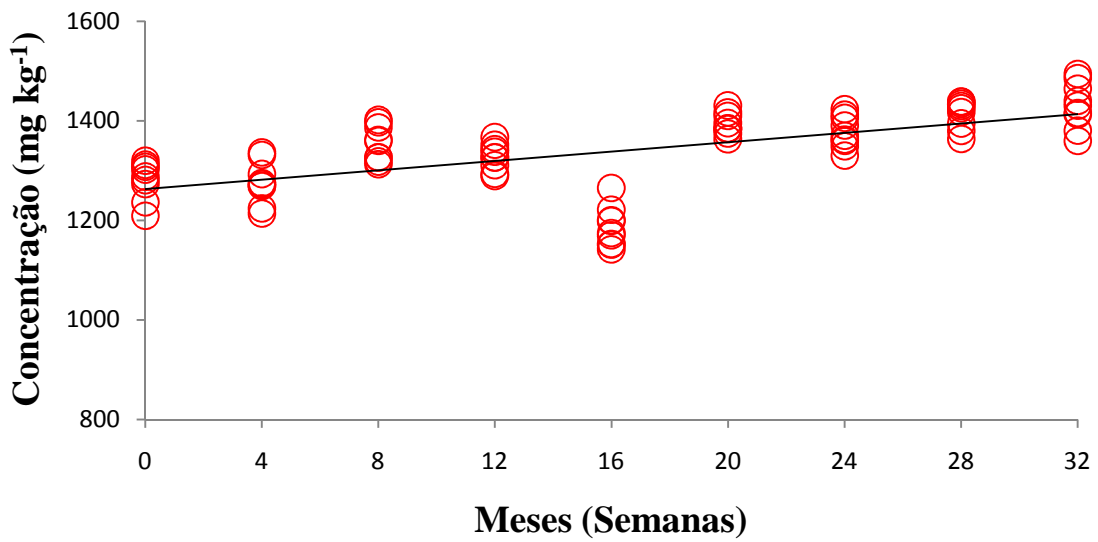


FIGURA 46 – Estabilidade a longo prazo para ferro.

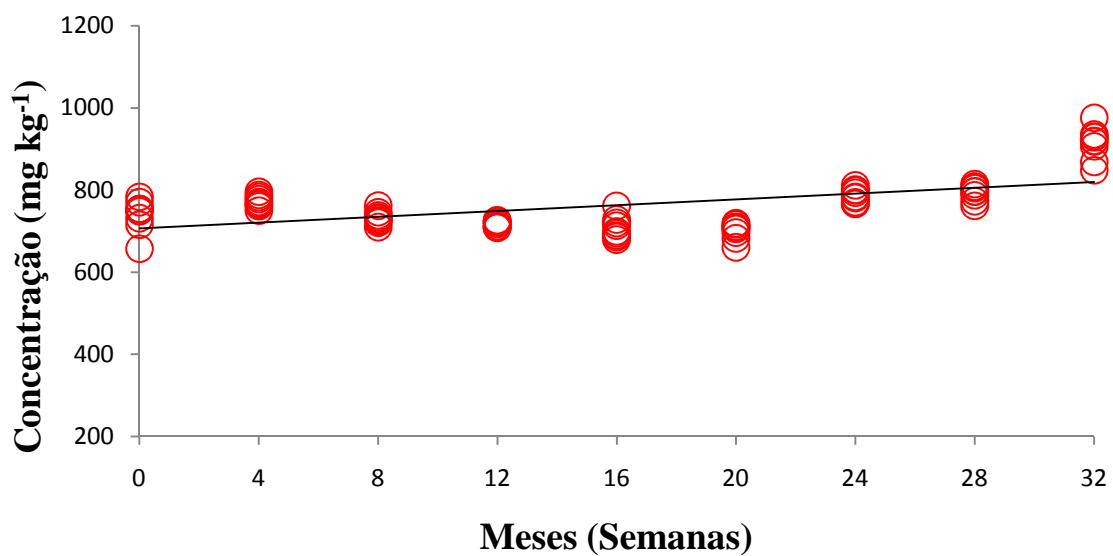


FIGURA 47 – Estabilidade a longo prazo para potássio.

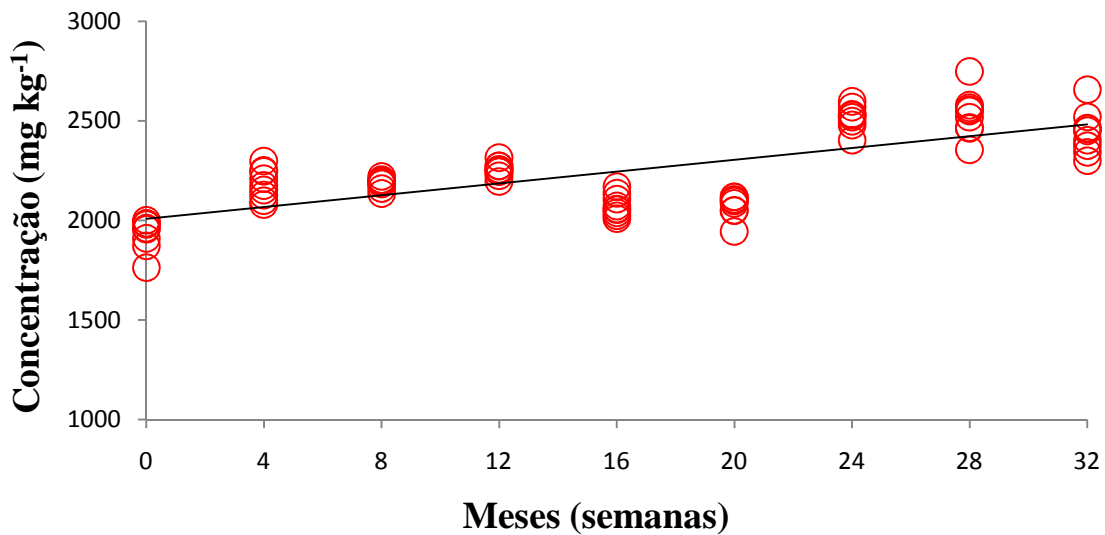


FIGURA 48 – Estabilidade a longo prazo para magnésio.

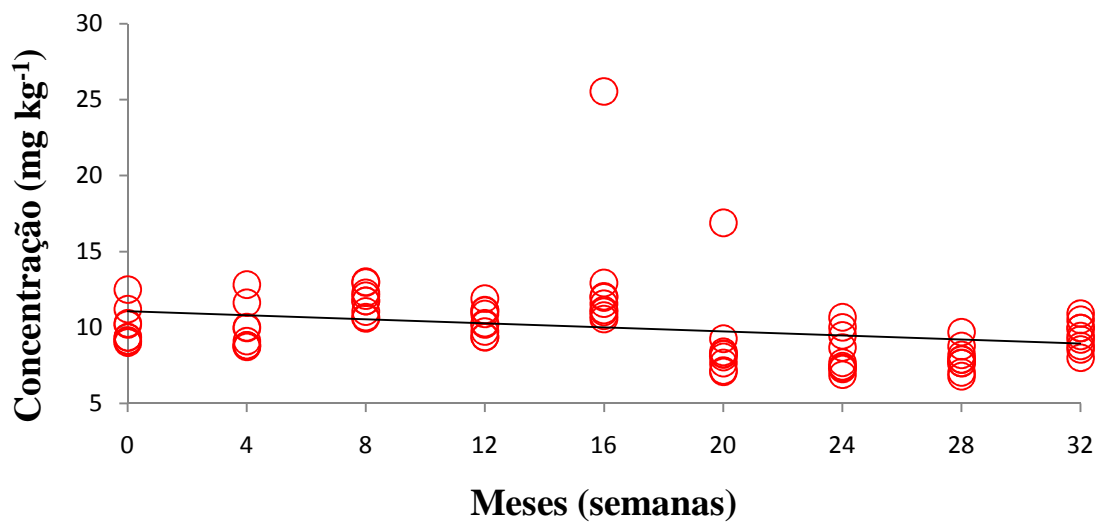


FIGURA 49 – Estabilidade a longo prazo para manganês.

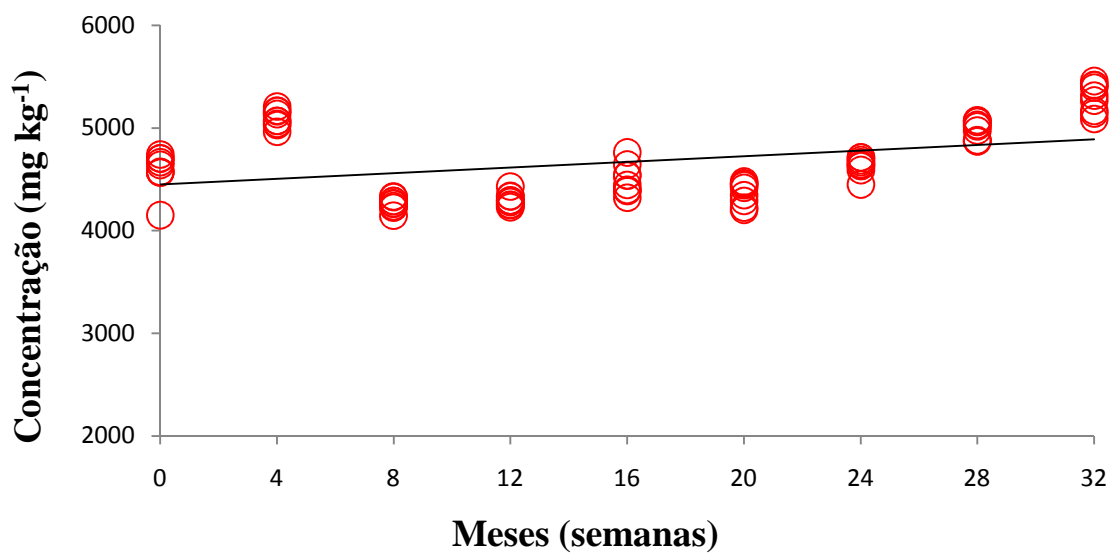


FIGURA 50 – Estabilidade a longo prazo para sódio.

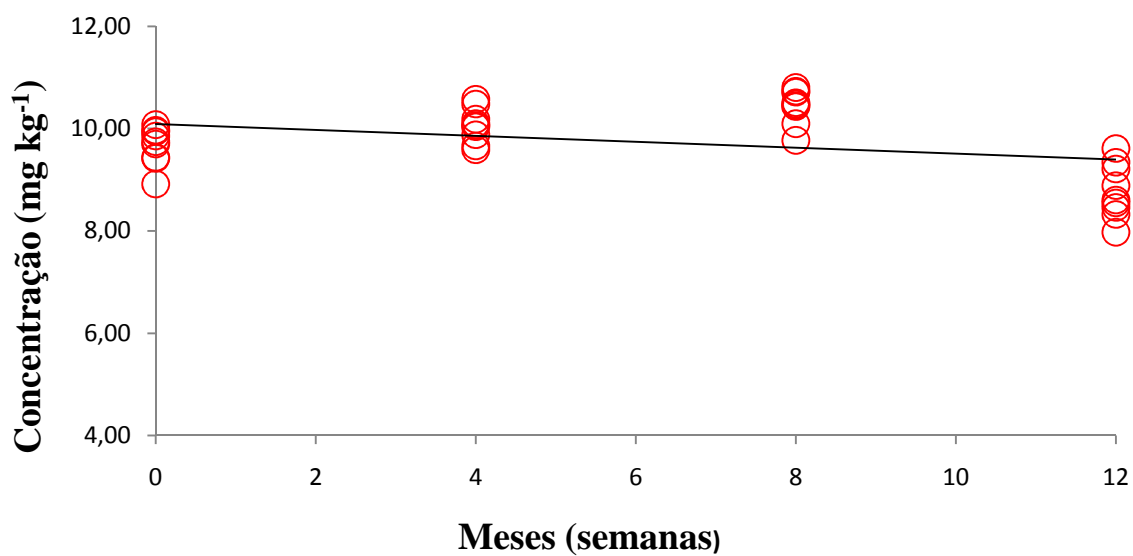


FIGURA 51 – Estabilidade a longo prazo para fósforo (avaliado ao longo de 12 semanas).

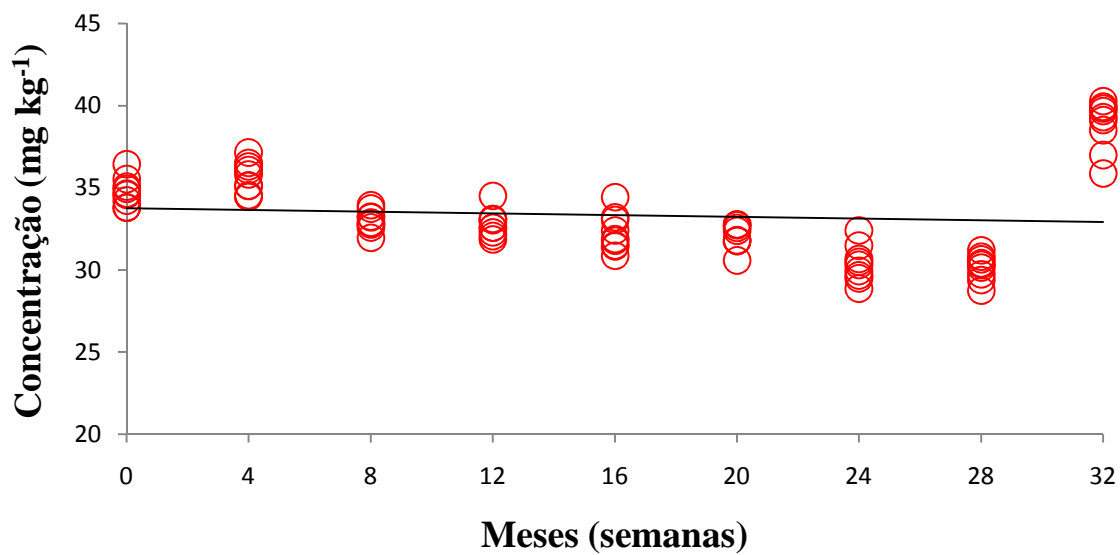


FIGURA 52 – Estabilidade a longo prazo para níquel.

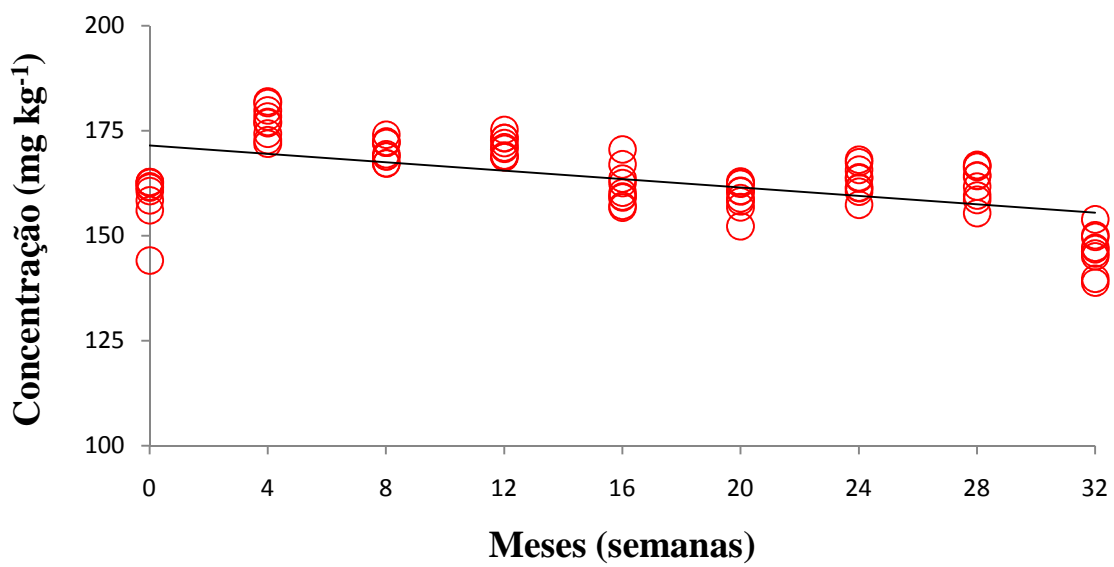


FIGURA 53 – Estabilidade a longo prazo para vanádio.

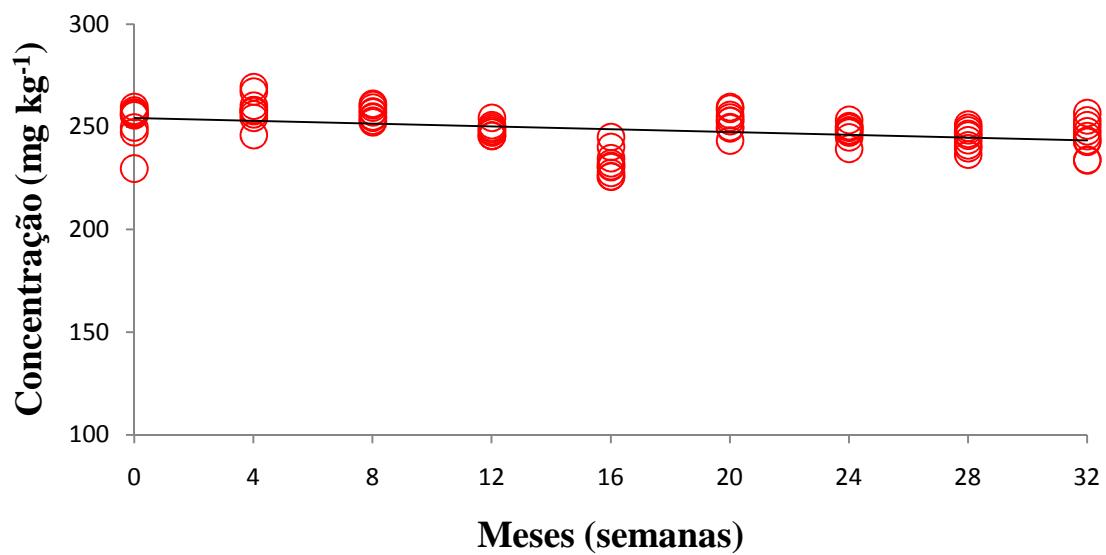


FIGURA 54 – Estabilidade a longo prazo para zinco.

Graficamente, foi observada uma tendência de inclinação positiva da reta para a maioria dos elementos, porém os resultados do teste de análise de variância ANOVA apresentados na Tabela 18 indicaram que para os elementos estudados, o $F_{\text{crítico}}$ foi maior que o $F_{\text{calculado}}$ e o valor de p, maior que 0,05. Dessa forma, o teste mostrou que, em um nível de confiança de 95%, não houve diferenças estatísticas significativas entre as concentrações dos elementos Al, As, Ca, Cd, Cu, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, V e Z ao decorrer dos meses estudados, devendo ser ressaltado que o fósforo foi avaliado durante 12 semanas e os demais elementos ao longo de 32 semanas.

TABELA 18 – Dados da ANOVA fator único para o estudo de estabilidade a longo prazo da amostra de fosfato de rocha candidata a MR.

Elemento (mg kg ⁻¹)	Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F calculado	Valor- p	F ^a crítico
Al	Entre Frascos	34803		4350	0,12	0,99	2,05
	Dentre Frascos	2876100	89	35507			
	Total	2910903					
As	Entre Frascos	1,73	89	0,21	0,08	0,99	2,05
	Dentre Frascos	225,56		2,78			
	Total	227,29					
Ca (%)	Entre Frascos	5,07		0,63			
	Dentre Frascos	939,85	89	11,60	0,05	0,99	2,05
	Total	944,92					
Cd	Entre Frascos	441		55,13			
	Dentre Frascos	47049	89	580,85	0,09	0,99	2,05
	Total	47490					
Cr	Entre Frascos	3,89		0,49			
	Dentre Frascos	139,27	89	1,72	0,28	0,97	2,05
	Total	143,16					

Elemento (mg kg ⁻¹)	Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F calculado	Valor- p	F ^a crítico
	Entre Frascos	5,64		0,70			
Cu	Dentre Frascos	236,83	89	2,92	0,24	0,98	2,05
	Total	242,47					
	Entre Frascos	30024		3753,02			
Fe	Dentre Frascos	978673	89	12082,38	0,31	0,96	2,05
	Total	1008697					
	Entre Frascos	3757		469,59			
K	Dentre Frascos	591644	89	7304,24	0,06	0,99	2,05
	Total	595401					
	Entre Frascos	134447		16805,91			
Mg	Dentre Frascos	3458648	89	42699,36	0,39	0,92	2,05
	Total	3593095					
	Entre Frascos	58,99	89	7,37	1,29	0,26	2,05
Mn	Dentre Frascos	463,46		5,72			
	Total	522,45					
	Entre Frascos	113497,6		14187,21			
Na	Dentre Frascos	21086473	89	260326,8	0,05	0,99	2,05
	Total	21199971					
	Entre Frascos	0,65		0,08			
P (%)	Dentre Frascos	18,22	35	0,67	0,12	0,99	2,30
	Total	18,87					
	Entre Frascos	7,41		0,93			
Ni	Dentre Frascos	841,78	89	10,39	0,08	0,99	2,05
	Total	849,79					

Elemento (mg kg ⁻¹)	Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F calculado	Valor- p	F ^a crítico
V	Entre Frascos	313,41		39,18			
	Dentre Frascos	8899,73	89	109,87	0,36	0,94	2,05
	Total	9213,15					
Zn	Entre Frascos	399,89		49,98			
	Dentre Frascos	7694,28	89	94,99	0,53	0,83	2,05
	Total	8094,17					

SQ = Soma Quadrática; gl = graus de liberdade; MQ= Média Quadrática;
^aFcrítico para $\alpha=0,05$

A ABNT ISO GUIA 35 [25] estabelece que o elemento é considerado estável se a inclinação da reta for menor que o produto entre o teste t e o desvio padrão da inclinação da reta. Na Tabela 19 são apresentados os valores da inclinação da reta (b_1) e o produto do desvio padrão com o teste t de Student ($t_{(0,95, n-2)} \cdot s(b_1)$), calculados por meio das Equações 9 a 12.

Se a condição $|b_1| < (t_{(0,95, n-2)} \cdot s(b_1))$ for confirmada, nenhuma instabilidade será observada. Analisando os resultados da Tabela 18 é possível concluir que todos os elementos estudados atenderam a essa condição, portanto são considerados estáveis em um nível de confiança de 95% e então o material de fosfato de rocha candidato a material de referência é suficientemente estável para ser armazenado à temperatura ambiente, sem alterações significativas na composição dos elementos estudados neste trabalho.

$$b_0 = \bar{Y} - b_1 \bar{X} \quad (9)$$

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} \quad (10)$$

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - b_0 - b_1 X_i)^2}{n - 2} \quad (11)$$

$$s(b_1) = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}} \quad (12)$$

Onde:

X – refere-se aos meses (em semanas) de duração do teste.

Y – refere-se à concentração do analito.

TABELA 19 – Teste t obtido por ICP OES e LIBS (P) para o estudo de estabilidade a longo prazo.

Elementos (mg kg ⁻¹)	b ₁	t _{0,95,n-2} · s(b ₁)
Al	5,39	31,35
As	0,03	16,77
Ca (%)	0,09	27,22
Cd	0,04	32,89
Cr	0,65	28,55
Cu	0,02	12,25
Fe	4,14	54,18
K	3,00	46,78
Mg	3,26	14,28
Mn	0,01	3,44
Na	17,59	44,72
Ni	0,064	18,92
P (%)	0,06	9,59
V	0,10	8,47
Zn	0,21	21,24

5.8 Ensaio Colaborativo

O material de fosfato de rocha candidato a material de referência foi distribuído aos laboratórios que aceitaram participar do ensaio colaborativo. Esses laboratórios se comprometeram a determinar os elementos que fossem de sua capacidade de acordo com os métodos utilizados na sua rotina analítica, com seis repetições para cada elemento. Os laboratórios enviaram também os métodos de determinação empregados, os quais são discriminados a seguir:

- Laboratório 1 –FAAS (Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn), GF-AAS (As, Cd e Cr) e Colorimetria (P);
- Laboratório 2 – FAAS (Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni e Zn), FAES (K) e Gravimetria (P);
- Laboratório 3 – UV –VIS (P) e MP-AES (Ca, Cd, Cu, Mg, Mn, Na e Zn);
- Laboratório 4 - ICP OES (As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Na, Ni e P)
- Laboratório 5 – FAAS (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn), ICP OES (Cd, Cr e V), FAES (K) e Gravimetria (P)
- Laboratório 6 – ICP OES (Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, K, Na, Ni e Zn) e Gravimetria (P)
- Laboratório 7 – FAAS (Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Zn), FAES (K) e Gravimetria (P)
- Laboratório 8– FAAS (Ca e Mg) e Gravimetria (P)
- Laboratório 9 – ICP OES (Al, As, Ca,Cd,Cr, Fe, Mg e P)
- Laboratório 10 – FAAS (Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni e Zn), FAES (Na e K) e Gravimetria (P)
- Laboratório 11 – ICP OES (Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, P, Mg, Mn, Ni, V e Zn) e FAES (Na e K)
- Laboratório 12- ICP OES (Al, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Ni, P e V)
- Laboratório 13 – FAAS (Ca, Cu, Fe , Mg,Mn e Zn) e Gravimetria (P)

- Laboratório 14 – FAAS (Ca, Cd, Cr, Cu, Mg, Mn e Zn) e Gravimetria (P)
- Laboratório 15 – INAA (As, Cr, Fe, Na e Zn)
- Laboratório 16 – ICP-OES(Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, V e Zn)
- Laboratório 17 – LIBS (P)

Analisando os dados reportados, nota-se que embora tenham sido utilizadas técnicas de detecção distintas em alguns casos existe uma convergência na maioria dos resultados, apresentados na Tabela 20.

TABELA 20 – Resultados obtidos pelos participantes do ensaio colaborativo para caracterização do candidato a material de referência de fosfato de rocha para valores totais dos elementos (mg kg⁻¹).

Lab	Al	As	Ca	Cd	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Ni	P	V	Zn
1	-	-	35,63	21,50	232,39	-	1669,00	666,67	2800,00	13,63	4820,00	-	13,92	-	301,00
1	-	-	34,59	45,70	279,44	-	1861,00	666,67	2900,00	12,72	5210,00	-	14,41	-	296,00
1	-	-	35,94	51,80	273,10	-	1937,00	666,67	2800,00	17,73	5700,00	-	14,30	-	301,00
1	-	-	36,39	28,90	235,20	-	2106,00	583,33	3000,00	15,72	5600,00	-	14,70	-	317,00
1	-	-	35,51	29,30	230,30	-	2200,00	666,67	2900,00	14,70	5400,00	-	14,36	-	309,00
1	-	-	33,55	29,50	245,90	-	1678,00	666,67	2800,00	15,20	5600,00	-	14,60	-	331,00
2	-	-	34,26	20,80	279,04	37,54	1579,78	133,30	2660,00	13,10	-	35,74	13,60	-	278,08
2	-	-	34,93	19,92	272,09	36,62	1552,29	150,00	2970,00	12,68	-	34,88	13,63	-	283,15
2	-	-	35,93	19,76	275,19	36,31	1549,58	150,00	2600,00	12,18	-	33,46	13,66	-	276,60
2	-	-	34,61	19,80	275,26	36,10	1540,83	141,70	2820,00	13,05	-	33,90	13,67	-	277,80
2	-	-	35,72	20,70	274,71	37,70	1558,09	158,30	2540,00	12,84	-	33,00	13,65	-	273,90
2	-	-	36,00	20,20	275,87	36,30	1547,00	158,30	2790,00	13,40	-	35,60	13,70	-	275,60
3	-	-	35,87	-	-	170,00	-	-	-	478,00	17610,00	-	-	-	533,00
3	-	-	36,49	-	-	237,00	-	-	-	765,00	14840,00	-	-	-	548,00
3	-	-	36,85	-	-	169,00	-	-	-	358,00	17660,00	-	-	-	532,00
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	11,28	39,54	18,45	207,24	24,73	1820,60	225,00	3003,00	6,79	6423,00	26,54	15,01	-	302,26
4	-	12,62	39,92	18,47	207,07	25,08	1826,05	500,00	3030,00	7,38	6480,00	27,34	15,10	-	302,38
4	-	12,65	40,06	18,59	216,07	25,36	1860,24	525,00	3040,00	7,84	6490,00	29,25	15,11	-	306,42
4	-	12,69	40,14	18,65	219,21	25,41	1869,94	575,00	3050,00	9,19	6620,00	29,32	15,14	-	306,63
4	-	13,96	40,64	18,65	220,97	26,01	1880,27	575,00	3060,00	9,50	6770,00	29,76	15,23	-	307,58
4	-	15,16	40,77	18,69	221,91	26,45	1881,03	733,00	3070,00	9,53	6790,00	29,78	15,26	-	307,60

Lab	Al	As	Ca	Cd	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Ni	P	V	Zn
5	-	-	36,40	60,00	403,10	44,50	1790,00	612,50	2840,00	18,80	-	73,10	13,45	-	266,50
5	-	-	36,98	75,00	416,60	45,30	1740,00	591,67	2830,00	19,90	-	273,00	13,80	-	263,80
5	-	-	37,09	65,00	393,10	45,90	1750,00	612,50	2870,00	20,70	-	158,00	13,71	-	266,60
5	-	-	37,44	55,00	431,20	45,20	1750,00	571,67	2870,00	20,50	-	269,00	13,62	-	268,10
5	-	-	37,13	55,00	415,70	45,10	1770,00	612,50	2880,00	21,60	-	2589,00	13,87	-	270,80
6	4380,00	4,74	30,38	450,00	564,00	34,50	2200,00	1145,50	2690,00	82,80	5191,00	38,00	14,00	-	150,00
6	4378,00	5,10	30,21	441,00	559,25	34,25	2198,25	1139,00	2684,00	82,50	5181,00	37,60	14,20	-	148,00
6	4375,00	4,81	30,12	448,50	565,00	34,33	2193,40	1142,20	2681,25	82,25	5188,00	38,10	13,80	-	149,20
6	4382,00	4,79	30,40	455,50	569,00	34,49	2195,47	1143,70	2681,75	83,00	5175,00	37,80	13,87	-	151,08
6	4377,00	4,74	30,33	454,10	563,00	34,52	2194,10	1140,40	2684,50	82,70	5179,00	37,80	13,84	-	148,30
6	4376,00	4,88	30,25	450,30	562,00	34,46	2199,00	1139,60	2688,20	82,68	5177,00	38,20	13,94	-	148,60
7	-	-	35,51	32,53	329,00	40,00	1810,00	131,94	2860,00	20,00	-	-	-	-	290,00
7	-	-	34,90	32,47	335,20	40,00	-	131,94	2840,00	20,00	-	-	-	-	320,00
7	-	-	34,92	31,84	338,22	40,00	-	131,94	2880,00	20,00	-	-	-	-	290,00
7	-	-	34,82	32,40	339,20	40,00	-	131,94	2840,00	20,00	-	-	-	-	290,00
7	-	-	35,22	32,30	335,40	40,00	-	131,94	2900,00	20,00	-	-	-	-	290,00
7	-	-	35,18	32,23	336,53	40,00	-	131,94	2870,00	20,00	-	-	-	-	290,00
8	-	-	34,26	-	-	-	-	-	2800,00	-	-	-	13,51	-	-
8	-	-	34,95	-	-	-	-	-	2800,00	-	-	-	13,54	-	-
8	-	-	35,15	-	-	-	-	-	2700,00	-	-	-	13,53	-	-
8	-	-	35,12	-	-	-	-	-	2800,00	-	-	-	13,54	-	-
8	-	-	34,35	-	-	-	-	-	2800,00	-	-	-	13,50	-	-
8	-	-	34,38	-	-	-	-	-	2800,00	-	-	-	13,53	-	-
9	2020,00	18,00	35,10	17,00	220,00	-	1610,00	-	2340,00	-	-	-	14,60	-	-
9	2080,00	19,00	37,00	18,00	230,00	-	1680,00	-	2460,00	-	-	-	14,90	-	-
9	2080,00	19,00	37,10	17,00	230,00	-	1650,00	-	2520,00	-	-	-	15,00	-	-
9	2090,00	21,00	37,70	18,00	230,00	-	1660,00	-	2480,00	-	-	-	15,90	-	-
9	2200,00	21,00	37,00	19,00	240,00	-	1760,00	-	2580,00	-	-	-	16,50	-	-
9	2100,00	18,00	38,10	17,00	240,00	-	1710,00	-	2550,00	-	-	-	15,00	-	-

Lab	Al	As	Ca	Cd	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Ni	P	V	Zn
10	-	-	37,65	20,50	461,30	39,86	1623,00	166,70	2601,00	17,00	490,00	39,00	-	-	284,60
10	-	-	37,50	20,00	440,20	40,00	1629,00	166,30	2616,00	16,97	492,00	37,90	-	-	279,10
10	-	-	37,35	19,00	459,20	39,98	1628,00	180,60	2599,00	16,99	497,50	38,00	-	-	279,10
10	-	-	37,79	19,00	459,60	39,96	1610,00	166,80	2598,00	16,98	487,60	39,00	-	-	289,70
10	-	-	37,78	20,50	456,70	39,00	1649,00	166,30	2576,00	17,01	490,50	40,00	-	-	285,00
10	-	-	37,88	19,00	452,80	39,48	1622,00	180,40	2623,00	16,99	487,60	39,00	-	-	279,80
11	2241,00	-	38,50	15,00	220,00	30,00	1476,00	937,00	2392,00	9,40	5223,00	16,00	15,70	207,00	247,00
11	2207,00	-	38,20	16,00	223,00	31,00	1466,00	1096,00	2424,00	10,80	5062,00	16,10	16,00	206,00	255,00
11	-	-	38,50	17,00	224,00	29,60	-	1097,00	2418,00	10,00	5307,00	15,90	15,70	208,00	247,00
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	2535,40	-	30,86	23,22	257,53	36,97	1522,89	745,62	2309,50	17,99	-	20,76	15,41	129,61	-
12	2369,70	-	30,36	21,98	247,71	35,63	1503,82	734,77	2202,94	16,08	-	27,08	14,75	126,83	-
12	2347,40	-	29,29	21,21	241,13	34,64	1396,32	713,35	2217,79	14,84	-	18,02	14,38	128,06	-
12	2378,30	-	29,90	21,50	248,20	35,40	1429,68	728,70	2211,31	14,99	-	20,60	14,65	125,89	-
12	2336,40	-	29,58	22,20	239,50	34,10	1372,71	712,07	2190,60	13,56	-	18,80	14,13	120,89	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	42,81	-	-	-	-	2297,47	-	-	-	-	22,70	-	-
13	-	-	42,36	-	-	-	-	3485,36	-	-	-	-	22,85	-	-
13	-	-	32,93	-	-	-	-	3296,70	-	-	-	-	22,90	-	-
13	-	-	39,42	-	-	-	-	3296,37	-	-	-	-	23,21	-	-
13	-	-	41,46	-	-	-	-	3680,47	-	-	-	-	22,52	-	-
13	-	-	42,29	-	-	-	-	3275,76	-	-	-	-	23,16	-	-
14	-	-	37,74	14,94	311,22	-	-	-	-	40,00	-	-	13,38	-	-
14	-	-	37,43	12,42	320,42	-	-	-	-	30,00	-	-	13,40	-	-
14	-	-	37,19	9,98	321,79	-	-	-	-	30,00	-	-	13,38	-	-
14	-	-	37,75	12,47	324,16	-	-	-	-	30,00	-	-	13,35	-	-
14	-	-	39,25	12,46	328,95	-	-	-	-	30,00	-	-	13,36	-	-
14	-	-	38,47	12,49	322,21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Lab	Al	As	Ca	Cd	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Ni	P	V	Zn
15	-	15,60	-	-	278,60	-	1680,00	-	-	-	5110,00	-	-	-	266,78
15	-	16,30	-	-	273,89	-	1660,00	-	-	-	5070,00	-	-	-	261,88
15	-	16,50	-	-	282,75	-	1660,00	-	-	-	5010,00	-	-	-	272,83
15	-	16,60	-	-	278,98	-	1720,00	-	-	-	5050,00	-	-	-	270,92
15	-	15,80	-	-	273,55	-	1730,00	-	-	-	5040,00	-	-	-	270,80
15	-	16,70	-	-	276,43	-	1630,00	-	-	-	5020,00	-	-	-	273,70
16	2635,30	13,50	35,58	16,92	176,47	29,40	1322,10	886,31	2060,31	9,04	4713,40	34,21	-	161,97	232,83
16	2512,40	13,40	35,59	16,60	173,45	28,70	1317,70	845,85	2013,56	8,09	4562,50	33,30	-	158,10	228,51
16	2546,99	13,30	33,90	16,85	175,05	29,10	1367,70	861,20	2035,33	8,21	4553,70	33,85	-	160,24	229,34
16	2631,40	13,70	34,49	17,00	181,15	29,30	1364,40	879,61	2054,99	9,40	4700,80	34,85	-	162,90	234,19
16	2583,79	13,50	28,42	16,70	177,10	29,00	1340,00	868,16	2027,62	10,28	4612,60	34,19	-	160,58	230,00
16	2542,85	13,40	33,44	16,60	174,65	28,50	1328,80	856,50	2063,55	10,37	4527,90	34,11	-	157,94	227,56
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,97	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,76	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,75	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,88	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,09	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,90	-	-

Para cada analito determinado pelos laboratórios participantes foi aplicado o teste de Grubbs para a exclusão de *outliers* para cada réplica. Neste teste 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% [105].

$$G = \frac{[x_i - \bar{x}]}{s} \quad (13)$$

Na Tabela 20 estão os resultados reportados completos, ou seja, sem a retirada dos *outliers* de cada laboratório identificados pelo teste de Grubbs. A estes dados, foi aplicada a estatística baseada no índice z. [106].

Este índice é utilizado em programas interlaboratoriais para avaliar o desempenho dos participantes. O cálculo do índice z pode ser realizado através da equação 14:

$$Z = \frac{(x_i - \bar{x})}{\sigma_p} \quad (14)$$

O termo $(x_i - \bar{x})$ reflete o erro cometido na quantificação reportada pelo laboratório participante com relação ao valor designado, onde: x_i é o resultado indicado pelo laboratório; \bar{x} o valor designado ou a melhor estimativa dele e o σ_p é o desvio padrão alvo.

Em relação aos valores do índice z , quanto mais próximo o valor de z de zero, melhor será o resultado reportado pelo laboratório. Se z for igual a ± 2 , o resultado do laboratório é considerado aceitável e se z for maior que ± 3 , os resultados são considerados insatisfatórios ou inaceitáveis. Aplicando o índice z , foi possível visualizar que há problemas de reprodutibilidade (variação interlaboratorial) para alguns elementos e que há laboratórios que apresentaram resultados que são extremos e, portanto, passíveis de serem eliminados. Com isso, tanto o teste de Grubbs quanto o índice z confirmaram os *outliers*, portanto esses valores de concentração foram excluídos para a obtenção do valor de consenso e o cálculo da incerteza associada à caracterização do material de fosfato de rocha candidato a MR.

É importante enfatizar que para este estudo, o ensaio colaborativo teve somente a intenção de obter os valores de consenso designado ao material candidato como descrito na ABNT ISO GUIA 35 [25], portanto sem nenhuma intenção de avaliar o desempenho dos laboratórios participantes.

Após a exclusão dos *outliers* foi avaliada a precisão dos valores reportados pelos laboratórios, por meio da equação de Horwitz [107].

Observou-se a existência de uma relação entre os parâmetros de precisão e a concentração dos elementos presentes em uma determinada amostra. Dessa forma, o cálculo do desvio padrão alvo (σ_p) foi determinado para as concentrações (c) expressas como grandeza adimensional (por exemplo: $1 \text{ mg kg}^{-1} = 10^{-6}$), sendo usado o valor das médias obtidas para cada elemento.

$$\sigma_p = \frac{0,02 \times c^{0,8495}}{m} \quad (15)$$

Onde:

c é a concentração expressa como grandeza adimensional (p.e.: $1 \text{ mg kg}^{-1} = 10^{-6}$)

m é a ordem de grandeza (10^{-6})

A partir do desvio padrão alvo, calculou-se o RSD de Horwitz com as médias dos valores do ensaio colaborativo para os elementos. Os valores de RSD de Horwitz para Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, V e Zn foram, respectivamente, 4,83; 10,57; 2,33; 10,09; 6,82; 9,32; 5,22; 6,16; 4,87; 10,51; 4,39; 9,46; 10,72; 7,46 e 6,85 % e na Tabela 21 são apresentados os valores de RSD Horwitz teórico aceitável em relação a concentração do analito. Conclui-se que os valores reportados pelos laboratórios apresentaram aceitáveis valores de RSD, indicando boa precisão quanto à reprodutibilidade interlaboratorial [107].

TABELA 21 – RSD Horwitz teórico entre a precisão de um método de análise e a concentração da substância [107].

Unidade	RSD Horwitz, %
100 %	2
10 %	2,8
1 %	4
0,10%	5,7
100 mg kg ⁻¹	8
10 mg kg ⁻¹	11,3
1 mg kg ⁻¹	16
100 µg kg ⁻¹	22,6
10 µg kg ⁻¹	32
1µg kg ⁻¹	45,3

Após os tratamentos estatísticos aplicados, foi realizada também a análise de variância ANOVA. A partir dos resultados foi possível estimar os valores de consenso e as incertezas padrão para a definição dos valores designados dos elementos Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, V e Zn.

5.9 Estimativas das incertezas

A incerteza expandida, U_{MRC} , foi calculada de acordo com as normas estabelecidas pela ABNT ISO GUIA 35 [25], que considera as contribuições referentes à incerteza padrão da caracterização (u_{char}), da homogeneidade (u_{bb}), da estabilidade a curto prazo (u_{sts}) e da estabilidade a longo prazo (u_{lts}). O fator k refere-se ao fator de abrangência, que neste trabalho foi considerado $k=2$ (para intervalo de confiança de 95%). Na equação 16 é apresentado o cálculo da incerteza expandida:

$$U_{MRC} = k \sqrt{u_{char}^2 + u_{bb}^2 + u_{sts}^2 + u_{lts}^2} \quad (16)$$

A parcela da incerteza padrão inerente à não homogeneidade (u_{bb}) do material que compõe o lote de fosfato de rocha preparado foi obtida a partir dos mesmos dados gerados pela ANOVA com fator único, conforme a ABNT ISO GUIA 35 [25,47]. A incerteza padrão inerente à homogeneidade é calculada em função dos valores da média quadrática (MQ), considerando que as médias quadráticas entre grupos (MQ_{entre}) e dentro grupos (MQ_{dentre}) representam as variâncias extrínseca e intrínseca entre frascos. Esses valores são fornecidos pela ANOVA na Tabela 16.

O S_{bb} pode ser tomado como estimativa para a incerteza padrão devida à homogeneidade entre frascos, u_{bb} , que é utilizada como componente de incerteza padrão combinada para certificação. Deste modo, quando o valor de MQ entre os grupos (MQ_{entre}) for maior que dentro dos mesmos (MQ_{dentre}), a incerteza padrão devida à não homogeneidade (u_{bb}) é equivalente ao desvio padrão (S_{bb}), podendo ser calculada por meio da Equação 17, com n = número de replicatas efetuadas em cada frasco. Neste caso o número de réplicas é igual a 3 ($n=3$).

$$u_{bb} = s_{bb} = \sqrt{\frac{MQ_{entre} - MQ_{dentre}}{n}} \quad (17)$$

Se o valor de MQ entre os grupos (MQ_{entre}) for menor que dentre dos mesmos (MQ_{dentre}) a heterogeneidade pode estar mascarada pela repetitividade do método, sendo então recomendado considerar a contribuição da variância dentre grupos. Portanto, a incerteza padrão devido à não homogeneidade do lote preparado será representada pela Equação 18, que está sob influência da variância de repetitividade.

$$u_{homogeneidade} = \sqrt{\frac{MQ_{dentre}}{n}} \sqrt[4]{\frac{2}{v_{MQ_{dentre}}}} \quad (18)$$

Onde $v_{MQ_{dentre}}$ é igual ao grau de liberdade dentre grupos.

Os analitos As, Al, Ca, Cd, Cr, Fe, Mn, Ni e Zn tiveram $MQ_{entre} > MQ_{dentre}$, portanto a incerteza a homogeneidade foi calculado usando a Equação 17. E para os analitos Cu, K, Mg, Na, P e V tiveram $MQ_{entre} < MQ_{dentre}$, a incerteza a homogeneidade para esses analitos foi calculada usando a Equação 18.

Foram consideradas as incertezas padrão relacionadas à estabilidade a curto e a longo prazos, considerando o desvio padrão da inclinação da reta (s_{bl}) de acordo com a Equações 19 e o tempo total o número de semanas que o estudo foi realizado (t). Por meio da equação 19 calcula-se a estimativa da incerteza associada à estabilidade a curto prazo (u_{sts}) e a longo prazo (u_{lts}).

$$u_{sts,lts} = S_{b1} \cdot t = \quad (19)$$

Onde:

S_{bl} - é o desvio padrão da inclinação da reta

t - tempo total em semanas que o estudo foi realizado

A estimativa da incerteza associada à caracterização (u_{char}) é calculada a partir dos parâmetros obtidos da ANOVA, conforme as Equações 20 a 22.

$$u = u_{char} = \sqrt{\frac{S_L^2}{p} + \frac{S_r^2}{n \cdot p}} \quad (20)$$

$$s_r^2 = MQ_{dentre} \quad (21)$$

$$s_L^2 = \frac{MQ_{entre} - MQ_{dentre}}{n_0} \quad (22)$$

Onde:

MQ_{entre} e MQ_{dentre} – média quadrática entre e dentro dos grupos, dados obtidos pela ANOVA

n_0 e n – significa número de determinações, sendo que neste trabalho foram 6 repetições

p – número de laboratórios participantes.

5.10 Atribuição dos valores de propriedades e incertezas obtidas

A incerteza implica em uma maior confiança na validade do resultado de medição, sendo que o valor designado apresentado com sua incerteza possibilita o emprego do material de referência na avaliação da precisão e/ou da exatidão de um método analítico.

Na Tabela 22 estão indicados os valores das incertezas padrão associadas à caracterização (u_{car}), homogeneidade (u_{bb}), estabilidade a longo prazo (u_{lts}) e a incerteza expandida final do material de referência de fosfato de rocha (U_{MR}).

TABELA 22 – Estimativas das incertezas padrão da caracterização (u_{char}), homogeneidade (u_{bb}), estabilidade a curto prazo (u_{sts}), estabilidade a longo prazo (u_{lts}) e a incerteza expandida (U_{MR}) para cada mensurando no MR de fosfato de rocha.

Mensurado (mg kg⁻¹)	u_{car}	u_{bb}	u_{sts}	u_{lts}	U_{MR}
Al	25,43	24,64	27,86	51,37	136,66
As	3,59	0,12	0,19	0,43	7,25
Ca (%)	2,61	0,32	0,48	0,90	5,64
Cd	1,43	0,19	0,25	0,36	3,02
Cr	5,89	1,64	2,56	6,74	18,91
Cu	6,29	0,27	0,24	0,57	12,65
Fe	8,79	9,56	16,82	22,66	62,13
K	8,72	8,18	12,48	19,23	51,71
Mg	19,22	26,00	28,91	50,11	132,55
Mn	3,09	0,34	1,24	0,84	6,90
Na	27,77	38,31	51,94	117,28	273,43
Ni	4,00	0,40	0,69	0,95	8,38
P (%)	1,94	0,09	0,14	0,31	3,94
V	2,78	1,22	2,51	2,65	9,49
Zn	2,74	3,48	3,53	2,98	12,80

Através da Tabela 22, foi possível observar que para um pouco menos da metade dos elementos (sete) em estudo houve maior contribuição para a incerteza da estabilidade a longo prazo (u_{lts}). Isto ocorreu devido ao desvio-padrão da inclinação da curva que é multiplicado pelo número de semanas em que os elementos foram analisados. Quanto mais longo este estudo, maior será o valor a ser multiplicado e, conseqüentemente, maior a incerteza-padrão combinada associada. Foi possível observar também que para os outros sete

elementos analisados a maior contribuição foi obtida através da incerteza da caracterização. Isso ocorreu em função da variabilidade dos métodos analíticos utilizados pelos laboratórios, que podem gerar diferenças entre os resultados (por exemplo, INAA e ICP OES). E isso pode ser observado também através da Tabela 23 que ilustra a porcentagem de contribuição para cada incerteza obtida para o MR de fosfato de rocha.

TABELA 23 - Porcentagem de contribuição de cada incerteza obtida para o MR de fosfato de rocha.

Mensurados	% contribuição	% contribuição	% contribuição	% contribuição
	u_{car}	u_{bb}	u_{sts}	u_{lts}
Al	13,9	13,0	16,6	67,5
As	98,1	0,1	0,3	1,4
Ca	85,7	1,3	2,9	10,2
Cd	89,7	1,6	2,7	5,7
Cr	38,8	3,0	7,3	50,8
Cu	98,9	0,2	0,1	0,8
Fe	8,0	9,5	29,3	53,2
K	11,4	10,0	23,3	55,3
Mg	8,4	15,4	19,0	57,2
Mn	80,2	1,0	12,9	5,9
Na	4,13	7,85	14,43	73,59
Ni	91,1	0,9	2,7	5,1
P	97,0	0,2	0,5	2,5
V	34,3	6,6	28,0	31,2
Zn	18,33	29,57	30,42	21,68

O valor estabelecido para cada analito foi obtido pelos dados do ensaio colaborativo e a incerteza expandida final e a porcentagem foram obtidas utilizando-se a Equação 16. A Tabela 24 mostra os valores de referência para os teores totais determinados por ICP OES e LIBS e a incerteza expandida em porcentagem (U_{MR}) e a Tabela 25 apresentam os valores informativos para os teores totais atribuídos aos elementos determinados no MR de fosfato de rocha por INAA.

TABELA 24 – Valores de referência para os teores totais atribuídos aos mensurados determinados no MR de fosfato de rocha (mg kg^{-1} e %).

Mensurados (mg kg^{-1})	Valor determinado	U_{MR} (%)
Al	2840,43 \pm 136,66	5
As	15,53 \pm 7,25	47
Ca (%)	35,99 \pm 5,64	16
Cd	21,26 \pm 3,02	14
Cr	288,78 \pm 18,91	7
Cu	36,25 \pm 12,65	35
Fe	1708,60 \pm 62,13	4
K	567,87 \pm 51,71	9
Mg	2695,87 \pm 132,55	5
Mn	16,29 \pm 6,90	42
Na	5350,20 \pm 273,43	5
Ni	32,82 \pm 8,38	25
P (%)	14,27 \pm 3,94	28
V	158,14 \pm 9,49	6
Zn	277,91 \pm 12,80	5

Tabela 25– Valores informativos para os teores totais atribuídos aos mensurados determinados no MR de fosfato de rocha (mg kg^{-1}) por INAA, análise por ativação neutrônica instrumental, realizada somente por um laboratório.

Elemento (mg kg^{-1})	Intervalo Informativo	Média
Ba	829 - 900	873
Ce	32,4- 35,00	34
Co	0,43 – 0,54	0,49
Eu	3,01 – 3,12	3,07
Hf	0,58 – 0,75	0,65
Sb	2,11 – 2,47	2,2
Sc	8,32 – 8,55	8,43
Sm	12,4 – 13,2	12,8
Th	3,51 – 3,82	3,61
U	135 - 144	139,3
Yb	14,4 – 14,9	14,68

5.11 Comparação entre os valores atribuídos e os métodos oficiais desenvolvidos pelo MAPA.

Os resultados atribuídos aos teores totais juntamente com suas respectivas incertezas foram comparados com os métodos oficiais de preparo e determinação para Cd, Cr, Cu, Mg, Mn, P e Zn utilizados na rotina. Essas análises foram realizadas em colaboração da Multinacional Yara Brasil Fertilizantes na cidade de Rio Grande, Rio Grande do Sul e os resultados podem ser observados através da Tabela 26.

TABELA 26. Comparação dos entre os valores atribuídos e os métodos oficiais desenvolvidos pelo MAPA.

Mensurados (mg kg ⁻¹)	Método Proposto	Método Oficial
Ca (%)	35,99 ± 5,64	38,00 ± 0,7
Cd	21,26 ± 3,02	21,13 ± 2,08
Cr	288,78 ± 18,91	288,78 ± 5,68
Cu	36,25 ± 12,65	50,00 ± 0,0004
Mg	2695,87 ± 132,55	3100 ± 0,04
Mn	16,29 ± 6,90	31,67 ± 0,0004
P (%)	14,27 ± 3,94	13,47 ± 0,17
Zn	277,91 ± 12,80	280,00 ± 0,008

O teste *t* pareado foi aplicado e observou-se que as concentrações de Ca, Cd, Cr, P e Zn nas amostras de fosfato de rocha são estatisticamente iguais (ao nível de 95 % de confiança), porém o mesmo não foi observado para a determinação de Cu e Mn, provavelmente em razão dos baixos teores encontrados e Mg provavelmente devido as intensas etapas que o método oficial utilizando EDTA exige, podendo haver contaminação durante a análise. As características do procedimento de preparo de amostras relacionadas com a

metodologia proposta são mais vantajosas do ponto de vista analítico, já que emprega ácido diluído para a digestão, faz uso de uma quantidade menor de massa e possibilita a digestão das amostras utilizando um forno de micro-ondas com cavidade ou bloco digestor com tubos de PFA rosqueáveis, que possibilita alta frequência analítica e acarreta em resultados semelhantes aos métodos oficiais e pode ser facilmente implementado em laboratórios de rotina.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Os estudos de homogeneidade, estabilidade a curto prazo, estabilidade a longo prazo e caracterização, juntamente com as incertezas do material de referência de fosfato de rocha, obedeceram aos princípios das normas internacionais, sendo considerados estatisticamente homogêneos e estáveis.

A participação dos laboratórios no ensaio colaborativo foi fundamental para a obtenção dos valores designados para cada analito em estudo.

Pode-se concluir que, apesar da digestão da matriz ser considerada incompleta (não foi usado HF para a digestão dos silicatos), o procedimento desenvolvido utilizando ácido diluído foi adequado e possibilitou a determinação dos analitos com suas respectivas incertezas. A

Através da metodologia proposta, foi possível comparar os resultados obtidos com os métodos oficiais de preparo e determinação de Ca, Cd, Cr, P e Zn utilizados na rotina para que possam ser utilizados como métodos alternativos.

Por fim, esse trabalho possibilitou coordenar um programa interlaboratorial de análises e desenvolver um material de referência de fosfato de rocha para Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, V e Zn que poderá ser utilizado para o controle de resultados analíticos.

Capítulo 2

**Avaliação da aplicabilidade do sistema de
combustão iniciada por radiação micro-ondas no
preparo de amostras de materiais de referência
nacionais**

Introdução

1. INTRODUÇÃO

As técnicas de preparo de amostras vêm evoluindo nos últimos anos, principalmente quando estão relacionadas ao emprego da radiação micro-ondas, devido à eficiência nas decomposições e ao reduzido tempo utilizado para o preparo. Porém, algumas desvantagens são encontradas como o uso de recipientes fechados, emprego de massas pequenas de amostras e de reagentes, mínima diluição da amostras e ainda devem ser seguros e rápidos. [109, 110].

Muitas dessas desvantagens podem ser contornadas com o uso da combustão iniciada por radiação micro-ondas (MIC), procedimento que minimiza as etapas de manipulação da amostra, além de manter as vantagens das altas pressões durante a digestão e ainda por ser um sistema fechado evitando perdas de analitos por volatilização e/ou contaminação. Esse sistema apresenta como vantagens o uso de elevadas massas de amostra e tempo reduzido em relação aos procedimentos convencionais [111]. Devido a essas vantagens, diversos estudos têm sido desenvolvidos para diferentes tipos de amostras utilizando MIC.

Nesse contexto, o objetivo desta etapa da tese foi avaliar a aplicabilidade do sistema de digestão MIC no preparo de amostras de materiais de referência de tecidos vegetais (plantas) e animais (fígado bovino), visando determinação de elementos traço por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).

Objetivos

2. OBJETIVOS

Avaliar e definir as melhores condições de sistema de combustão iniciada por radiação micro-ondas para o preparo de amostras de tecido animal (fígado bovino) e tecido vegetal (plantas) preparados como material de referência nacionais produzidos na Embrapa Pecuária Sudeste.

Revisão Bibliográfica

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Com exceção das técnicas analíticas que permitem a análise direta de sólidos, a maioria das técnicas para a determinação de elementos traço em baixas concentrações requer que as amostras estejam preparadas na forma de uma solução aquosa, onde geralmente é necessária a transformação dos analitos (presentes na matriz) em uma forma inorgânica simples antes de sua quantificação. Porém, essa etapa é considerada a mais crítica da sequência analítica, pois além de ser a que demanda mais tempo, é onde geralmente ocorre a maior parte dos erros [90, 112, 113].

A escolha de um método de preparo de amostra depende de uma variedade de fatores, como por exemplo: a natureza da matriz (orgânica ou inorgânica), do analito e de sua concentração na amostra, bem como a técnica que irá ser utilizada para a sua determinação, com precisão e exatidão desejadas. Além disso, o método deverá ser considerado simples e rápido, utilizando volumes mínimos de reagentes e que exija a mínima manipulação, diminuindo os riscos de perdas de analito e/ou contaminação e ainda propiciando a segurança do operador [109, 114].

Os métodos analíticos frequentemente empregados para o preparo de amostras de materiais biológicos envolvem predominantemente a digestão utilizando ácidos oxidantes (um único ácido oxidante, mistura de ácidos oxidantes ou mistura de ácidos inorgânicos e peróxido de hidrogênio) e aquecimento, principalmente em blocos digestores ou radiação assistida por micro-ondas [90, 112, 115].

Uma das formas mais tradicionais de preparo de amostras é realizada utilizando blocos digestores ou chapas de aquecimento, que promovem o aquecimento da amostra durante a digestão, tanto em meio ácido quanto em meio básico. Porém é uma técnica relativamente lenta e que requer várias horas de aquecimento, utiliza volumes consideráveis de reagentes e podem ocorrer

perdas de elementos voláteis. Devido a essas desvantagens, nos últimos anos o emprego da digestão assistida por radiação micro-ondas vem se estabelecendo como alternativa. Comparada aos sistemas convencionais de digestão o emprego da radiação micro-ondas acelera a etapa de pré-tratamento (menores tempos de digestão), possibilita a digestão de matrizes complexas e reduz o consumo de reagentes e de energia. Além disso, a digestão em sistemas fechados evita a perda de elementos voláteis [90, 112, 116]. Apesar da extensa aplicação, em alguns casos a digestão assistida por micro-ondas pode apresentar resultados insatisfatórios. Como exemplo, à estabilidade relativamente elevada de alguns materiais orgânicos que podem dificultar a decomposição completa da matriz. Em alguns casos não é possível a obtenção de digestão satisfatória mesmo com o emprego de ácidos concentrados e elevação do tempo e da temperatura [114, 117].

Nesse contexto, uma alternativa é o preparo de amostras por combustão, que pode ser realizado em sistemas abertos e fechados e é considerado eficiente para amostras de difícil decomposição, resultando em soluções com o mínimo teor de carbono residual. As técnicas de combustão podem ser consideradas eficientes para a decomposição de materiais orgânicos devido à capacidade de oxidação rápida dessas matrizes e pela possibilidade de utilização de oxigênio com pureza considerada relativamente mais alta quando comparado com os ácidos utilizados em procedimentos convencionais de digestão. Devido à elevada temperatura atingida durante o processo, praticamente todas as matrizes orgânicas podem ser decompostas nessas condições, sendo esperado assim, que ocorram menos problemas relacionados a interferências durante as determinações [110, 114, 118].

O método considerado mais simples para a combustão em sistema aberto é utilizando fornos do tipo mufla. A principal vantagem deste método é a possibilidade de utilização de massas elevadas de amostra, que acaba se tornando útil em alguns casos onde a concentração dos analitos é relativamente

baixa. A principal desvantagem é que, como a decomposição ocorre em sistema aberto e a elevadas temperaturas, há possibilidade de perdas de analito por volatilização [119, 120].

Por outro lado, nos métodos de combustão em sistema fechado a amostra é submetida à combustão e os analitos são absorvidos em uma solução absorvedora, tendo como principais vantagens a minimização dos riscos por contaminação e de perdas de analito por volatilização. Pode ser citada como exemplo de combustão em sistema fechado a bomba de combustão. Nesse sistema a amostra em forma de pastilha é inserida na bomba e, em presença de oxigênio é provocada a ignição da amostra pelo contato direto de dois eletrodos de platina, sendo os analitos absorvidos por uma solução absorvedora apropriada inserida no sistema. Esse método permite o uso de massas elevadas, porém o resfriamento é lento e ainda pode ocorrer contaminação pelo material em que o frasco é constituído (normalmente aço inoxidável). Outro exemplo é o frasco de combustão de Schöniger. A amostra é confinada em um envoltório (normalmente de papel) suspenso no interior do frasco contendo a solução absorvedora adequada. Nesse caso somente massas reduzidas de amostra podem ser utilizadas. Ambos os sistemas não permitem uma etapa de refluxo e somente uma amostra é decomposta a cada ciclo, o que diminui a frequência analítica desses métodos [112, 114, 121, 122].

3.1 Combustão Iniciada por Radiação Micro-Ondas

Uma alternativa que vem sendo muito utilizada para contornar os inconvenientes das técnicas convencionais de combustão e digestão, principalmente visando à redução de elevados volumes de ácidos concentrados, perdas de analito por volatilização e contaminações, é o método de combustão iniciada por radiação micro-ondas, que utiliza frascos e sistemas convencionais de pressurização para injetar uma atmosfera de oxigênio e promover, através da

incidência da radiação micro-ondas, a combustão de amostras envolvidas em um papel contendo gotas de nitrato de amônio. Esse sistema apresenta vantagens, tais como o uso de elevadas massas de amostra, tempo reduzido em relação aos procedimentos convencionais, além da possibilidade do uso de soluções absorvedoras diluídas [111].

A proposta para o desenvolvimento do método por combustão iniciada por radiação micro-ondas foi desenvolvida a partir da adaptação de um forno por radiação micro-ondas com cavidade que utiliza frascos de quartzo (resistente a altas temperaturas e pressão) e um sistema de controle de pressão e temperatura, sem modificações ao sistema original, conforme a Figura 55:

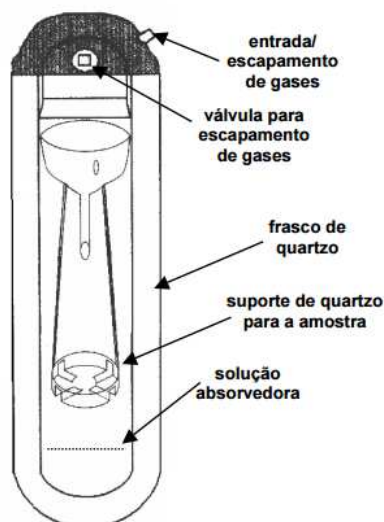


FIGURA 55 – Sistema de decomposição por combustão iniciada por radiação micro-ondas [123].

Para o procedimento de combustão, necessita-se de um dispositivo de quartzo, o qual é inserido no interior do frasco de digestão, sendo utilizado como suporte para as amostras que devem ser preparadas na forma de pastilhas. Esse suporte fica suspenso na parte superior do frasco e possui um dispositivo em forma de funil, que possibilita a lavagem efetiva da base onde a amostra sofre a combustão, auxiliando a limpeza e a transferência dos analitos para a solução absorvedora, inserida no fundo do frasco de quartzo. O dispositivo de quartzo possui ranhuras na sua base, que facilita o contato do oxigênio no

interior do frasco, auxiliando o processo de combustão. O sistema é composto por um frasco de quartzo (diâmetro interno de 22 mm) com capacidade de 80 mL e uma tampa com vedação de PTFE, que possui dispositivo para entrada e saída de gases para aliviar a pressão interna dos frascos antes de abrí-los. No caso dos procedimentos de combustão, a pressurização com oxigênio é feita pela válvula de entrada de gases, regulada pela válvula de escape [111, 114].

Para o preparo de amostras, deve-se pesá-la e colocá-la sobre um pedaço de papel filtro (contendo baixo teor de cinzas), posicionando-a sobre o suporte de quartzo, onde 50 μ L de uma solução de nitrato de amônio, iniciadora do processo de combustão, são gotejadas sobre o papel filtro, onde o sistema é então fechado e pressurizado com oxigênio. É aplicada então, a radiação micro-ondas com uma potência de 1400W para dar início ao processo de combustão atingindo uma elevada temperatura (aproximadamente 1300°C), onde a maior parte da matéria orgânica é destruída e convertida a seus produtos de oxidação [118].

Devido às inúmeras vantagens da combustão iniciada por radiação micro-ondas, desde a primeira proposta desenvolvida por Flores e colaboradores [111], muitos trabalhos vêm sendo propostos empregando diferentes tipos de amostra. Muller e colaboradores [124] em 2013, empregaram a MIC para a determinação de As, Cd e Pb por espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) e Hg por geração de vapor frio por injeção em fluxo acoplado ao ICP-MS (FI-CVG-ICP-MS) em amostras de castanhas. Foram utilizadas massas de até 500 mg e HNO_3 7 mol L^{-1} como solução absorvedora. A exatidão foi avaliada utilizando materiais de referência certificado com concordância de 96% para todos os analitos e os resultados foram comparados utilizando a digestão ácida assistida por radiação micro-ondas no preparo das amostras. O teor de carbono residual obtido foi relativamente baixo (1,5%) quando comparado à digestão convencional (20%), demonstrando a elevada eficiência do método proposto, que permite a

determinação de elementos tóxicos em amostras com elevados teores de gordura. Em outro trabalho, Mesko e colaboradores [125] em 2010, utilizaram MIC em amostras de alimentos para determinação de iodo por ICP-MS. Foram utilizadas massas superiores a 500 mg e investigado o uso de diferentes soluções absorvedoras, tais como H_2O , H_2O_2 , $(NH_4)_2CO_3$ e hidróxido de tetrametilamônio. A exatidão foi avaliada utilizando materiais de referência certificado, sendo obtida concordância de até 97%. Os limites de quantificação encontrados foram de $0,02 \text{ mg g}^{-1}$ e o teor de carbono residual encontrado foi inferior a 1%, o que mostra a eficiência da digestão do método proposto. Flores e colaboradores [126] em 2013, propuseram também uma abordagem eficaz para a digestão de fluoropolímeros por MIC para a determinação de Ag, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg e Mn por ICP-MS e ICP OES. Para a validação do procedimento proposto foi utilizada análise de ativação neutrônica instrumental (INAA) e os resultados foram comparados utilizando extração ácida assistida por radiação micro-ondas em sistemas fechados de alta pressão e obtiveram concordância de 98%. O teor carbono residual foi inferior a 1%, o que mostra a elevada eficiência do método.

O emprego de MIC para a determinação de elementos traço em tecidos animais e vegetais ainda não foi abordado, sendo que, em função do desenvolvimento de materiais de referência, procurou-se observar o comportamento deste tipo de digestão como alternativa a ser aplicada no preparo deste tipo de amostra.

Procedimento Experimental

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Instrumentação

A decomposição das amostras foi realizada empregando-se um forno de micro-ondas Multiwave 3000 (Anton Paar, Graz, Áustria). Para o sistema de combustão iniciada por micro-ondas, foram utilizados quatro frascos de quartzo de 80 mL, temperatura máxima de 280 °C, pressão máxima de 80 bar, com controladores de tempo, temperatura, pressão e potência, juntamente com o dispositivo de quartzo, especialmente desenvolvido para o sistema de combustão, conforme apresentado na Figura 55.

As determinações foram realizadas utilizando um ICP-MS Elan DRC II (PerkinElmer Sciex, Canadá) equipado com um nebulizador concêntrico (Meinhard Associates, Estados Unidos), uma câmara de nebulização ciclônica (Glass Expansion Inc., Austrália). A Tabela 27 apresenta os parâmetros operacionais utilizados nas análises por ICP-MS.

Para o preparo das pastilhas foi utilizada um prensa de aço inox, com um cilindro de 9 mm de diâmetro interno com um fundo que pode ser removido, um pistão que comprime a amostra e ainda auxilia na remoção da mesma.

Também foram utilizados outros equipamentos como: balança digital, com resolução de 0,0001g e capacidade de 210g e um bloco digestor .

TABELA 27 – Parâmetros instrumentais empregados nas análises por ICP-MS.

Parâmetros Instrumentais	ICP-MS
Potência da rádio frequência	1100 W
Vazão do gás de nebulização	0,9 L min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar	1,2 L min ⁻¹
Vazão do gás de resfriamento	15 L min ⁻¹
Nebulizador	Concêntrico
Câmara de nebulização	Ciclônica
m/z por ciclo de leitura	Ni ⁶⁰ , Ni ⁶¹ , Mo ⁹⁸ , Mo ¹⁰⁰ , Hg ²⁰² , Hg ²⁰¹ , Pb ²⁰⁸ , Pb ²⁰⁷ , Co ⁵⁹

4.2 Reagentes e Materiais

Todos reagentes e padrões utilizados foram de grau analítico e as diluições foram realizadas com água destilada-deionizada obtida em sistema de purificação Milli-Q® (18 MΩ cm). HNO₃ e H₂O₂ foram utilizados na digestão das amostras. Soluções estoque dos analitos foram utilizadas para o preparo das soluções analíticas para a calibração do ICP-MS. As soluções de nitrato de amônio 6 mol L⁻¹ foram preparadas a partir da dissolução de NH₄NO₃ PA (Merck, Alemanha).

Toda a vidraria e materiais comuns de laboratório, inclusive os papéis de filtro foram lavados e colocados em banho HNO₃ (10% v v⁻¹) por 48 horas, sendo logo após enxaguados com água deionizada e secos em capela de fluxo laminar.

4.3 Amostras

Foram empregados materiais de referência certificados do National Research Council Canada (NRCC): Tort-3 (Hepatopâncreas de lagosta) e Dolt-5 (Fígado de peixe); e do National Institute of Standards and Technology (NIST):

Apple Leaves 1515 (Folhas de Maçã) para avaliação da exatidão do método proposto e as amostras utilizadas foram preparadas para material de referência nacional pela Embrapa junto ao CRM - Agro - RM-Agro E1001a (forrageira - *Brachiaria brizantha*) e RM-Agro E3001a (fígado bovino).

4.3.1 Determinação do teor de umidade

Três sub-amostras dos materiais (cerca de 0,5 a 1g) foram pesadas em frascos de vidro previamente descontaminados e levados até uma estufa à vácuo e mantidas a uma pressão de 25 mm Hg até a secagem da amostra a uma massa constante (sendo necessários 14 dias). Depois de secas, as amostras foram pesadas novamente para se obter a perda de massa. Na Tabela 28 são apresentados os resultados dos fatores de correção para cada amostra MR para a determinação da massa seca.

TABELA 28 – Resultados dos fatores de correção para as amostras de MRs para determinação da massa seca.

Amostra	Fator de correção
Dolt-5	0,95
Tort-3	0,96
Apple Leaves	0,96
RM-Agro E3001a	0,94
RM-Agro E1001a	0,94

4.4 Procedimentos de Preparo de Amostra

4.4.1 Decomposição por combustão iniciada por radiação micro-ondas

Foram pesadas cerca de 250 mg das amostras, que a seguir foram levadas à prensa para serem transformadas em pastilhas e envolvidas em papel

de filtro previamente descontaminado e colocado no suporte de quartzo. A seguir o papel foi umedecido com 50 μL do iniciador da combustão (NH_4NO_3 6 mol L^{-1}). O frasco contendo 6 mL de solução absorvedora foi fechado e pressurizado com oxigênio por aproximadamente 1 min com pressão inicial de oxigênio de 20 bar. Como soluções absorvedoras foram testadas H_2O e HNO_3 diluído (5, 10, 20, 30 e 50% v v⁻¹). O sistema foi então levado ao forno de micro-ondas, digerido por 90 segundos e, após o resfriamento, quando a temperatura dos frascos era inferior a 60°C, o rotor foi retirado da cavidade do forno de micro-ondas e a pressão interna dos frascos foi aliviada pela abertura da válvula de escape dos gases. O suporte e as paredes internas dos frascos de quartzo foram lavados com água deionizada para assegurar a transferência quantitativa dos analitos e então a solução absorvedora contendo os analitos digeridos foi transferida para frascos de PTFE e o volume aferido a 25 mL com água deionizada.

4.4.2 Decomposição assistida por radiação micro-ondas

Para comparação com o procedimento de combustão iniciada por radiação micro-ondas, as amostras investigadas, mesmo tratando-se de materiais de referência, foram digeridas por digestão assistida por radiação micro-ondas com cavidade. Foram avaliados três procedimentos distintos para a digestão, nos quais foi empregado o mesmo programa de aquecimento e variada à concentração ácida e o volume total de oxidante.

Procedimento 1 (proposto pelo NRC)

Massa de 250 mg das amostras de materiais de referência certificado Tort-3 (Hepatopâncreas de lagosta), Dolt-5 (Fígado de Peixe), Apple Leaves 1515 (Folhas de Maçã), RM-Agro E3001a (fígado bovino) e RM-Agro

E1001a (forrageira - *Brachiaria brizantha*) foram pesadas e transferidas para os frascos de digestão, adicionando-se 6 mL HNO₃ concentrado (14 mol L⁻¹) + 250 µL H₂O₂ (30% m/v). O sistema foi fechado adequadamente e colocado no interior do forno de micro-ondas, sendo submetido ao programa de aquecimento descrito na Tabela 29.

Procedimento 2 – material biológico (valor de referência)

Massa de 250 mg dos materiais de referência RM-Agro E3001a (fígado bovino), Tort-3 (Hepatopâncreas de lagosta) e Dolt-5 (Fígado de Peixe) foram pesadas e transferidas para o frasco de digestão, adicionando-se 6 mL HNO₃ (7 mol L⁻¹) + 2 mL H₂O₂ (30% m/v). O sistema foi fechado adequadamente e colocado no interior do forno de micro-ondas, sendo submetido ao programa de aquecimento descrito na Tabela 29.

Procedimento 3 - material vegetal (valor de referência)

Massa de 250 mg das amostras de referência RM-Agro E1001a (forrageira - *Brachiaria brizantha*), e (Apple Leaves) foram pesadas e transferidas para o frasco de digestão, adicionando-se 2 mL HNO₃ (14 mol L⁻¹) + 6 mL H₂O + 2 mL H₂O₂ (30% m/v). O sistema foi fechado adequadamente e colocado no interior do forno de micro-ondas, sendo submetido ao programa de aquecimento descrito na Tabela 29.

TABELA 29 – Programa de aquecimento do forno de micro-ondas para decomposição das amostras.

Etapa	Potência (W)	Rampa (min)	Tempo (min)
1	1400	5	30
2	0	0	20

Logo após as digestões, todas as amostras foram transferidas para frascos de PTFE e aferidas a 30 mL com água desionizada. Em seguida, foram levadas para um bloco digestor a uma temperatura de 90°C para evaporação até um volume final de 1 mL da solução. Após essa evaporação, foi adicionado 1 mL de HNO₃ (14 mol L⁻¹) e o volume foi novamente aferido a 25 mL com água desionizada.

Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização do Sistema de Combustão Iniciada por Radiação Micro-ondas

Para otimização das melhores condições para o procedimento de combustão iniciada por radiação micro-ondas, foi investigada a influência da concentração do HNO₃ como solução absorvedora. Pode-se observar nas Tabelas 30 e 31, que não ocorreram grandes diferenças nos resultados obtidos para as diferentes concentrações ácidas utilizadas, em relação aos valores certificados da amostra NIST e Tort-3. Para a amostra de Apple Leaves ocorreu grande variação na recuperação, sendo que para Cu pode ter ocorrido uma interferência ⁴⁰Ar²³Na⁺. Para se evitar hidrólise dos analitos, optou-se pela concentração ácida de 10% nos experimentos posteriores.

TABELA 30 – Avaliação do sistema de combustão iniciada por radiação micro-ondas para o material de referência NRC Tort-3 (Hepatopâncreas de lagosta).

Elemento (Unidade)	Valor Certificado	H ₂ O	HNO ₃ (v v ⁻¹)				
			5%	10%	20%	30%	50%
As (mg kg ⁻¹)	59,5 ± 3,8	55,4 ± 1,2	55,1 ± 1,1	53,9 ± 2,5	53,8 ± 2,0	49,9 ± 2,0	51,5 ± 1,3
Cd (mg kg ⁻¹)	42,3 ± 1,8	36,8 ± 1,2	35,5 ± 0,1	37,7 ± 2,8	38,2 ± 1,1	37,3 ± 0,9	38,1 ± 1,3
Cu (mg kg ⁻¹)	497 ± 22	312 ± 6	305 ± 6	256 ± 16	244 ± 7	291 ± 11	303 ± 17
Pb (mg kg ⁻¹)	0,225 ± 0,018	0,15 ± 0,04	0,12 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,16 ± 0,007	0,17 ± 0,006	0,18 ± 0,04

TABELA 31 – Otimização do sistema de combustão iniciada por radiação micro-ondas para o material de referência NIST Apple Leaves (Folhas de Maçã)

Elemento (Unidade)	Valor Certificado	H ₂ O	HNO ₃ (v v ⁻¹)				
			5%	10%	20%	30%	50%
As (mg kg ⁻¹)	0,038 ± 0,007	0,030±0,0004	-	0,035± 0,01	0,05±0,0002	0,055±0,004	0,06 ± 0,002
Cd (mg kg ⁻¹)	0,013 ± 0,002	0,015 ± 0,006	0,011±0,002	0,013±,002	0,016±0,001	0,018±0,006	0,013±0,001
Cu (mg kg ⁻¹)	5,64 ± 0,24	3,21 ± 0,58	4,35 ± 0,69	4,12 ± 0,46	4,15 ± 0,64	4,13 ± 0,17	5,18 ± 1,16
Pb (mg kg ⁻¹)	0,470 ± 0,024	0,38 ± 0,02	0,36 ± 0,01	0,38 ± 0,009	0,39 ± 0,01	0,40 ± 0,03	0,39 ± 0,001

5.2 Comparações de procedimentos de decomposição assistida por radiação micro-ondas

Para avaliação do procedimento proposto, fez-se uma comparação dos resultados obtidos para digestão assistida por radiação micro-ondas utilizando o procedimento proposto pelo NRC. Na Tabela 32 são apresentados os resultados, determinados por ICP-MS utilizando o procedimento 1 proposto pelo NRC e digestão assistida por radiação micro-ondas para os materiais de referência certificado Tort-3 e Dolt-5.

TABELA 32 – Resultados da comparação dos métodos utilizados pelo NRC utilizando digestão assistida por radiação micro-ondas para Tort-3 e Dolt-5 e ICP-MS.

Elemento	Valor Certificado (mg kg ⁻¹)	Procedimento NRC (mg kg ⁻¹)	Recuperação (%)
As	¹ 34,6 ± 2,4	¹ 27,77 ± 1,47	¹ 80
	² 59,5 ± 3,8	² 55,1 ± 2,6	² 93
Cd	¹ 14,5 ± 0,6	¹ 14,16 ± 0,84	¹ 98
	² 42,3 ± 1,8	² 41,5 ± 0,07	² 98
Cu	¹ 35,0 ± 2,4	¹ 36,26 ± 0,65	¹ 104
	² 497 ± 22	² 529 ± 18	² 106
Pb	¹ 0,162 ± 0,032	¹ 0,146 ± 0,006	¹ 90
	² 0,225 ± 0,018	² 0,193 ± 0,036	² 86

¹Dolt-5 ²Tort-3

Através da Tabela 32, foi possível observar que os valores determinados para As, Cd, Cu e Pb em amostras de materiais de referência certificados são concordantes e possuem boas recuperações para os materiais de referência certificado utilizados para avaliação do procedimento de preparo de amostras.

A Tabela 33 apresenta os resultados determinados por ICP-MS utilizando o procedimento 1 proposto pelo NRC e digestão assistida por radiação micro-ondas para a amostra de material de referência certificado de Apple Leaves.

TABELA 33 – Resultados das determinações utilizando o método proposto pelo NRC utilizando digestão assistida por radiação micro-ondas para Apple Leaves.

Elemento	Material certificado (mg kg⁻¹)	Procedimento NRC (mg kg⁻¹)	Recuperação (%)
As	0,038 ± 0,007	0,069 ± 0,004	182
Cd	0,013 ± 0,002	0,013 ± 0,002	100
Pb	0,470 ± 0,010	0,421 ± 0,024	90

Na Tabela 33 estão expressos os valores determinados para As, Cd e Pb nas amostras de material de referência certificado Apple Leaves, e de acordo com os resultados obtidos, pode-se afirmar que os procedimentos mostraram os valores concordantes apenas para Cd e Pb. As recuperações para As e Cu não foram concordantes, e acredita-se que para este tipo de matriz, seria necessária a utilização de estratégias analíticas para avaliar uma possível interferência espectral, isso ocorre quando um determinado íon possui a mesma massa do analito, como no caso do $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ para As e $^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}^+$ para Cu.

5.3 Aplicações do método proposto utilizando o sistema de combustão iniciada por radiação micro-ondas e dos métodos comparativos nas amostras de materiais de referência produzidas na Embrapa

Posteriormente, o método de decomposição, utilizando a combustão iniciada por radiação micro-ondas proposta neste estudo foi aplicado nas amostras de materiais de referência de fígado bovino e forrageira produzidos na Embrapa Pecuária Sudeste, como podem ser observados nas Tabelas 34 e 35. A concentração ácida da solução absorvedora utilizada, com base nas discussões iniciais, foi fixada em HNO₃ 10%.

TABELA 34 – Aplicação do método proposto e dos métodos comparativos na amostra de RM-Agro E3001a fígado bovino por ICP-MS

Elemento (mg kg ⁻¹)	MIC	Digestão assistida por MW	Valor de referência
As	0,049 ± 0,001	0,051 ± 0,001	-
Cd	0,075 ± 0,007	0,086 ± 0,062	0,075 ± 0,008
Cu	215,16 ± 3,73	250,8 ± 13,6	232,79 ± 5,73
Pb	0,062 ± 0,005	0,068 ± 0,0087	0,080 ± 0,008

Os resultados mostrados na Tabela 34, demonstram que para As, Cd e Pb foram concordantes (teste *t* – *student* em um nível de confiança de 95%).

Um comportamento semelhante acontece nas amostras de forrageira, onde As, Cu e Pb tiveram resultados concordantes (teste *t* – *student* em um nível de confiança de 95%) e para Cd considerados estatisticamente diferentes, porém em plantas isso se deve a presença de silicatos na sua matriz, que pode interferir nos resultados das análises.

TABELA 35 - Aplicação do método proposto e dos métodos comparativos na amostra CRM - Agro E1001a. As determinações foram feitas por ICP-MS.

Elemento (mg kg ⁻¹)	MIC	Digestão assistida por MW	Valor de referência
As	1,33 ± 0,015	1,42 ± 0,084	1,69 ± 0,70
Cd	15,25 ± 0,19	18,28 ± 0,21	19,9 ± 5,1
Cu	3,19 ± 0,18	3,41 ± 0,27	4,0 ± 0,7
Pb	4,26 ± 0,13	5,39 ± 0,29	4,0 ± 1,8

As tabelas 36 e 37 apresentam os limites de detecção e limites de quantificação, bem como a faixa linear, para a determinação de As, Cd, Cu e Pb e posterior determinação por ICP-MS, utilizando o sistema de combustão iniciada por radiação micro-ondas e digestão assistida por radiação micro-ondas, respectivamente. A metodologia desenvolvida apresentou boa linearidade na faixa linear estudada, com valor de $R^2 > 0,99$. Os limites de detecção e quantificação foram calculados de acordo com a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), utilizando as Equações 23 e 24:

$$LD = (3 \times SD_{\text{branco}})/m \quad \text{Equação 23}$$

$$LQ = (10 \times SD_{\text{branco}})/m \quad \text{Equação 24}$$

Onde SD_{branco} é o desvio padrão de 10 medidas do branco analítico e m é o coeficiente angular da curva analítica de calibração

TABELA 36 - Limites de detecção, quantificação, faixa linear para determinação dos elementos As, Cd, Cu e Pb utilizando o sistema de combustão iniciada por radiação micro-ondas e posterior determinação por ICP MS.

Elemento	Faixa linear ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
As	1-15	0,035	0,12
Cd	1-15	0,014	0,047
Cu	1-15	0,041	0,13
Pb	1-15	0,006	0,020

TABELA 37 - Limites de detecção, quantificação, faixa linear para determinação dos elementos As, Cd, Cu e Pb utilizando o sistema de digestão assistida por radiação micro-ondas e posterior determinação por ICP MS.

Elemento	Faixa linear ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
As	1-15	0,007	0,023
Cd	1-15	0,002	0,008
Cu	1-15	0,01	0,03
Pb	1-15	0,005	0,016

Ao avaliar os limites de detecção é possível perceber que não há diferenças significativas na ordem de grandeza, tanto para o sistema de combustão iniciada por radiação micro-ondas como para a digestão assistida por radiação micro-ondas convencional, no entanto quando se utiliza a digestão assistida por radiação micro-ondas convencional é necessária a diluição das soluções digeridas em até 1000 vezes devido a acidez máxima que pode ser introduzida no ICP-MS. A vantagem de se obter um baixo LQ pode ser perdida com esta alta diluição, o que não ocorre quando se utiliza a digestão por MIC. Além disso, a digestão empregando MIC tem como principal vantagem a separação completa do analito da matriz, minimizando os riscos de interferência dos demais componentes da matriz no plasma. E observou-se que ambos os

procedimentos de preparo de amostras podem ser empregados para a determinação de As, Cd, Cu e Pb em amostras de fígado bovino e de forrageira.

A metodologia proposta garante que ela seja facilmente implementada em laboratórios de rotina, já que o sistema de combustão iniciada por radiação micro-ondas pode ser facilmente adaptado em um micro-ondas que utiliza a digestão assistida por radiação micro-ondas e ainda é considerada rápida, segura e eficiente para a decomposição desse tipo de matriz.

Conclusões

6. CONCLUSÃO

O consumo de ácido no processo de oxidação foi muito pequeno, pois a amostra é decomposta com a etapa de combustão, permitindo a utilização de ácidos diluídos e diminuindo os riscos de contaminação, os custos e os resíduos gerados.

Comparativamente aos métodos de decomposição já validados, o sistema MIC possibilita o uso de massas maiores com menor possibilidade de contaminação das amostras. Pode-se destacar que o sistema é de fácil e rápida operação quando comparado ao sistema de digestão assistida por radiação micro-ondas, sendo adequado para a decomposição de matrizes biológicas e posterior detecção por ICP-MS.

Referências Bibliográficas gerais

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, <http://www.agricultura.gov.br/>, acessado em outubro de 2015.
- [2] Conferência das Nações Unidas para o Comércio e o Desenvolvimento (UNCTAD), United Nations Conference on trade and development, <http://www.unctad.org>, acessado em outubro de 2015.
- [3] <http://www.portaldoagronegocio.com.br/index.php>, acessado em outubro de 2015.
- [4] Eurachem/CITAC Guide: Determinando a Incerteza na Medição Analítica, 2ªEd. ABNT, INMETRO, SBM – Brasil, 2002.
- [5] Santana, M. A. A. “Requisitos técnicos para competência de laboratórios de calibração e ensaios aplicados em P&D”, ENQUALAB, São Paulo, 2003.
- [6] VIM, Termos, Vocabulário Internacional de Metrologia: Conceitos Fundamentais e Gerais e Associados. p. 94, 2012.
- [7] ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas. Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência. 1 ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2004.
- [8] Herzig, R.; Rehnert, A.; Korhammer, S.; Kumpulainen, J.; Schramel, P.; Muntau, H.; Linsinger, T.; Quevauviller, P. Certification of a new cabbage reference material for the quality control of trace-element determinations with some considerations on moisture, Trends in Analytical Chemistry, 21-11, 2002.
- [9] De Bièvre, P., Lamberty, A. An enriched ${}^6\text{Li}$ isotopic reference material, International Journal of Mass Spectrometry and ion Processes, 83, p. 135-145, 1988.
- [10] Caroli, S.; Spagnoli, M.; Forte, G.; Alessandrelli, M.; Cresti, R.; D’Ilio, S.; Pauwels, J.; Kramer, G. N.; Z’aray, Gy. Trace elements in

bovine muscle: an ongoing project for a new certified reference material. *Microchemical Journal*, 67, 235-243, 2000.

[11] Zschunke, A.: The role of reference materials in analytical chemistry, *Accreditation and Quality Assurance*, 8, 247-251, 2003.

[12] Taverniers, I.; De Loose, M. Bockstaele, E.V. Trends in quality in the analytical laboratory. I. Traceability and measurement uncertainty of analytical results. *Trends in Analytical Chemistry*, 23-7, 2004.

[13] Cardoso, M. H. W. M.; Nóbrega, A.W.; Vital, H. C.; Abrantes, S. Preparação de um material de referência certificado para controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros: estudo da homogeneidade. *Ciência e tecnologia de alimentos*, 30: 2, 429-238, 2010.

[14] Richter, W. Comparability and recognition of chemical measurement results – an international goal. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 365, p. 569–573, 1999.

[15] Kupiec, K.; Konieczka, P.; Namiesnik, J. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 39 - 4, 311-322, 2009.

[16] Caroli, S. Certified reference materials: use, manufacture and certification. *Analytica Chimica Acta*, 283, 573–582, 1993.

[17] De Bièvre, P. A. Metrological traceability chain prevents circular reasoning in measurement design. *Accreditation and Quality Assurance*, 15, 491–492, 2010.

[18] Valcarcel, M. Analytical information needs in the XXI century. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 367, p. 677-678. 2000.

[19] ABNT ISO GUIA 30. Termos e definições relacionados com materiais de referência. ABNT, p. 7, 2000.

[20] ABNT ISO GUIA 34. Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência. ABNT, p. 25, 2004.

- [21] Sutarno, R.; Steger, H. F. The use of certified reference materials in the verification of analytical data and methods. *Talanta*, 32 - 6, 439–445, 1985.
- [22] ABNT ISO GUIA 31. Materiais de referência - Conteúdo de certificados e rótulos. ABNT, p. 8, 2004.
- [23] ABNT ISO GUIA 32. Calibração em química analítica e uso de materiais de referência certificados. ABNT, p. 7, 2000.
- [24] ABNT ISO GUIA 33: 2002. Utilização de materiais de referência certificados. 2ª ed. Rio de Janeiro, RJ: ABNT, 28p.
- [25] ABNT ISO GUIA 35: 2006. Materiais de referência – Princípios gerais e estatísticos para certificação, 1ª ed., 73p, 2012.
- [26] ABNT. ISO/IEC 17025 - Requisitos Gerais para Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração, Rio de Janeiro, ABNT: 2005.
- [27] Linsinger, T. P. J.; Pauwels, J.; Van Der Veem, A. H.; Schimmel, H.; Lambert, A. Homogeneity and stability of reference materials. *Accreditation and Quality Assurance*, 6, p. 20–25, 2001.
- [28] Scharf, H.; Becker, R.; Bremser, W.; Buge, H.G.; Luck, D. Certification of the mass fractions of trace elements and pentachlorophenol in an impregnated Wood reference material. *Accreditation and Quality Assurance*, 15, p. 613–619, 2010.
- [29] Moreira, E.G.; Vasconcellos, M. B. A.; et al. Perna perna mussel reference material: short term stability assessment. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 282, p. 957–962, 2009.
- [30] Veen, A. M. H. V.; Linsinger, T. P. J.; Schimmel, H.; Lambert, A.; Pauwels, J. Uncertainty calculations in the certification of reference materials 4 . Characterization and certification. *Accreditation and Quality Assurance*, 6, p. 290–294, 2001.

- [31] Pauwels, J.; Lambert, A. CRMs for the 21st century: new demands and challenges. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 370, 2-3, p. 111–4, 2001.
- [32] Stoeppler, M.; Wayne, R. W.; Peter, J. J.; Reference Materials for Chemical Analysis; Certification, Availability and Proper Usage; Wiley-Vch, 2001.
- [33] Rasberry, S.D. Standard reference materials – the first century. NIST Special Publication 260-150, p. 1–29, 2002.
- [34] Gills, T. E.; Wolf, W. R.; et al. Eighth international symposium on biological and environmental reference materials (BERM-8), Bethesda, MD , september 17 – 22 , 2000. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 370, p. 109–110, 2001.
- [35] COMAR. Banco Internacional de Dados de Materiais de Referência Certificados. Disponível em: <http://www.comar.bam.de/en/examples/index.htm>. Acessado em outubro de 2015.
- [36] Chew, G.; Sim, L.P.; Ng, S.Y.; Ding, Y.; Shin, R.Y.C.; Lee, T.K. Development of a mushroom powder Certified Reference Material for calcium, arsenic, cadmium and lead measurements, *Food Chemistry* 190, 293–299, 2016.
- [37] Oster, C.; Labarraque, G.; Fisicaro, P. Certification of a reference material of metal content in atmospheric particles deposited on filters, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407:3035–3043, 2015.
- [38] Ulrich, J. C.; Sarkis, J. E. S. Preparation and certification of a reference material for the total mercury and methylmercury mass fractions in fish, *Accreditation and Quality Assurance*, 18:511–516, 2013.
- [39] Caroli, S.; Forte, G.; Alessandrelli, M.; Cresti, R.; Spagnoli, M.; D'Illo, S.; Pauwels, J.; Kramer, G.N. et al. A pilot study for the production of a

certified reference material for trace elements in honey. *Microchemical Journal*, 67, p. 227–233, 2000.

[40] Sturgeon, R.E.; Willie, S.N.; Yang, L.; Greenberg, R.; Spatz, R.O.; Chen, Z.; Scriver, C.; Clancy, V.; Lam, J.W.; Thorrold, S. Certification of a fish otolith reference material in support of quality assurance for trace element analysis, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 20, 1067 – 1071, 2005.

[41] Wang, H.; Ma, K.; Zhang, W.; Huang, T.; Dai, X.; Li, J.; Sun, G.; Li, H. Production of three certified reference materials for water content based on mixed solutions of butanol, xylene and propylene carbonate, *Accreditation and Quality Assurance*, 17,-6, 589-596, 2012.

[42] INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, <http://www.inmetro.gov.br>, acessado em outubro de 2015.

[43] IPT. Instituto de Pesquisas Tecnológicas, <http://www.ipt.br/solucoes/54.htm>, acessado em outubro de 2015.

[44] CETEM. Centro de Tecnologia Mineral. Disponível em: <http://www.cetem.gov.br/pdi/programas-e-projetos/em-curso/pmrc>, acessado em outubro de 2015.

[45] INCQS. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, disponível em: http://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&vie=article&id=120&Itemid=100, acessado em outubro de 2015.

[46] Chui, Q.S.H.; Iamashita, C.O.; et al. Estudo da homogeneidade de lote de material silício metálico candidato a material de referência. *Química Nova*, v. 28, n. 3, p. 497–501, 2005.

[47] Bispo, J.M.D.A. Certificação de Material de Referência de Minério de Ferro Utilizando Programa Interlaboratorial. São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Química - USP. Dissertação de Mestrado, 2007.123p.

- [48] Souza, V.; Rodrigues, J.M.; et al. Evaluation of the stability of ethanol in water certified reference material: measurement uncertainty under transport and storage conditions. *Accreditation and Quality Assurance*, 13, p. 717–721, 2008.
- [49] CETEM - Centro de Tecnologia Mineral, Certificado de análise, BXPA-1, bauxita (Juriti- Pará, Brasil), 2007
- [50] CETEM - Centro de Tecnologia Mineral, Certificado de análise, CBPA-1, minérios de sulfeto de cobre (Mina do Sossego, Pará), 2007.
- [51] CETEM - Centro de Tecnologia Mineral, Certificado de análise, CBPA-2, concentrado de sulfetos de cobre (Mina do Sossego, Pará), 2007.
- [52] Moreira, E. G., Vasconcellos, M. B. A., Catharino, M. G. M., Maihara, V. A.; Saiki, M. Application of INAA complementary gamma ray photopeaks to the homogeneity study of a mussel candidate reference material. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 283:819–822, 2010.
- [53] Moreira, E. G., Vasconcellos, M. B. A., Catharino, M. G. M., Maihara, V. A.; Saiki, M. “Long-term stability study on a Perna perna mussel candidate reference material” *Accreditation and Quality Assurance*, 15:233–238, 2010.
- [54] Fraga, I.C.S.; Ribeiro, C.M.; Sobral, S.P.; Dias, J.C.; Gonçalves, M.A.; Borges, P.P.; Gonzaga, F.B. Certified reference material of bioethanol for metrological traceability in electrochemical parameters analyses. *Talanta*, 99, p.99–103, 2012.
- [55] 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*, 16: 453–458 2011.

- [56] Chelegão, R. Produção de material de referência de peixe visando à determinação de Hg e MHg⁺ Universidade Federal do ABC, Santo André-SP, 2012. Tese de doutorado, 103 p.
- [57] Brandão, M.L.L.; Costa, J. de C.B.; Farias, F.M.; Rosas, C. O.; Bricio, S.M.L.; Nascimento, J.S.; Cardarelli-Leite, P. Desenvolvimento de material de referência para microbiologia de alimentos contendo estafilococos coagulase positiva em matriz queijo. *Brazilian Journal of Food Technology*, 16-1, p. 73–79, 2013.
- [58] Namiesnik, J.; Zygmunt, B. Role of reference materials in analysis of environmental pollutants. *Science of the Total Environment*, v. 228, p. 243–257, 1999.
- [59] MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/internacional/indicadores-estatisticas/balanca-comercial>, acessado em outubro de 2015.
- [60] Silva, P. H. T. Avaliação de parâmetros e produção de materiais de referência de mistura mineral para nutrientes e contaminantes inorgânicos, Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 2011. Dissertação de mestrado, 148p.
- [61] 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.
- [62] Redes Nacionais de Pesquisa em Agrobiodiversidade e Sustentabilidade Agropecuária “REPENSA - Brasil”, Rede Agro - Produção de materiais de referência e organização de ensaios de proficiência para contaminantes inorgânicos e nutrientes, São Carlos, 2010.
- [63] Bossu, C. M. Produção e Caracterização de Material de Referência de Forrageira para Nutrientes e Contaminantes Inorgânicos. São

Carlos, Programa de Pós Graduação em Química - UFSCar. Tese de Doutorado, 2013.119p.

[64] Verhalen, T. R. Preparo e Caracterização de material de referência de solo para nutrientes e contaminantes inorgânicos. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar. Dissertação de Mestrado, 2014, 123p.

[65] Elpo, E. R. S., Freitas, R. J. S. Avaliação dos teores de cádmio, chumbo, cromo e níquel nos alimentos da cesta básica. Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, Curitiba, v. 13, n. 2, p. 71-84, 1995.

[66] Senesi, G.S., Baldassarre, G., Senesi, N., Radina, B. Trace element inputs into soils by anthropogenic activities and implications for human health, *Chemosphere*, v. 39, p. 343-377, 1999.

[67] Lopes, A.S., Guilherme, L.R.G. Uso eficiente de fertilizantes e corretivos agrícolas: aspectos agronômicos, 3ª ed. ANDA São Paulo, 2000.

[68] Andrade, J.E.P; Pan, S.S.K; Dantas, C.A.D; Melo, K.C.A. A indústria de Fertilizantes, p.95-109.

[69] Isherwood, K.F. Mineral fertilizer use and the environment by international fertilizer industry association, Revised Edition, Paris, 2000.

[70] Lopes, A.S.; Guilherme, L.R.G.; Fertilidade do solo e produtividade agrícola. In: Novais, R.F.; Alvarez, V.H.; Barros, N.F.; Fontes, R.L.F.; Cantarutti, R.V.; Neves, J.C.L. (Ed.). Fertilidade do solo, Viçosa: SBCS, 2007, p.1-64.

[71] Javied, S., Mehmood, T., Chaudhry, M.M., Tufail, M., Irfan, N. Heavy metal pollution from phosphate rock used for the production of fertilizer in Pakistan, *Microchemical Journal*, v. 91, 94–99, 2009.

[72] Borges, A.R., Becker, E. M., Lequeux, C., Vale, M.G.R., Ferreira, S.L.C., Welz, B. Method development for the determination of cadmium in fertilizer samples using high-resolution continuum source graphite furnace

atomic absorption spectrometry and slurry sampling, *Spectrochimica Acta Part B* 66 , 529–535, 2011.

[73] Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA N° 24, de 20 de junho de 2007. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 21 de junho de 2007. Seção 1, p. 23.

[74] Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA N° 27, de 05 de junho de 2006. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 09 de junho de 2006. Seção 1, p. 15-16.

[75] Domingues, T.C.G. Teor de metais pesados em solo contaminado com resíduo de sucata metálica em função da sua adifcação, Instituto Agrônômico de Piracicaba, 2009.

[76] Saueia, C.H. R.; Mazzill, B.P. Distribution of natural radionuclides in the production and use of phosphate fertilizers in Brazil, *Journal of Environmental Radioactivity*, 89-3, p.229-239, 2006.

[77] Albuquerque, G.A.S.C. Produção de fosfato no Brasil: uma apreciação histórica dos condicionantes envolvidos, CETEM/CNPq Série Estudos e Documentos, 31, p.26, 1996.

[78] DNPM, Anuário Mineral Brasileiro, Balanço Mineral Brasileiro. Departamento Nacional de Produção Mineral, Ministério de Minas e Energia, Brasília, DF, 2008.

[79] Serrini, G.; Muntau, H.; Colinet, E.; Griepink, B. Certification of the Contents of AS, B, Cd, Cr, Co, Cu, Mn, Hg, Ni, Ti, V and Zn in a Natural Moroccan Phosphate Rock, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 315, p. 691-695, 1983.

[80] http://www.ipt.br/materiais_ref.php?m_tp=2&m_fm=27&familia=27, acessado em novembro de 2015.

[81] Wieteska, E.; Zióek, A.; Drzewinsk, A. “Extraction as a method for preparation of vegetable in samples for the determination of trace metals by atomic absorption spectrometry”. *Analytica Chimica Acta*, 330: 251, 1996.

- [82] Raven, K. P.; Loeppert, R.H. "Trace element composition of fertilizers and soil amendments". *Journal of Environmental Quality*, 26: 551 1997.
- [83] Raven, K. P.; Reynold, J. W. & Loeppert, R.H "Trace element analyses of fertilizers and soil amendments by axial-view inductively-coupled plasma atomic emission spectrophotometry". *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 28: 237, 1997.
- [84] Kane, P.F.; Hall, W. L. "Determination of arsenic, cadmium, cobalt, chromium, lead, molybdenum, nickel, and selenium in fertilizers by microwave digestion and inductively coupled plasma-optical emission spectrometry detection: collaborative study". *Journal of AOAC International*, 89, 6: 1447, 2006.
- [85] Maroulis, M.; Economou, A.; Voulgaropoulos, A. "Determination of Cd and Pb in Phosphorites and Phosphate Fertilizers by Means of a Portable Voltammetric Analyzer Based on "Virtual Instrumentation"". *Electroanalysis*, 19-20: 2149, 2007.
- [86] Macedo, S. M.; Jesus, R. M.; Garcia, K. S.; Hatje, V.; Queiroz, A. F. S.; Ferreira, S. L. C. "Determination of total arsenic and arsenic (III) in phosphate fertilizers and phosphate rocks by HG-AAS after multivariate optimization based on Box-Behnken design". *Talanta*, 80: 974, 2009.
- [87] Soylak, M.; Akkaya, Y.; Elci, L. "Flame Atomic Absorption Spectrometric Determination of Cu(II), Co(II), Cd(II), Fe(III) and Mn(II) in Ammonium Salts and Industrial Fertilizers after Pre-concentration/Separation on Diaion HP-20". *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 82-4, 197, 2002.
- [88] Silva, F.V.; Trevizan, L.C.; Silva, S.S; Nogueira, A.R.A., Nóbrega, J.A. Evaluation of ICP OES with axially and radially viewed configurations. *Spectrochimica Acta Part B*, v 57, p.1905-1913, 2002.

- [89] Lajunen, L.H.J.; Perämäki, P. Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission. University of Oulu, Finland: The Royal Society of Chemistry, 2004.
- [90] Skoog, D.A.; West, D.M.; Holler, F.J. Stanley, R.C. Fundamentos da Química Analítica. São Paulo, Ed. Thomson, 2007, 1124 p.
- [91] Souza, S.O.; Costa, S.S.L.; Santos, D.M.; Pinto, J.S.; Garcia, C.A.B.; Alves, J.P.H.; Araujo, R.G.O. Simultaneous determination of macronutrients, micronutrients and trace elements in mineral fertilizers by inductively coupled plasma optical emission spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B* 96, 1–7, 2014.
- [92] Schawlow, A.L.; Townes, C.H. Infrared and Optical Masers”. *Physical Review Letters*, 112,6: 1940, 1958.
- [93] Maiman, T. H., “Optical and Microwave-Optical Experiments in Ruby, *Physical Review Letters*, 4,11: 564, 1960.
- [94] Fortes, F. J.; Moros, J.; Lucena, P.; Cabalín, L. M.; Laserna, J.J. “Laser-Induced Breakdown Spectroscopy”. *Analytical Chemistry*, 85, 2: 640,2012.
- [95] Gaudiuso, R.; Dell’aglio, M.; Pascale, O. D.; Senesi, G. S.; Giacomo A. D. “Laser Induced Breakdown Spectroscopy for Elemental Analysis in Environmental, Cultural Heritage and Space Applications: A Review of Methods and Results”. *Sensors*, 10,8: 7434, 2010.
- [96] Hahn, D. W.; Omenetto, N. “Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS), Part II: Review of Instrumental and Methodological Approaches to Material Analysis and Applications to Different Fields”. *Applied Spectroscopy*, 66,4: 347, 2012.
- [97] Nunes, L.C.; Carvalho, G.G.A.; Jr, D.S.; Krug, F.J. Determination of Cd, Cr and Pb in phosphate fertilizers by laser-induced breakdown spectroscopy, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 97, 42-48, 2014.

- [98] Marangoni, B.S.; Silva, K.S.G.; Nicolodelli, G.; Senesi, G.S.; Cabral, J.S.; Villas-Boas, P.R.; Silva, C.S.; Teixeira, P.C; Nogueira, A.R.A.; Benites, V.M.; Milori, D.M.B.P. Phosphorus quantification in fertilizers using laser induced breakdown spectroscopy (LIBS): a methodology of analysis to correct physical matrix effects, *Analytical Methods*, 8, 78-82, 2016.
- [99] Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 28, de 27 de julho de 2007. Anexo da IN. Diário Oficial da União de 31 de julho de 2007, Seção 1, Decreto 4.954 de 14.01.2004 e atualizações do Decreto nº 8.059, de 26 de julho de 2013.
- [100] Nogueira, A.R.A; Souza, G.B. Manual de laboratório: Solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos, São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005.
- [101] Araújo, G.C.L.; Gonzalez, M. H.; Ferreira, A.G.; Nogueira, A.R.A; Nóbrega, J.A.; Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials. *Spectrochimica Acta Part B* 57, 2121–2132, 2002.
- [102] Galuzka, A.; Migaszewski, Z.; Namiesnik, J. “The 12 principles of green analytical chemistry and the significance mnemonic of green analytical practices”. *Trends in Analytical Chemistry*, 50: 78, 2013.
- [103] Rocha, D. L.; Batista, A. D.; Rocha, F. R. P.; Donati, G. L.; Nóbrega, J. A. “Greening sample preparation in inorganic analysis”. *Trends in Analytical Chemistry*, 45: 79, 2013.
- [104] Thomsen, V., Roberts, G.; Burgess, K. “The concept of background equivalent concentration in spectrochemistry”. *Spectroscopy Letters.*, 15: 33, 2000.
- [105] Grubbs, F.E. Procedures for Detecting Outlying Observations in Sample. *Technometrics*, v.11, p.1-21, 1969.

- [106] Souza, G.B. de; Nogueira, A.R.A.; et al. Proficiency testing of animal nutrition laboratories. *Accreditation and Quality Assurance*, v. 14, p. 455–460, 2009.
- [107] Hompson, M.; Ellison, S.L.R.; et al. The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories. *Pure and Applied Chemistry*, v. 78, n. 1, p. 145–196, 2006.
- [108] Tavarniers, I.; Loose, M. de; et al. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 23, n. 8, p. 535 – 552, 2004.
- [109] Arruda, M.A.Z.; Santelli, R.E. Mecanização no preparo de amostras por microondas: o estado da arte, *Química Nova*, 20, 638-643, 1997.
- [110] Mesko, M.F., Moraes, D.P., Barin, J.S., Dressler, V.L., Knapp, G., Flores, E.M.M., Digestion of biological materials using the microwave-assisted sample combustion technique, *Microchemical Journal*, 82, p.183-188, 2006.
- [111] Flores, E.M.M., Barin, J.S., Paniz, J.N.G, Medeiros, J.A. Knapp, G. Microwave –assisted sample combustion: a technique for sample preparation in trace element determination, *Analytical Chemistry*, 76, p. 3526-3529, 2004.
- [112] Krug, F. J. Métodos de Preparo de Amostras: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. Piracicaba, 2008.
- [113] Sneddon, J., Hardaway, C., Bobbadi, K.K., Reddy, A.K., Sample preparation of solid samples for metal determination by atomic spectrometry – an overview and select recent applications, *Applied Spectroscopy Reviews*, 41, p. 1-14, 2006.
- [114] Flores, E.M.M., Barin, J.S., Mesko, M.F., Knapp, G., Sample preparation techniques based on combustion reactions in closed vessels – A

brief overview and recent application, *Spectrochimica Acta Part B*, 62, p. 1051-1064, 2007.

[115] Silva, C.S., Nunes, A.M., Oreste, E.Q., Acunha, T.S., Vieira, M.A., Ribeiro, A.S., Evaluation of sample preparation methods based on alkaline and acid solubilization for the determination of Na and K in meat samples by atomic spectrometric techniques, *Journal of Brazilian Chemical Society*, 23- 9, p.1623-1629, 2012.

[116] Erickson, B., Standardizing the world with microwaves. *Analytical Chemistry. News & Features*, July 1, 467A, 1998.

[117] Todoli, J.L., Mermet, J.M., Acid interferences in atomic spectrometry: analyte signal effects and subsequent reduction, *Spectrochimica Acta part B*, 54, p.895,929, 1999.

[118] Arruda, M.A.Z., Trends in sample preparation, Nova Science Publishers, New York, 2006.

[119] Johrem, L., Dry ashing, sources of error, and performance evaluation in AAS, *Mikrochimica Acta*, 119, p. 211-218, 1995.

[120] Brenna, J. T.; Morrison, G.H.; Low temperature ashing preconcentration for elemental localization in biological soft tissues by ion microscopy, *Analytical Chemistry*, 56, p. 2791-2797, 1984.

[121] Botto, R.I. in: Mester, Z., Sturgeon, R.E. *Comprehensive analytical chemistry*, Elsevier, p. 683-721, 2003.

[122] Souza, G.B., Carrilho, E.N.V.M., Oliveira, C.V., Nogueira, A.R.A., Nóbrega, J.A. Oxygen bomb combustion of biological samples for inductively coupled plasma optical emission spectrometry, *Spectrochimica Acta part B*, 57, p. 2195-2201, 2002.

[123] Mesko, M.F. *Combustão Iniciada Por Microondas em Sistema Fechado para a Decomposição de Amostras Biológicas*. Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSM. Dissertação de Mestrado, 2004, 115p.

[124] Muller, A.L.H., Muller, C.C., Lyra, F., Mello, P.A., Mesko, M.F., Muller, E.I., Flores, E.M.M., Determination of toxic elements in nuts by inductively coupled plasma mass spectrometry after microwave-induced combustion, *Food Analytical Methods*, 6, p. 258-264, 2013.

[125] Mesko, M.F., Mello, P.A., Bizzi, C.A., Dressler, V.L. Knapp, G., Flores, E.M.M., Iodine determination in food by inductively coupled plasma mass spectrometry after digestion by microwave-induced combustion, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398, p.1125-1131, 2010.

[126] Flores, E.M.M., Muller, E.I., Duarte, F.A., Grinberg, P., Sturgeon, R.E. Determination of trace elements in fluoropolymers after microwave-induced combustion. *Analytical Chemistry*, 85, p. 374-380, 2013.

Apêndice

APÊNDICE A – CERTIFICADO DE ANÁLISES DO MATERIAL DE REFERÊNCIA DE FOSFATO DE ROCHA

Certificado de Análises

**MATERIAL DE REFERÊNCIA
DE FOSFATO DE ROCHA**

Código: MR-07/2014

TABELA 1. Valores de referência para os teores totais atribuídos aos elementos determinados no MR-07/2014 e incerteza expandida (U_{MR})* em porcentagem

Mensurados (mg kg⁻¹)	Média ±U_{MR}	U_{MR} (%)
Al	2840,43 ± 136,66	5
As	15,53 ± 7,25	47
Ca (%)	35,99 ± 5,64	16
Cd	21,26 ± 3,02	14
Cr	288,78 ± 18,91	7
Cu	36,25 ± 12,65	35
Fe	1708,60 ± 62,13	4
K	567,87 ± 51,71	9
Mg	2695,87 ± 132,55	5
Mn	16,29 ± 6,90	42
Na	5350,20 ± 273,43	5
Ni	32,82 ± 8,38	25
P (%)	14,27 ± 3,94	28
V	158,14 ± 9,49	6
Zn	277,91 ± 12,80	5

*Intervalo a 95% de confiança.

Tabela 2 – Valores informativos para os teores totais atribuídos aos elementos determinados no MR de fosfato de rocha (mg kg^{-1}) por INAA..

Elemento	Intervalo Informativo (mg kg^{-1})
Ba	829 - 900
Ce	32,4- 35,00
Co	0,43 – 0,54
Eu	3,01 – 3,12
Hf	0,58 – 0,75
La	98,2 - 101
Sb	2,11 – 2,47
Sc	8,32 – 8,55
Sm	12,4 – 13,2
Th	3,51 – 3,82
U	135 - 144
Yb	14,4 – 14,9

Ensaio colaborativo

Os resultados para os teores totais apresentados na Tabela 1 foram obtidos através do ensaio colaborativo que contou com a participação efetiva de empresas da iniciativa privada, instituições de pesquisa estatais e de ensino superior, em um total de 17 participantes.

Obtenção do material

O material de referência produzido foi de uma amostra de fosfato de rocha (apatita) proveniente do Marrocos. Para diminuir o tamanho de partículas foi utilizado um moinho de copos de alta rotação da Marca Marconi modelo MA 630/1, (Piracicaba, Brasil). Foram obtidos aproximadamente 10 kg de material moído, com tamanho de partícula de aproximadamente 100 μm . Após as etapas de moagem e homogeneização,

a amostra foi avaliada quanto à homogeneidade e à estabilidade. Todas as etapas de preparo seguiram as normas baseadas nas ISO GUIAS 30 a 35.

Uso pretendido

Esta amostra destina-se ao uso como um material de referência para a medição de elementos traço em amostras de fosfato de rocha. O material também pode ser utilizado em controle de qualidade dentro do laboratório.

Preparação do material

Um lote de aproximadamente 10 kg de fosfato de rocha foi homogeneizado em homogeneizados tipo Y Para compor uma amostra a ser homogeneizada, a amostra foi dividida em 2 lotes com aproximadamente 5 kg, sendo cada lote transferido para o homogeneizador e homogeneizada durante 20 min. O procedimento de homogeneização foi repetido 3 vezes para todo o material. Após este procedimento o material foi envasado em frascos de vidro âmbar, resultando em 100 frascos com 100 g de amostra para cada frasco.

Instruções para uso

A massa mínima recomendada para a análise é de 200 mg. Deve-se realizar uma homogeneização manual prévia do frasco antes da análise e devem-se tomar as devidas precauções para evitar a contaminação do material restante no frasco.

As amostras foram solubilizadas com o emprego de ácido nítrico (7 mol L^{-1}) e peróxido de hidrogênio (30% v v⁻¹) e digeridas em forno por radiação micro-ondas com cavidade.

Homogeneidade

A homogeneidade entre frascos foi empregada utilizando-se 10 frascos e empregou-se as determinações de Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, V e Zn por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado (ICP OES) e P foi determinado com o emprego de espectrometria de emissão com plasma induzido por laser (LIBS). Foi realizada a análise de variância ANOVA de fator único, sendo possível observar que o $F_{\text{crítico}}$ foi maior que o $F_{\text{analítico}}$ para Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, V e Zn indicando resultados estatisticamente semelhantes a 95% de confiança e o material pode, portanto, ser considerado homogêneo para esses elementos (para uma massa de amostra de 200 mg).

Estabilidade

Foram avaliados dois tipos de testes de estabilidade a serem considerados em materiais de referência: a estabilidade a curto prazo e a estabilidade a longo prazo. Foram sorteados frascos aleatoriamente e colocados dentro de sistema fechado no qual a temperatura foi fixada em 37°C em estufa e a umidade em 100%, simulando épocas de chuva e calor. Este sistema fechado foi mantido durante 1 mês e feita a quantificação em triplicata dos analitos de interesse nos frascos sorteados. Para o teste de estabilidade a longo prazo foram sorteados aleatoriamente 3 frascos. A cada mês foi feita uma quantificação dos analitos em estudo, em triplicata, durante o período de 12 meses a temperatura ambiente (cerca de 25 °C), sendo realizado a fim de acompanhar a estabilidade do material sob

condições de armazenamento. Foram feitas as determinações por ICP OES para Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, V e Zn e P por LIBS. Foi realizada a análise de variância ANOVA de fator único, sendo possível observar que o $F_{\text{crítico}}$ foi maior que o $F_{\text{analítico}}$ para todos os elementos de interesse, indicando que os resultados não diferiram de forma significativa a 95% de confiança e assim, o material foi considerado estável nos dois testes avaliados. A estabilidade a longo prazo foi avaliada pela inclinação da reta e confirmada a estabilidade para os analito em estudo a 95% de confiança.

Tamanho de partículas

Foi realizado o ensaio de distribuição de partícula usando o modo de dispersão seca. O tamanho de partícula apresentou que aproximadamente 80% do material estão abaixo de 100 μm de acordo com a Figura 1.

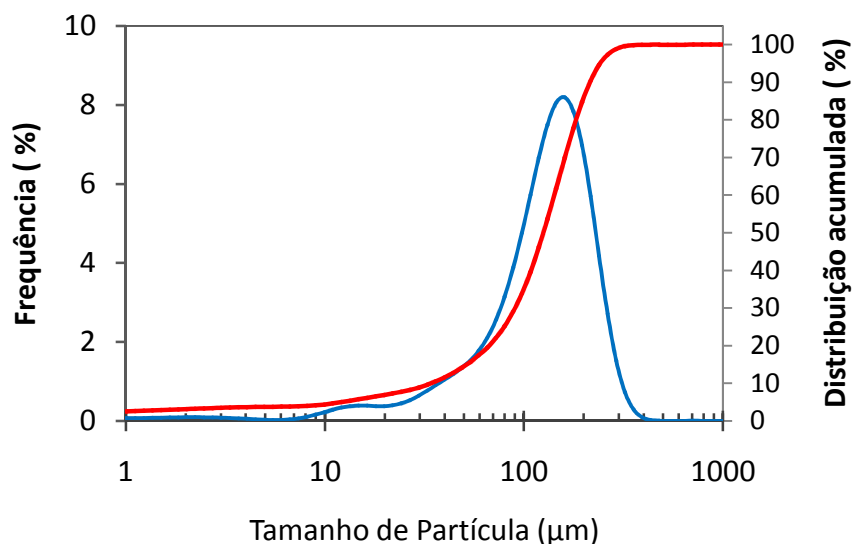


Figura 1. Distribuição do tamanho de partículas da amostra de referência de fosfato de rocha.

Incertezas

A estimativa da incerteza expandida associada aos valores de concentração (U_{MR}) foi obtida pela combinação das contribuições referentes à incerteza padrão da caracterização (u_{char}), da homogeneidade (u_{bb}), da estabilidade a curto prazo (u_{sts}) e da estabilidade a longo prazo (u_{lts}), conforme equação abaixo:

$$U_{MRC} = k\sqrt{u_{char}^2 + u_{bb}^2 + u_{sts}^2 + u_{lts}^2}$$

Adotou-se para o fator de abrangência k igual a 2, referente a intervalo de confiança de 95%. Para os cálculos das incertezas da homogeneidade, da estabilidade e da caracterização foi também seguida a norma ISO Guia 35.

Armazenamento

O material deve ser mantido fechado no frasco original e armazenado no escuro em temperatura de aproximadamente 25 °C. Os frascos também podem ser armazenados em dessecador.

Prazo de validade

Estipulou-se que o tempo de prateleira poderia ser em torno de 5 anos para o material de referência de fosfato de rocha. É possível que o material seja estável por tempo maior que o definido. Dessa forma, este material ficará como produto a ser monitorado semestralmente, até expirar o prazo de validade do material. Os resultados serão atualizados na carta controle e disponibilizados no site da Embrapa.

Técnicas utilizadas para determinação de cada elemento

A técnica utilizada para determinações dos todos os elementos foi ICP OES – Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente, LIBS - Espectrometria de Emissão Induzida por Laser e INAA – Análise por Ativação Neutrônica Instrumental.

TABELA 1. Participantes do ensaio colaborativo

CBO Análises Laboratoriais
Laboratório de Análise de Fertilizantes e Corretivos - IMA
Connan – Cia. Nacional de Nutrição Animal
Laboratório João Carlos Pedreira de Freitas - Cooperativa Regional
de Cafeicultores em Guaxupé Ltda.
Laboratório de Fertilizantes e Resíduos – Instituto Agrônômico de
Campinas (IAC)
Lab Fert Análises
Laboratório Oficial de Fertilizantes e Corretivos- LOFC-VGA-MG
(LANAGRO-MG)
Unidade de análises físico-químicas de fertilizantes, corretivos,
substratos e afins (Lanagro - SP)
Universidade de São Paulo - USP
Ribersolo Laboratório de Análise de Solo e Foliar Ltda
TECPAR – Instituto de Tecnologia do Paraná
Universidade Federal de São Carlos - Araras
Laboratório de Fertilizantes e Corretivos - UNISC
Yara Brasil Fertilizantes S.A.
Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) – USP
Embrapa Pecuária Sudeste
Embrapa Instrumentação
